HAL
open science

Etude des mécanismes contribuant aux effets des variations de l'apport en précurseurs de méthyles sur le protéome cardiaque

Emilie Martinez

To cite this version:

Emilie Martinez. Etude des mécanismes contribuant aux effets des variations de l'apport en précurseurs de méthyles sur le protéome cardiaque. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1MM19 . tel-01168283

HAL Id: tel-01168283

https://theses.hal.science/tel-01168283v1

Submitted on 25 Jun 2015

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL UNIVERSITE D'AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de DOCTEUR
(Décret du 5 juillet 1984)
Spécialité Nutrition

soutenue le 15 novembre 2012

Emilie MARTINEZ

Etude des mécanismes contribuant aux effets des variations de l'apport en précurseurs de méthyles sur le protéome cardiaque

Président :
M. Jean-Marc Lobaccaro, Pr, GreD, CNRS-INSERM, Université de Clermont-Fd

Rapporteurs :
M. Jean-Luc Daval, DR 2, INSERM, Université de Nancy
M. Régis Guieu, Pr, UMRMD2, Université de Marseille

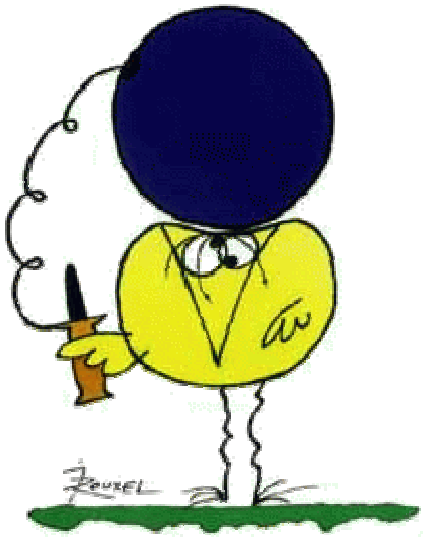
Membres :
Mme. Marie-Cécile Alexandre-Gouabau, IR 2, UMR PHAN, INRA, Université de Nantes

Directeur et co-directrice de la thèse:
M. Patrick Brachet, CR 1, HDR, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Fd
Mme. Blandine Comte, DR 2, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Fd

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Centre de Clermont-Ferrand/Theix
Unité de Nutrition Humaine (UNH), UMR1019

A mon père, Claude, … *Somewhere over the rainbow,*
A ma mère, Marie-Hélène et ma sœur, Isabelle,
A mes grands parents.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Patrick Brachet et Blandine Comte, pour leur encadrement durant ces trois années de thèse. Je suis très reconnaissnte de la confiance qu'ils m'ont témoignée pour réaliser ce travail.

Je remercie également, les membres du jury de thèse :
Messieurs Régis Guieu et Jean-Luc Daval qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail,
Monsieur Jean-Marc Lobaccaro, qui me fait l'honneur de présider ce jury,
Et Madame Marie-Cécile Alexandre-Gouabau qui participe à ce jury.

Je tiens aussi à remercier les membres du comité de thèse pour le temps consacré à chaque réunion et les conseils donnés :
Madame Céline Jousse,
Monsieur Jérome Busserolles,
Et Madame Catherine Vergely

Je tiens à remercier particulièrement Christiane Deval pour m'avoir aidée dans la réflexion scientifique et avoir partagé ses compétences techniques, tout au long de ma thèse.

Je remercie également André Mazur pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci à toute « l'ancienne » équipe MiMes dont Edmond Rock pour les conseils pertinents qu'il m'a donnée durant cette thèse, Catherine Besson pour sa gentillesse et sa disponibilité, Mathieu Rambaud pour sa formation HPLC et sa sympathie. Mais aussi Nicolas pour sa formation protéomique en première année de thèse et Emilie dit « Emile » pour sa collaboration dans les manips sur HPLC.
Je remercie tous les autres membres de l'équipe : Sergio, Joe, Claudine, Cécile, Christine, Dragan, Dominique et Séverine.

Merci au secrétariat, particulièrement, Martine Nunes et Florence Bourges pour leur gentillesse et tous les moments agréables passés ensemble.

Merci au 1er étage… plus particulièrement, Christophe Chambon et Didier Viala pour la spectrométrie de masse et Thierry Sayd pour ses conseils en protéomique
Merci au 4ème étage… Céline Jousse pour son aide dans les expérimentations de cytométrie en flux, Laurent Parry pour m'avoir aidée et conseillée pour le pyroséquençage ainsi que Daniel Béchet.

Je tiens à remercier mes 3 plus proches amis thésards pour les excellents moments passés ensemble
Sylvain dit « le Glaude » ! Mon cher collègue de bureau, adepte de « mars et ça repart ! », rêvant de créer ses couteaux d'art. Merci pour les nombreux fous-rire particulièrement pendant ces derniers mois de rédaction! Tes imitations de Gloria Gaynor resteront à jamais dans ma mémoire !
Laurie dit « Hulk » qui « n'est pas de Venteuges». Merci de m'avoir aidée à visser et dévisser ces nombreux dots blot ! Et Marine du 4ème adepte des grands gels 2D. Merci pour ta gentillesse. Vous êtes des collègues, voisines et aussi des amies avec qui les soirées entre filles (et thésardes !) autour d'une (?) bouteille de vin resteront d'excellents souvenirs. Merci pour ces bons moments passés à refaire le monde…

Merci aussi à Laurent Léotoing pour avoir relu mon second article et m'avoir donnée de précieux conseils. Merci aussi aux blagues carambars quotidiennes durant les derniers mois de rédaction.
Merci à Laurent Emmanuel, Sylvie Mercier, Yohann Wittrant, Camille et Audrey…… pour leur convivialité.

Merci à tous mes amis et collègues, thésards, ingénieurs, techniciens, stagiaires … avec qui j'ai refait le monde à l'afterwork, ou ailleurs..
Merci à Cyril, dit « Cycy », made in Pailhat beach pour les nombreux barbecues, pour les fous-rire, pour les sorties,.. merci !
Merci à Magali, pour les bons moments passés et Viva Espana !
Merci à Marie-Laure (Malo) pour ta relecture de ce manuscrit et tes conseils mais aussi pour ta gentillesse et ton bon vin !
Merci à Lamia, pour nos nombreuses discussions, nos fous-rire et pour l'entre-aide en fin de thèse
Merci à Hugues pour son soutien
Mais aussi à Amandine (Larousso !), Laureen (sans qui je n'aurais pas testé la boxe), Jérôme (« oui c'est toi Jérôme, non tu n'as pas changé »), Jeanne (Merci pour ta bonne humeur), Aurélie, Emmanuel, Souleyman, Renata,…
Merci à Yoann, le « Yo » et Mélanie de Pau pour votre bonne humeur.
Merci aussi à Wafa, Cécile, Roza, Salem, Lahlou, …

Merci aux membres actifs de l'ASICT : Sylvain et Annabelle, avec qui l'organisation des diverses soirées fut un vrai bonheur !

Merci à tous les membres du club de salsa de l'INRA, uno dos tres, cinco seis siete!

Merci également à mes amis, Oliane, Gnongnon, Mélanie, July, Gégé, Chacha, Lucie et tous les autres…. pour nos années Fac !

Et puis Merci à mes proches…..

Merci à mes cousins…
Mylène, pour tous les encouragements que tu m'as donnée depuis des années. Ton soutien a été plus précieux que tu ne le penses et ta confiance en moi m'a permis de soulever bien des montagnes ! Merci à Jeremy, Lydie et Christian.., Florent…Christian ??!, Laurence et Christophe, Julien et Aoua, Jérôme et Christine, Pierre et tous les autres…pour vos encouragements
Et puis merci à tous mes petits cousins, source de gaieté ! Je tiens aussi à remercier mes oncles et tantes, Gilles et Suzanne, ainsi que Marcelle et François pour leur soutien sans faille et leurs nombreux encouragements.
Je veux remercier ma seconde famille, le «comité tous ensemble» avec qui les fous-rire sont assurés ! Merci pour votre soutien : Jean-Pierre, Nicole, Michel, Marie-France, Jacqueline, Robert, Marie, Patrick, Olivier B., Sophie, Olivier P., Sandrine, Sébastien et les enfants Camille, Tristan, Baptiste et Mael.

Merci à Céline, éternelle amie, et Aurélie. Merci de m'avoir soutenue tout au long de cette thèse et d'avoir toujours cru en moi !

Enfin et surtout, je souhaite remercier ma mère pour tout le soutien qu'elle m'a apportée et pour son amour. Merci d'avoir supporté le stress de tous mes exams…. Du collège au doctorat !
Merci ma petite sœur, mon mini-moys, d'être ce que tu es. Ta fraîcheur, ton humour et ta joie sont toujours une vraie source d'air pur !!

RESUME

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la première cause de décès dans le monde. Une alimentation riche en précurseurs de méthyles (PDM : vitamine B9 ou folate, vitamine B12 ou cobalamine et la choline) pourrait diminuer le risque de survenue des MCV. Le statut en PDM a de très nombreuses conséquences puisque son altération va des risques de défaut de fermeture du tube neural au cours de l'embryogenèse au développement de maladies chroniques. Les PDM interviennent dans la voie de reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Une diminution des niveaux de PDM entraîne une hyperhomocystéinémie considérée comme un facteur de risque de pathologies cardiovasculaires via notamment son rôle dans le développement de l'athérosclérose. Relativement peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une déficience en PDM sur le cœur et les cellules cardiaques.
Afin de mieux comprendre les conséquences de la déficience en PDM sur cet organe, nous avons analysé les modifications du protéome myocardique chez des ratons de 21 jours nés de mères nourries avec un régime carencé en PDM comparativement à des ratons issus de mères normalement nourries (contrôles). Les résultats de notre analyse protéomique ont montré que l'abondance de 22 protéines était augmentée entre 1,1 et 1,7 fois, alors que celle de 17 autres était diminuée entre 1,1 et 2,3 fois. Ces protéines interviennent surtout dans la production d'énergie cellulaire (21%), le métabolisme lipidique (18%) et le stress du réticulum endoplasmique (RE) (15%). Au moyen de l'outil bio-informatique « Ingenuity Pathway Analysis », nous avons montré que 34 d'entres-elles appartenaient à un réseau métabolique en relation avec « une perturbation du développement cardiaque et une altération cellulaire et du métabolisme lipidique ». De plus, la carbonylation, principale modification post-traductionnelle oxydative des protéines, quantifiée par une technique de Dot-blot était augmentée de 1,9 fois dans le myocarde des ratons déficients en PDM comparativement aux contrôles. Afin d'étudier les mécanismes à l'origine de ces changements, nous avons développé un modèle *in vitro* de cellules cardiaques déficientes uniquement en folates ou en PDM. Des cellules de la lignée H9c2, dérivée de cardiomyoblastes embryonnaires de rat, ont été cultivées jusqu'à 4 jours dans un milieu carencé en folates (F) ou en PDM, comparativement à un milieu complet (C). Ceci nous a permis de disposer de deux modèles, constitués : (1) de cellules uniquement déficientes en folates et ne produisant pas davantage d'Hcy que les cellules contrôles, et (2) de cellules déficientes en au moins 2 PDM (folates et vitamine B12) et produisant des quantités accrues d'Hcy. Une analyse comparative des protéomes des cellules F et PDM *vs* C a permis d'identifier des différences et similitudes entre les 2 déficiences. Treize protéines présentant des abondances significativement différentes entre les cellules carencées pendant 4 jours en folates ou en PDM et leurs contrôles ont été mises en évidence : 7 avaient une abondance accrue et 6 une abondance diminuée. La comparaison des résultats obtenus a montré que des protéines mitochondriales ou intervenant dans la structure cellulaire n'ont été identifiées que dans le modèle de déficience en PDM. Nos résultats ont aussi démontré que les 2 types de carences affectaient des voies similaires à celles retrouvées dans notre étude *in vivo* : métabolisme énergétique et stress du RE. Nous avons alors confirmé que des protéines chaperones, α-crystalline B et prohibitine, avaient leur expression modifiée de la même manière dans les modèles de déficience *in vivo* (myocarde des ratons) et *in vitro* (cardiomyoblastes). Notre étude a également montré que l'induction rapide du stress du RE dans les cardiomyoblastes déficients en PDM est suivie par l'activation plus tardive du système d'ubiquitination des protéines et probablement de la voie de dégradation protéolytique dépendante du protéasome.
En conclusion, cette thèse ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes des effets de la déficience en PDM ou en folates au niveau cardiaque.

LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

1- Myocardium proteome remodelling after nutritional deprivation of methyl donors
Emilie Martinez, Nicolas Gérard, Maria M. Garcia, André Mazur, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Jean-Louis Guéant, Blandine Comte, Patrick Brachet
Journal of Nutritional Biochemistry, 13 janv 2013

2- Folate and methyl donor deficiencies modify proteome of cardiomyoblast and induce an ER stress
Emilie Martinez, Christiane Deval, Céline Jousse, André Mazur, Patrick Brachet, Blandine Comte
En préparation pour être soumis à International Journal of Biochemistry & Cell Biology

Communications orales

1- Martinez E, Gérard N, Deval C, Rambeau M, Roche E, Gérard P, Mazur A, Guéant JL, Comte B, Brachet P
Changes in the rat cardiomyoblast H9c2 cell *proteome after methyl donor deficiency.*
2nd International Vitamin Conference, Copenhagen, Danemark, 23-25 Mai 2012

2- Martinez E, Gérard N, Deval C, Rambeau M, Roche E, Gérard P, Mazur A, Guéant JL, Comte B, Brachet P
Mise en évidence de modifications du protéome de cellules de la lignée cardiomyoblastique H9c2 par la carence en précurseurs de méthyles.
Journée Scientifique du CRNH d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 24 novembre 2011

3- Martinez E, Deval C, Gérard N, Rambeau M, Gérard P, Guéant J.L, Mazur A, Comte B, Brachet P
Elaboration d'un modèle in vitro de carence en précurseurs de méthyles dans la lignée cardiomyoblastique H9c2.
Journée des doctorants de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH), à l'INRA, Clermont-Ferrand/Theix, France, 25 mai 2011

4- Martinez E, Gérard N, Moreno-Garcia MA, Guéant-Rodriguez RM, Alberto JM, Mazur A, Guéant JL, Comte B, Brachet P
Modifications du protéome myocardique de ratons en réponse à une déficience gestationnelle en précurseurs de méthyles.
Journée de la Recherche (IFR), Clermont-Ferrand, France, 25 novembre 2010

5- Martinez E, Moreno-Garcia MA, Guéant-Rodriguez RM, Gérard N, Alberto JM, Comte B, Mazur A, Guéant JL, Brachet P

Changes in the myocardium proteome of rat pups after maternal deficiency of methyl donors.
NuGOweek 2010, Glasgow, Ecosse, 31 août au 3 septembre 2010

Communications affichées

1- Martinez E, Deval C, Gérard N, Rambeau M, Gérard P, Guéant J.L, Mazur A, Comte B, Brachet P
Development of an in vitro model of methyl donor deficiency in the H9c2 cardiomyoblastic cell line.
8th NSFA Congress and 5th Joint meeting of French, German and Swiss Atherosclerosis Societies, Avignon, France, 16 au 18 juin 2011

2- Martinez E, Deval C, Gérard N, Rambeau M, Gérard P, Guéant J.L, Mazur A, Comte B, Brachet P
Elaboration d'un modèle in vitro de carence en précurseurs de méthyles dans la lignée cardiomyoblastique H9c2.
Journée de l'école doctorale (JED), Clermont-Ferrand, France, 21 et 22 avril 2011

3- Martinez E, Gérard N, Moreno-Garcia MA, Guéant-Rodriguez RM, Alberto JM, Mazur A, Guéant JL, Comte B, Brachet P
Modifications du protéome myocardique de ratons en réponse à une déficience gestationnelle en précurseurs de méthyles.
Journée Scientifique du CRNH d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, 18 novembre 2010

4- Didier V, **Martinez E**, Blaise S, Gérard N, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL, Brachet P
Proteomic analysis of protein carbonylation in the cerebellum and myocardium of methyl donor-deficient rat pups.
Proteomics Europe 2009 conference, Barcelone, Espagne, 5 et 6 Novembre 2009

Obtention de bourses pour participation à des congrès internationaux:

1- Bourse Société Française de Nutrition (SFN)

2- Bourse region Auvergne

3- Bourse Société Francophone Vitamines et Biofacteurs (SFVB)
http://www.sfvb.org/pages/actualite.htm

ABREVATIONS

2,4 DNPH : 2,4-Dinitrophenylhydrazine
4-HNE : 4-Hydroxy-2-nonenal
5,10-CH2-THF : 5,10 méthylène tétrahydrofolate
5-MTHF : 5-méthyltétrahydrofolate
10-CHO-THF : 10-formyl-THF

ACh: Acétylcholine
ADAM17 : Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17
ADP : Adénosyl diphosphate
ADMA : diméthylarginine asymétrique
AF : Acide folique
AFTN: Anomalies de fermeture du tube neural
AG : Acides gras
AGEs : Produits de glycation avancés
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AMT : Apport maximal tolérable
ANC : Apports nutritionnels conseillés
ANP : Peptide natriurétique de type A
ApoA/E: Apolipoprotéine A et E
APS : Ammonium persulfate
ATF4 : activating transcription factor 4
ATF6 : activating transcription factor 6
ATP : Adénosine triphosphate
AVC : Accident vasculaire cérébrale

BHMT : Bétaine homocystéine méthyltransférase
BNP : Peptide natriurétique de type B
BSA : Albumine de serum bovin

CBS : Cystathionine-β-synthase
CEV : Cellules endothéliales vasculaires
CGL : Cystathionine gamma lyase
CLHP : Chromatographie liquide à haute performance
CMLV : Cellules musculaires lisses vasculaires
CHAOS : Cambridge Heart Antioxidant Study
CHAPS : Acid 3- ((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate
CHOP : C/EBP-homologous protein
CPT : Carnityl palmito-transférase
CRP : Protéine C réactive

DDAH : Diméthylarginine diméthylaminohydrolase
DHF : Dihydrofolate
DHFR : Dihydrofolate réductase
DNP : Dinitrophenylhydrazone
Dnmt : ADN methyltransférases
DO : Densité optique

DTT : Dithiothréitol
dUMP : Acide déoxyuridylique

EDTA : Acide éthylène diamine tetra acétique
EBD : Electrophorèse bidimensionnelle
EMD : Electrophorèse monodimensionnelle
eNOS : NO synthase endothelial
ENNS : Etude Nationale Nutrition Santé
ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ERN : Espèces réactives de l'azote
ERO : Espèce radicalaire oxygénée
ET : Endothéline

FAD : Flavine adénine dinucléotide
FADH2 : Flavine adénine dinucléotide réduite
FDA : Federal drug Administration
FI : Facteur intrinsèque
FMD : « Flow Mediated Dilation » ou vasodilatation dépendante du flux sanguin
FMN : Flavine mononucléotide
FOLARDA : FOLic Acid on Risk Diminishment after Acute myocardial infarction

GMP : Guanosine monphosphate
GPx : Glutathion péroxydase
GRP78 : Glucose Related Protein 78 *appelée également BiP*

HAEC : Cellules endothéliales aortiques humaines
HCl : Acide chlorydrique
Hcy : Homocystéine
HDL : high density lipoproteins
Herp : Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein
HHcy : Hyperhomocystéinémie
HNE : 4-Hydroxynonénal
H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HoloTC : Holotranscobalamine
HOPE : Heart Outcomes Prevention Evaluation
H_2S : Hydrogène sulfuré
HTL : Homocystéine thiolactone
HUVEC : Cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain

ICAM : Intercellular adhesion molecule 1
IDL : intermediary density lipoproteins
IEF : Isoélectrofocalisation
IFN : Interféron
IL : Interleukine
IOM : Institut de médecine américain
IRE1 : Inositol requiring enzyme 1
IRE-1α : inositol-requiring transmembrane kinase and endonuclease 1α

LDL : Lipoprotéine de faible densité

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MAT : Méthionine adénosyltransférase
MCV : Maladies cardiovasculaires
MCP-1 : Monocyte chemotactic protein-1
MDA : Acide malondialdéhyde
MEC : Matrice extracellulaire
MMA: méthylmalonique
MMP : Métalloprotéinase
MPT : Modifications post-traductionnelles
Mr : Masse moléculaire
MS : Méthionine synthétase
MTHF : Méthyltétrahydrofolate
MTHFR : 5,10 MéthylèneTHF réductase

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide
NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey
NO : monoxyde d'azote
NORVIT : Norwegian Vitamin Trial

O_2^- : Anion superoxyde

$pABG_n$: Para-aminobenzoylpolyglutamates
PDM : Précurseurs de méthyles
PEMT: Phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase
PERK : PKR-like εR protein kinase
PGC-1α : Coactivateur transcriptionnel des PPARs
pI : Point isoélectrique
PKG : protéine kinase G
PLP : Phosphate de pyridoxal
PNNS : Programme National Nutrition Santé
PPAR : Proliférateurs de peroxysomes
PVDF : Polyvinydilène difluoride

RCDC : Reducing agent compatible detergent compatible
RCF: Reduced folate carrier
RE: Reticulum endoplasmique
RTP : Reducing agents and tunicamycin-responsive protein

SAH : S-adénosylhomocystéine
SAHH : SAH hydrolase
SAM : S-adenosylméthionine
SDS-PAGE: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en presence de sodium dodécylsulfate
SHMT: Sérine hydroxyméthyltransférase
SM : Spectrométrie de masse
SOD : Supéroxyde dismutase
SU.VI.MAX : SUpplémentation en VItamines et Minéraux Anti-oXydants

TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances
TBS : Tris buffer salin

TBS-T : Tris buffer salin-tween
TC : Transcobalamine
TCA : Acide trichloroacétique
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF-β (Transforming growth factor- β)
tHcy : Homocystéine totale
THF : Tétrahydrofolate
TIMP : Tissue inhibitors of metalloproteinases
TMP : Acide thymidylique
t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène
TS : Thymidylate synthase

UNH : Unité de nutrition humaine
UPR : Unfolded protein response

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1
VLDL : lipoprotéines de très faible densité
VISP :Vitamin Intervention for Stroke Prevention

WAFACS: Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study
WB : Western blot
WENBIT: Western Norway B Vitamin Intervention Trial

Xbp1: X-box binding protein 1

LISTE DES FIGURES 20
LISTE DES TABLEAUX 22
AVANT-PROPOS 24
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 27
I. PRECURSEURS DE METHYLES (PDM) 27
I. 1. Généralités sur les folates, la vitamine B12 et la choline 27
I. 1. 1. Les folates 27
I. 1. 1. 1. Absorption intestinale 28
I. 1. 1. 2. Folates sanguins 29
I. 1. 1. 3. Folates cellulaires 29
I. 1. 1. 4. Catabolisme des folates 29
I. 1. 2. La vitamine B12 30
I. 1. 2. 1. Absorption intestinale 31
I. 1. 2. 2. Vitamine B12 dans le sang 32
I. 1. 2. 3. Vitamine B12 cellulaire 32
I. 1. 2. 4. Catabolisme de la vitamine B12 33
I. 1. 3. La choline et la bétaine 33
I. 1. 3. 1. Absorption de la choline 34
I. 1. 3. 2. La choline cellulaire : 34
I. 2. Sources d'apport en PDM 35
I. 3. Rôles physiologiques des PDM 37
I. 3. 1. Le cycle de l'homocystéine et de la méthionine 38
I. 3. 1. 1. L'homocystéine 38
I. 3. 1. 2. La reméthylation de l'homocystéine 38
I. 3. 1. 3. La transméthylation de la méthionine 39
I. 3. 1. 4. La transsulfuration de l'Hcy 39
I. 3. 2. Régulation nutritionnelle du cycle de l'Hcy et de la méthionine. 41
I. 3. 3. Autres rôles des PDM 41
I. 3. 3. 1. Les folates 41
I. 3. 3. 2. La vitamine B12 42
I. 3. 3. 3. La choline 43
II. DEFICIENCE EN PRECURSEURS DE METHYLES ET HYPERHOMOCYSTEINEMIE (HHcy) 44
II. 1. La déficience en PDM 44
II. 1. 1. Les origines de la déficience en PDM 44
II. 1. 2. Conséquences de la carence en PDM : l'hyperhomocystéinémie 47
II. 2. Prévalence dans la population (groupes à risque de déficience) 48
II. 3. Pathologies liées à la déficience en PDM 51
II. 3. 1. Anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) 51

II. 3. 2. La stéatose hépatique 52
II. 3. 3. Autres pathologies 53
II. 4. Effets des politiques d'enrichissement alimentaire sur l'homocystéinémie 55
II. 5. La déficience en PDM, l'HHcy et les maladies cardiovasculaires 57
II. 6. Effets des supplémentations en PDM sur les MCV 60

III. PROCESSUS ET MOLECULES CIBLES DE LA DEFICIENCE EN PDM ET DE L'HHcy 63

III. 1. Processus cibles 63
III. 1. 1. Stress du réticulum endoplasmique 63
III. 1. 2. Stress oxydant 67
III. 1. 3. Métabolisme du monoxyde d'azote 72
III. 1. 4. Voie de l'inflammation 76
III. 1. 5. Prolifération, apoptose et nécrose cellulaire 78
III. 2. Molécule cibles 79
III. 2. 1. Les acides nucléiques 79
III. 2. 1. 1. Méthylation de l'ADN 79
III. 2. 1. 2. Incorporation inadéquate d'uraciles 81
III. 2. 1. 3. Stabilité/réparation de l'ADN 82
III. 2. 2. Expression génique 83
III. 2. 3. Protéines 84
III. 2. 3. 1. Homocystéinylation 85
III. 2. 3. 2. La carbonylation 86
III. 2. 3. 3. Les protéines de la matrice extracellulaire 87
III. 2. 4. Lipoprotéines et lipides intracellulaires 88
III. 2. 5. Métabolisme énergétique mitochondrial 90

IV. DEFICIENCE EN PDM ET PHYSIOPATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES (CV) 92

IV. 1. Anatomie du système cardiovasculaire 92
IV. 1. 1. Le cœur 92
IV. 1. 1. 1. Les cellules myocytaires 94
IV. 1. 1. 2. Les cellules non myocytaires 95
IV. 1. 2. L'endothélium et les cellules endothéliales vasculaires (CEV) 95
IV. 1. 3. Les vaisseaux sanguins 95
IV. 1. 3. 1. Le système artériel et veineux 97
IV. 2. Métabolisme cardiaque 98
IV. 2. 1. Couplage excitation-contraction 98
IV. 2. 2. Sources énergétiques cardiaques 99
IV. 3. Maladies cardiovasculaires 101
IV. 4. Le cycle de l'homocystéine dans les cellules cardiaques 103

IV. 5. Conséquences physiologiques et métaboliques de la déficience en PDM au niveau cardiovasculaire 103
IV. 5. 1. Athérosclérose 103
IV. 5. 1. 1. Dysfonction endothéliale 103
IV. 5. 1. 2. Développement de la plaque d'athérome 108
IV. 5. 2. La thrombose 113
IV. 5. 3. La défaillance cardiaque 117
IV. 5. 3. 1. Implication de la déficience en PDM et/ou de l'HHcy 117
IV. 5. 3. 2. Les mécanismes physiopathologiques de l'HHcy 118
IV. 5. 3. 3. Les effets des supplémentations en PDM 121

OBJECTIFS 122

MATERIELS ET METHODES 125

I. Première étude 126
I. 1. Modèles utilisés 126
I. 1. 1. Modèle animal : des ratons de 21 jours déficients en PDM après une carence nutritionnelle chez la mère. 126
I. 1. 2. Développement d'un modèle de cellules cardiaques carencées en PDM 128
I. 2. Préparation d'extraits protéiques 129
I. 2. 1. Extraction des protéines myocardiques 129
I. 2. 2. Extraction des protéines cellulaires 129
I. 2. 3. Dosage des protéines 129
I. 3. Mesure du niveau totale de carbonylation des protéines 130
I. 3. 1. Marquage des carbonyles 130
I. 3. 1. 1. Dosage spectrophotométrique 130
I. 3. 1. 2. Dot blot 131
I. 4. Analyse protéomique 131
I. 5. Dosage de l'Hcy par CLHP 133
I. 6. Dosage des vitamines B9 et B12 133
I. 7. Western blot 134

II. Seconde étude 134
II. 1. Développement d'un modèle de cellules cardiaques carencées en folates 134
II. 2. Matériels et méthodes 135
II. 2. 1. L'analyse protéomique 135
II. 2. 2. Extraction des ARNm 135
II. 2. 3. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) 136

III. Expérimentations supplémentaires 136

III. 1. Evaluation de la taille des cellules et du stress oxydant par cytométrie en flux 136

III. 2. Dosages de la S-adénosyl-méthionine (SAM) et S-adénosyl-homocystéine (SAH) intracellulaires 137

RESULTATS 138

I. Première étude (publication n°1) 139

I. 1. Introduction 139

I. 2. Objectifs 139

I. 3. Publication n°1 intitulée "Myocardium proteome remodelling after nutritional deprivation of methyl donors" 140

I. 4. Résultats majeurs 181

I. 4. 1. Génération d'un stress oxydant dans le myocarde des ratons carencés en PDM 181

I. 4. 2. Altération du protéome myocardique chez les ratons carencés en PDM 181

I. 4. 3. Développement d'un modèle in vitro carencé en PDM 181

I. 4. 4. Reproduction, *in vitro*, dans un modèle cellulaire de carence en PDM des variations d'expression de protéines identifiées *in vivo* 182

I. 5. Conclusion 183

II. Seconde étude (publication n°2) 184

II. 1. Introduction 184

II. 2. Objectifs 184

II. 3. Publication n°2 intitulée « Folate and methyl donor deficiency modify proteome of cardiomyoblasts and induce an ER stress" 185

II. 4. Résultats 220

II. 4. 1. Effets de la déficience en folates et en PDM sur la production d'Hcy par les cardiomyocytes 220

II. 4. 2. Mise en évidence de différences et similitudes entre les effets d'une déficience en folates et d'une déficience en folates/vitamine B12/choline sur le protéome des cardiomyoblastes 220

II. 4. 3. Activation de la réponse au stress du RE et de la protéolyse ubiquitine-dépendante dans les cellules H9c2 déficientes en PDM 222

II. 5. Conclusion 222

III. Etudes complémentaires 223

III. 1. Implication de c-myc dans les mécanismes de l'effet de la déficience en PDM 223

III. 2. Evaluation du stress oxydant dans les cellules déficientes en folates ou en PDM 225

III. 3. Evaluation de la capacité de méthylation des cellules déficientes en folates ou en PDM 227

DISCUSSION GENERALE 229

I. Effets de la déficience en PDM sur le protéome cardiaque 230

II. Induction d'un stress oxydant par une déficience nutritionnelle en PDM *in vivo* 233

III. Fonctions altérées par la déficience en PDM dans le myocarde *in vivo* et dans les cardiomyoblastes *in vitro* 235

III. 1. Métabolismes énergétique et lipidique 235

III. 2. Altération de la structure du cœur et des cardiomyoblastes 236

III. 3. Activation de protéines chaperones 237

III. 4. Induction d'un stress du RE 240

III. 5. Induction du système de dégradation protéasome-dépendant 242

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 243

I. Conclusion générale 244

II. Perspectives 244

II. 1. Stress du RE et du système de dégradation des protéines protéasome-dépendant 244

II. 2. Implication de C-MYC et de la méthylation dans l'expression génique 245

II. 3. Une politique de prévention primaire ne serait-elle pas judicieuse ? 245

II. 4. Limites de nos études 246

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique des folates

Figure 2 : Structure chimique de la cobalamine (vitamine B12) et des différentes formes actives

Figure 3 : Mécanismes d'absorption de la vitamine B12

Figure 4 : Structures chimiques de la choline et de la bétaine

Figure 5 : Absorption et métabolisme hépatique de la choline

Figure 6 : Reméthylation de l'homocystéine en méthionine

Figure 7 : Les différentes formes d'homocystéine retrouvées dans le plasma

Figure 8 : Cycle de l'homocystéine et de la méthionine

Figure 9 : Implication des folates dans différentes réactions métaboliques

Figure 10 : Les causes de carence en B12 aux différentes étapes du métabolisme de la cobalamine

Figure 11 : Taux de déficience en folates dans différents groupes d'âges chez les hommes et les femmes (estimés sur la base de la concentration plasmatique en folates)

Figure 12 : Distribution des hommes et des femmes de 18-74 ans selon la fréquence quotidienne moyenne de consommation de fruits et légumes et l'âge

Figure 13 : Les différentes formes de défaut de fermeture du tube neural (AFTN)

Figure 14 : Le statut « d'enrichissement des farines » en fer et/ou acide folique (AF) des différents pays en 2012

Figure 15 : Evolution de la prévalence moyenne des AFTN pour 10000 naissances au Royaume-Uni et en Irlande comparativement aux autres pays d'Europe, entre 1980 et 2001

Figure 16 : Les voies de signalisation de la réponse UPR

Figure 17 : Relations existantes entre les espèces réactives issues de l'oxygène (en rouge) et celles issues de l'azote (en vert)

Figure 18 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques

Figure 19 : Le découplage de la eNOS

Figure 20 : L'interaction des folates avec la eNOS

Figure 21 : Relation entre HHcy et métabolisme du NO

Figure 22 : Conséquences de l'altération de la méthylation de l'ADN et de son incorporation anormale d'uraciles

Figure 23 : Formation de l'homocystéine-thiolactone

Figure 24 : Homocystéinylation des résidus lysyles de protéines
Figure 25 : Anatomie du cœur
Figure 26 : Les différentes couches des vaisseaux sanguins
Figure 27 : Schéma d'un sarcomère
Figure 28 : Couplage excitation-contraction
Figure 29 : Métabolisme énergétique du cœur
Figure 30 : Processus pathologiques de l'athérothrombose
Figure 31 : Implication de l'homocystéine dans les différentes étapes de l'athérothrombose
Figure 32 : Implication de l'homocystéine dans la coagulation et la fibrinolyse
Figure 33 : Protocole suivi par l'INSERM U954 pour l'obtention de ratons déficients en précurseurs de méthyle
Figure 34 : Protocole de culture des cellules cardiomyoblastiques H9c2 dans le milieu synthétique MCDB 131 déficient en PDM (-PDM) ou contrôle (C) (Etude n°1)
Figure 35 : Schéma simplifié de l'électrophorèse bi-dimensionnelle (EBD) et de l'identification des spots protéiques par spectrométrie de masse (par MALDI-ToF : Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight ou LC-MS/MS)
Figure 36 : Protocole de culture des cellules cardiomyoblastiques H9c2 dans le milieu synthétique MCDB 131 -F, -PDM ou C (Etude n°2)
Figure 37 : Répartition des protéines suivant leur localisation
Figure 38 : Répartition des protéines suivant leur fonction
Figure 39 : Réseau généré par l'outil IPA montrant la relation du facteur de transcription C-MYC avec plusieurs des protéines identifiées dans l'analyse in vivo du protéome de myocarde de ratons déficients en PDM
Figure 40 : Expression du gène c-myc au cours du temps dans des cellules cardiomyoblastiques H9c2 exposées à un milieu déficient en folates (-F) ou en 3 PDM (folates, vitamine B12 ou choline; -PDM)
Figure 41 : Evaluation du stress oxydant dans les cellules H9c2 après 4 jours de carence en folates ou 3 PDM
Figure 42 : Mesure de l'abondance protéique de la SOD1 après 4 jours de déficience en folates ou en 3 PDM

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les apports nutritionnels conseillés (ANC) des folates

Tableau 2 : Les ANC de la vitamine B12

Tableau 3 : Les apports nutritionnels conseillés (ANC) et sources alimentaires de la choline et de la bétaine

Tableau 4 : Sources alimentaires des folates

Tableau 5 : Les principales études sur l'effet de la supplémentation en acide folique, vitamines B12 et B6, sur les risques cardiovasculaires

Tableau 6 : Taux d'augmentation et de diminution, respectivement, des concentrations d'homocystéine extracellulaires, et de vitamine B12 et folates intracellulaires après exposition des cellules H9c2 à un milieu déficient en PDM vs le milieu C

Tableau 7 : Concentration de SAM et SAH dans les extraits de cellules contrôles et déficientes en 3 PDM ou folates

Tableau 8 : Exemple d'études protéomiques identifiant des protéines « marqueurs » de pathologies cardiovasculaires

AVANT-PROPOS

De très nombreuses études ont permis de mettre en évidence la relation entre l'alimentation et la santé. Le programme national nutrition santé (PNNS) a été mis en place afin d'améliorer les apports alimentaires des Français et notamment pour les groupes à risque que sont les personnes âgées et les femmes enceintes. La consommation journalière de cinq fruits et légumes et de viande ou poisson 1 à 2 fois par jour permet notamment, d'apporter les nutriments indispensables que sont les vitamines. Un des objectifs du PNNS est aussi d'améliorer le statut en folates des femmes en âge de procréer. En effet, malgré les recommandations, peu des femmes concernées sont au courant des risques associés à une déficience. Aussi, la prévalence de la déficience en folates et vitamine B12 est de 10% dans la population générale et de 30 à 40% chez les personnes âgées hospitalisées. Or, la carence en ces vitamines a un impact important sur la santé. La déficience en vitamines B9 (folates) et B12 (cobalamine) augmente effectivement le risque de développement de pathologies telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, des cancers ou encore des malformations congénitales comme le *spina bifida*. Beaucoup moins d'études se sont intéressées à leur impact sur le système cardiovasculaire. Or il est aujourd'hui reconnu que leur carence est impliquée dans l'apparition des maladies cardiovasculaires (MCV) qui reste la première cause de mortalité en France et dans le monde.

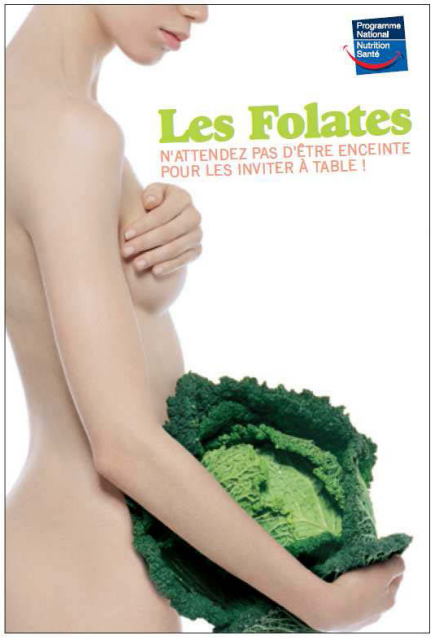
Dans ce contexte, l'objectif principal de mon projet de recherche était de mieux comprendre les liens entre les folates, vitamine B12 et choline, définis comme des « précurseurs de méthyles » (PDM), l'homocystéine (Hcy) et le tissu cardiaque. Plus précisément, nous avons étudié les effets d'une déficience en PDM sur le protéome cardiaque. Ces PDM ont la capacité de donner un groupement méthyle ($-CH_3$) à une autre molécule. Ils interviennent dans le cycle de la méthionine et principalement dans la voie de reméthylation de l'Hcy en méthionine. Une altération de cette voie par une déficience en un ou plusieurs PDM entraîne une augmentation des niveaux d'Hcy plasmatique ou hyperhomocystéinémie. Cette dernière a été identifiée comme un facteur de risque de MCV. Cependant les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu ne sont pas encore clairement établis.

Le but du projet de ma thèse était donc d'apporter de nouvelles informations:

- ✔ sur les effets de la déficience en PDM sur le protéome cardiaque global. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de ratons de 21 jours issus de mères ont été nourries avec un régime déficient en PDM,
- ✔ sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de la déficience en PDM *via* l'étude de protéines d'intérêt. Pour appréhender cette partie, nous avons développé un modèle de

cellules cardiaques placées dans les conditions mimant celles observées chez les rats déficients en PDM.

La première partie de ce manuscrit consiste en une revue bibliographique qui s'articule en 4 chapitres. Dans un premier chapitre, des généralités sur les PDM que nous avons étudiés sont décrites. Le second chapitre permet de mieux comprendre le lien entre la déficience en ces PDM, l'Hcy et les pathologies. Le troisième chapitre concerne les processus et molécules cibles de la déficience en PDM et de l'HHcy. Enfin, la dernière partie se concentre sur les conséquences d'une déficience en PDM et de l'HHcy sur le système cardiovasculaire. Les buts et hypothèses de travail sont ensuite définis et les résultats de 2 articles (1 accepté et 1 soumis pour publication), ainsi que des données additionnelles, sont exposés. Une discussion générale et des perspectives terminent ce document.



REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PRECURSEURS DE METHYLES (PDM)

I. 1. Généralités sur les folates, la vitamine B12 et la choline

I. 1. 1. Les folates

Le terme « folates » désigne une famille de molécules hydrosolubles présentant une activité vitaminique et dont la structure chimique dérive de celle de l'acide folique (AF), leur forme synthétique la plus simple **(Figure 1)**. En 1941, l'AF est pour la première fois isolé de feuilles d'épinards (Cossins, 2000). L'AF n'est pas la forme active des folates. En revanche, il est stable et donc fréquemment utilisé pour enrichir les produits alimentaires (Shane, 2008). L'AF est formé par la liaison d'une molécule d'acide ptéroïque à une molécule d'acide glutamique (monopteroylglutamate). L'activité biologique des folates est supportée par des dérivés de l'AF allongés par la présence de 1 à 7 molécules d'acide glutamique supplémentaires, reliées par des liaisons γ-peptidiques (polypteroylglutamates), plus ou moins hydrogénés et chargés d'un groupement monocarboné (méthyle, formyle, méthényle, méthylène) sur leur partie ptéroïque.

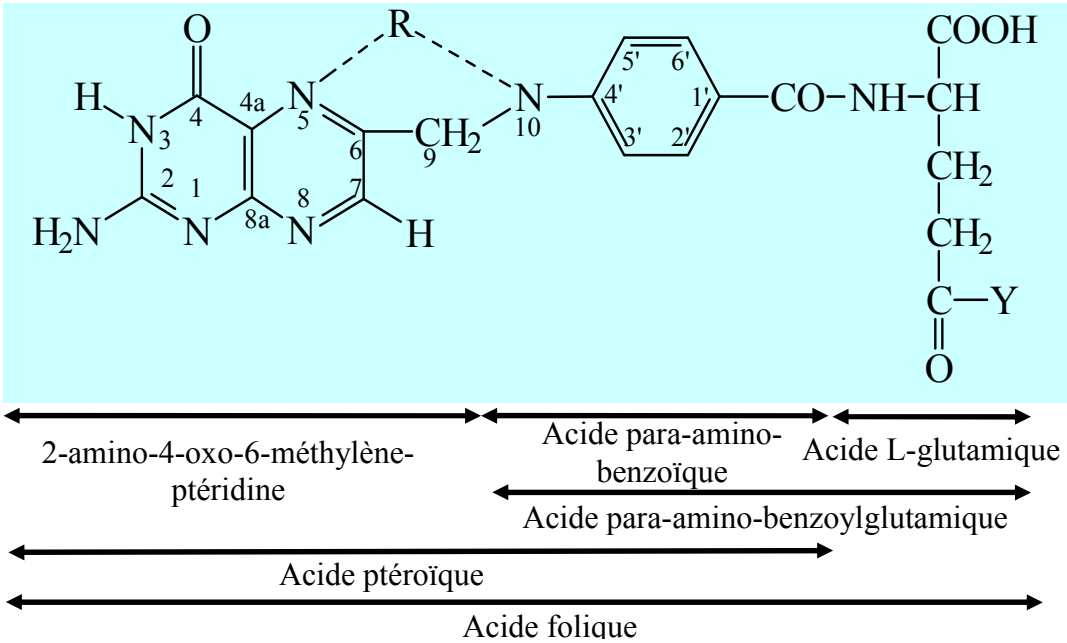


Figure 1 : Structure chimique des folates. Y=0 à 7 additions d'acide glutamique et R= groupement alkyle, méthyle, formyle.

Chez l'Homme, les besoins en folates ont été évalués à environ 300 µg/j (apports nutritionnels conseillés, ANC), valeur qui a été jugée supérieure dans certaines situations physiologiques telles que la grossesse ou l'allaitement (ANC = 400 µg/j) **(Tableau 1)**.

Tableau 1 : Les apports nutritionnels conseillés (ANC) des folates.

Catégories	ANC (µg/j)
Nourrissons	70
Enfants 1-12 ans	100-250
Adolescents et adultes	300
Femmes enceintes et allaitantes	400

D'après l'Agence Nationale de sécurité sanitaire (ANSES), 2012
http://www.anses.fr/index.htm

I. 1. 1. 1. Absorption intestinale

Les folates polyglutamates représentent 90% des formes naturellement présentes dans les aliments. La biodisponibilité des folates alimentaires correspondant à la fraction ingérée qui est absorbée et utilisée dans les processus métaboliques, est estimée entre 50 et 90% (Ohrvik *et al.*, 2011). Certains facteurs physiologiques et pathologiques peuvent jouer sur cette biodisponibilité. En effet, leur absorption dans l'intestin se fait à un pH 5 alors que les enzymes de déconjugaison des folates agissent à pH 6-7. De ce fait, en cas d'altération du pH par la prise de médicament ou encore d'insuffisance pancréatique, l'absorption est diminuée (Gregory, 2001; Urquhart *et al.*, 2010). Aussi, il est important de souligner que la biodisponibilité des folates alimentaires serait moins importante que celle de l'AF (Ohrvik *et al.*, 2011).

Les folates polyglutamates doivent être hydrolysés en leurs formes monoglutamates avant leur absorption par la muqueuse intestinale (Stover, 2004). Cette hydrolyse peut-être catalysée par 2 types de conjugases, l'une issue des sécrétions pancréatiques (γ-glutamyl hydrolase) et l'autre associée à la membrane de la bordure en brosse jéjunale (glutamate carboxypeptidase IV). Les folates monoglutamates, mais aussi l'AF apporté sous la forme de suppléments ou d'un enrichissement alimentaire sont absorbés dans le jéjunum, puis en partie réduits par la dihydrofolate réductase (DHFR) en tétrahydrofolate (THF) pour s'incorporer au cycle des

folates. Le THF est au carrefour de différentes réactions du métabolisme des monocarbones *(Cf. § I.3.1.2. p18).* La plupart des folates et AF alimentaires sont métabolisés en 5-méthyl-THF (5-MTHF) durant leur passage dans la muqueuse intestinale puis dans le foie.

I. 1. 1. 2. Folates sanguins

La forme plasmatique est le 5-MTHF monoglutamate. Les folates plasmatiques sont liés à des protéines circulantes telle que l'albumine, ou à un transporteur plus spécifique, la Folate Binding Protein. Les érythrocytes contiennent des concentrations supérieures à celles retrouvées dans le plasma (respectivement : 160 à 640 ng/mL et 5 à 20 ng/mL).

I. 1. 1. 3. Folates cellulaires

Les folates monoglutamates sont transportés du sang aux tissus par différents mécanismes : par endocytose, par des récepteurs de surface cellulaire ou encore par un transporteur des folates réduits, le Reduced Folate Carrier (RCF). Ce dernier a, en revanche, peu d'affinité pour l'AF. Les folates monoglutamates sont transformés en formes polyglutamates par la folylpolyglutamate synthétase. Dans la cellule, leur métabolisme est compartimentalisé dans le cytoplasme et la mitochondrie où les unités monocarbonées permettent la synthèse du formate, de la glycine et du méthionyl-ARNt (Tibbetts *et al.*, 2010).

La cellule contrôle l'entrée et la sortie des folates par la « polyglutamylation » (Stover, 2004), cette dernière permettant de retenir les folates en limitant leur sortie. Après avoir été transportés jusqu'au foie, les folates sont redistribués aux tissus périphériques sous la forme de 5-MTHF monoglutamate (Stover, 2004) ou recyclés par un cycle entérohépatique (Steinberg *et al.*, 1979).

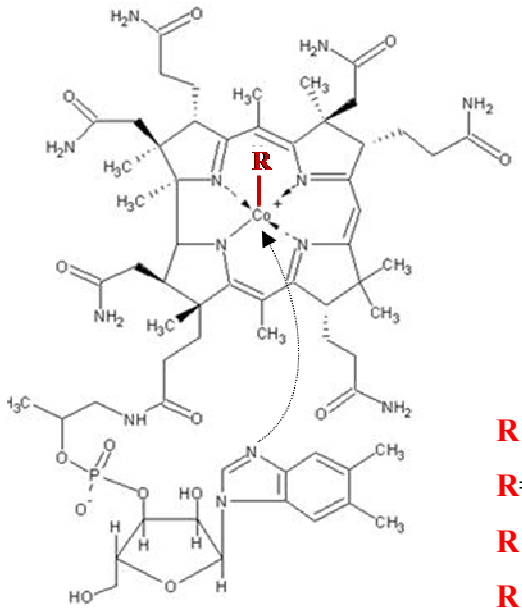
I. 1. 1. 4. Catabolisme des folates

Il est estimé que seulement 0,3 à 0,8% du pool de folates est excrété quotidiennement (Ohrvik *et al.*, 2011). L'excrétion biliaire des folates est importante mais la plupart sont, néanmoins, réabsorbés au niveau de l'intestin grêle (cycle entérohépatique). Une faible proportion se retrouve dans les fèces. La présence du produit de dégradation, le para-aminobenzoylpolyglutamate ($pABG_n$), dans les urines est un bon indicateur du catabolisme des folates (Gregory *et al.*, 2001). La première étape de leur catabolisme est le clivage de la liaison du carbone 9 et de l'azote 10 des folates polyglutamates intracellulaires, conduisant à la production de ptéridines et de $pABG_n$. Ces derniers sont ensuite hydrolysés en

monoglutamate puis N-acétylés en acétamidobenzoylglutamate au niveau hépatique avant leur élimination.

I. 1. 2. La vitamine B12

La vitamine B12 ou Cobalamine a été découverte en 1948. Sa structure comprend un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine, qui renferme en son centre un atome de cobalt auquel est relié différents groupements permettant de répertorier quatre formes actives de la vitamine B12 : la cyanocobalamine, l'hydroxycobalamine, l'adénosylcobalamine et la méthylcobalamine. Cette structure comprend également le nucléotide 5,6-diméthylbenzimidazole dont le groupe imidazole est relié au cobalt et le phosphate à l'un des noyaux pyrrols **(Figure 2)**.



R = CN ; cyanocobalamine

R= OH ; hydroxocobalamine

R = CH_3 ; méthylcobalamine

R = 5-désoxyadénosyl ; adénosylcobalamine

Figure 2 : Structure chimique de la cobalamine (vitamine B12) et des différentes formes actives.

Chez l'Homme, l'ANC de la vitamine B12 est de 3 µg/j en moyenne **(Tableau 2)**, mais les stocks corporels étant très importants (~ 2-4 mg) et stables (notamment du fait du recyclage entérohépatique), une déficience nécessite plusieurs années pour s'établir. L'absence ou la diminution de la synthèse du facteur intrinsèque (FI), une protéine essentielle à l'absorption intestinale de la vitamine B12, est une cause de carence du fait de la malabsorption de la vitamine. Une des premières conséquences de ce type de carence est une anémie pernicieuse,

laquelle est souvent associée à d'autres signes cliniques comme des lésions neurologiques, des pertes d'appétit, des défauts de croissance et une faiblesse musculaire.

Tableau 2 : Les ANC de la vitamine B12.

Catégories	**ANC (µg/j)**
Nourrissons	0,3 à 0,5
Enfants de 1 à 12 ans	0,7 à 3,0
Adolescents et adultes	3,0
Femmes enceintes ou allaitantes et personnes âgées	4,0

D'après l'Agence Nationale de sécurité sanitaire (ANSES), 2012
http://www.anses.fr/index.htm

I. 1. 2. 1. Absorption intestinale

Dans les aliments, la vitamine B12 est liée à des protéines et sa biodisponibilité a été évaluée à environ 50% des ANC (Shane, 2008). Dans l'estomac, les cobalamines alimentaires sont libérées des complexes protéiques grâce à l'action de l'acidité et de la sécrétion gastriques (HCl et pepsine), pour ensuite se lier aux protéines R salivaires. Dans le duodénum, l'action des protéases pancréatiques permet à nouveau leur libération, avant leur association avec le FI, une glycoprotéine synthétisée par les cellules pariétales gastriques sous l'action du bol alimentaire. La cubiline est le récepteur du complexe FI-vitamine B12 (FI-B12) indispensable à l'absorption physiologique de cette vitamine dans l'iléon. En effet, une fois fixé à son récepteur au niveau de l'iléon, le complexe FI-B12 peut traverser la paroi du tube digestif par endocytose, entraînant sa dissociation et la dégradation entérocytaire du FI et permettant le passage de la vitamine B12 dans le sang. Le processus d'absorption dans l'intestin prendrait environ 3 à 4h (Le Grusse, 1993; Shane, 2008) **(Figure 3)**.

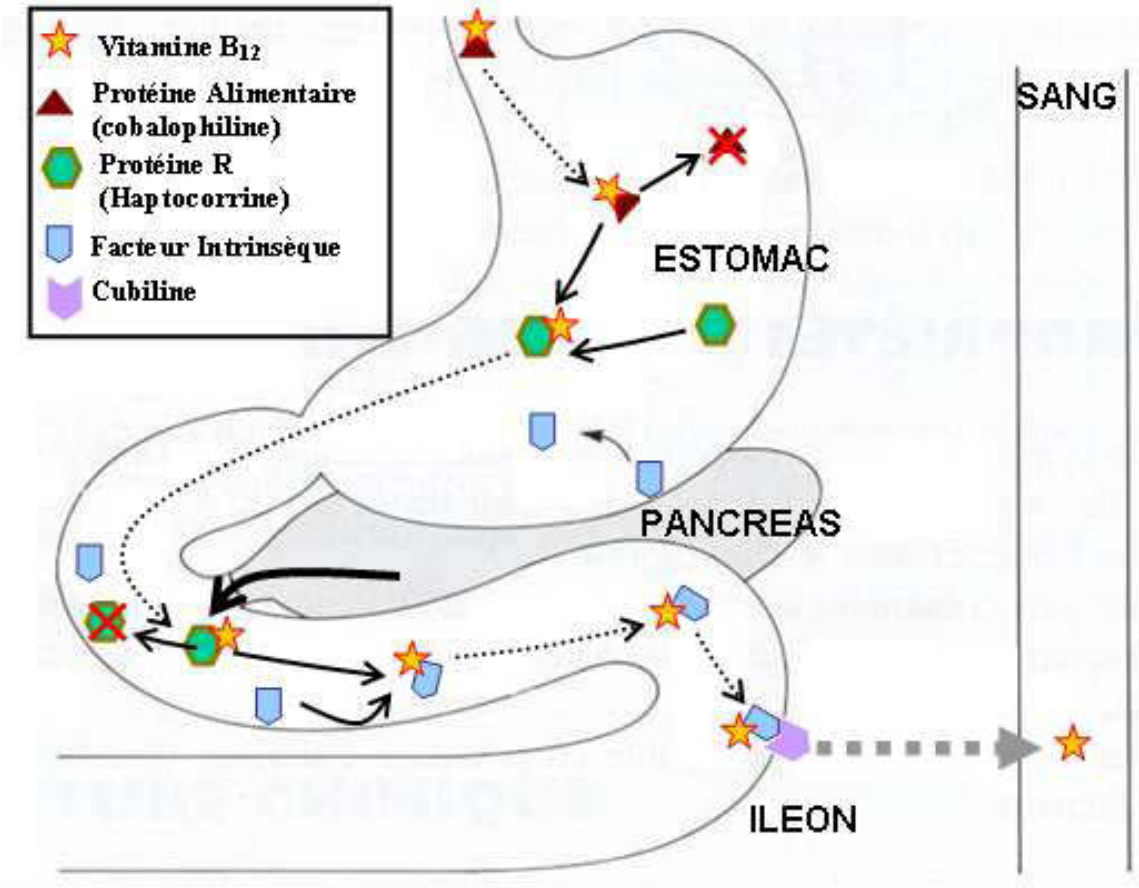


Figure 3 : Mécanismes d'absorption de la vitamine B12. *D'après Le Grusse et al., 1993*

I. 1. 2. 2. Vitamine B12 dans le sang

Dans le sang, elle est sous une forme liée aux transcobalamines (TC) I, II et III. La TC II est spécifique de la vitamine B12 tandis que les TC I et III peuvent également lier des molécules analogues. Les analogues de la cobalamine sont produits par des microbes *via* des interactions chimiques avec la cobalamine naturelle ou avec ses métabolites. La TC I est aussi appelé haptocorrine. Le complexe TC II-cobalamine est appelé holotranscobalamine (HoloTC). Elle représente 20-30% de la vitamine B12 et la mesure de sa concentration circulante est utilisée pour diagnostiquer une déficience (Fragasso *et al.*, 2012). Le complexe vitamine B12-TC se fixe par sa partie protéique à un récepteur membranaire spécifique et pénètre ainsi dans la cellule.

I. 1. 2. 3. Vitamine B12 cellulaire

La partie protéique du complexe B12-TC est dégradée dans le lysosome et la vitamine B12 est libérée. Dans le cytosol, la vitamine B12 liée à la TC, qui est sous forme d'hydroxocobalamine est réduite en cobalamine. Elle est ensuite transformée soit en

méthylcobalamine, le cofacteur de la reméthylation de l'Hcy, soit en 5'-déoxyadénosylcobalamine au niveau des mitochondries, qui joue un rôle dans la conversion du méthylmalonyl-coenzyme A en succinyl-coenzyme A. La réduction en 5'-déoxyadénosylcobalamine dans la mitochondrie est catalysée par la déoxyadénosyltransférase.
Le principal organe de stockage est le foie qui en contiendrait 2 à 3 mg chez l'Homme.

I. 1. 2. 4. Catabolisme de la vitamine B12

La principale voie d'élimination de la vitamine B12 est l'excrétion biliaire. Une majeure partie de cette excrétion étant toutefois réabsorbée au niveau de l'iléon (cycle entérohépatique des cobalamines). Son élimination urinaire est par contre très faible.

I. 1. 3. La choline et la bétaine

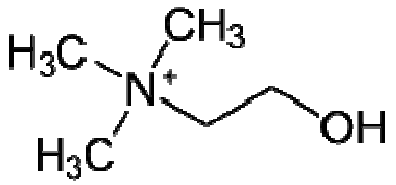
La choline a été reconnue officiellement en 1998 comme un nutriment essentiel par l'Institut de Médecine américain (IOM) qui recommande des consommations de 550 mg/j pour les hommes et 425 mg/j pour les femmes **(Tableau 3)** (Food and Nutrition Board, 1998).

Tableau 3 : Les apports nutritionnels conseillés (ANC) et sources alimentaires de la choline et de la bétaine.

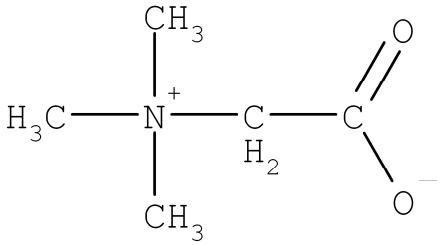
Nom	ANC*	Sources alimentaires
Choline	500 mg/j	jaune d'œuf, foie, viande et poisson, légumineuses et noix
Bétaine	ND	poissons, produits de la mer et betteraves

** Valeurs moyennes. Les besoins peuvent varier selon l'âge, la taille, le sexe, l'activité sportive, les conditions physiologiques (grossesse, allaitement et croissance) et pathologiques*
ND : Non déterminé

La choline et la bétaine, présentes dans l'organisme, proviennent de l'alimentation et de leur synthèse *de novo* dans les tissus **(Tableau 3 et Figure 4)**. La phosphatidylcholine, qui est un phospholipide, représente 95% du pool total de choline dans les tissus des mammifères (Ueland, 2011). Les 5% restant incluent la choline libre, la phosphocholine, la glycérophosphocholine et l'acétylcholine (ACh).



Choline



Bétaine

Figure 4 : Structures chimiques de la choline et de la bétaine.

I. 1. 3. 1. Absorption de la choline

La phosphatidylcholine, apportée par les aliments, est hydrolysée en choline libre par des enzymes pancréatiques. Après absorption, celle-ci est transportée jusqu'au foie *via* la veine porte (Buchman, 2009) **(Figure 5)**.

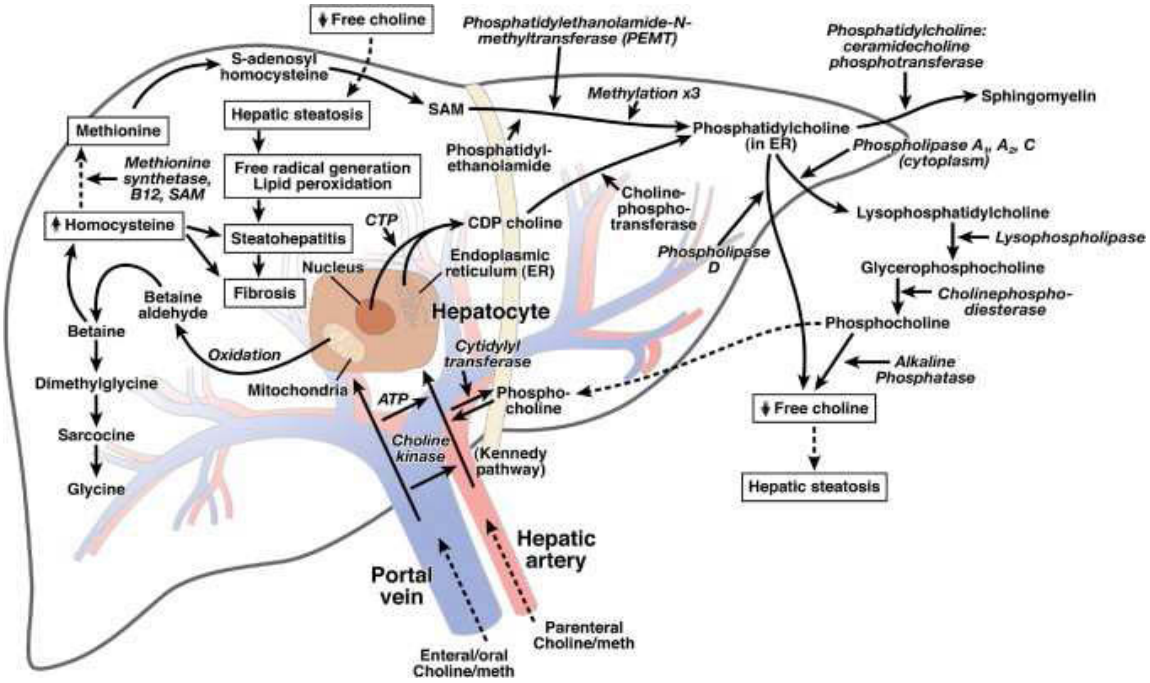


Figure 5 : Absorption et métabolisme hépatique de la choline. *D'après Buchman et al., 2009*

I. 1. 3. 2. La choline cellulaire :

Dès son entrée dans les cellules hépatiques et rénales, la choline est soit phosphorylée en phosphocholine, soit oxydée en bétaine (Li *et al.*, 2008). Plus précisément, la synthèse de la bétaine, un dérivé d'acide aminé, s'effectue dans la mitochondrie et nécessite tout d'abord la conversion de la choline en bétaine aldéhyde par la choline oxydase, puis la transformation de

cet intermédiaire en bétaine par la bétaine aldéhyde déshydrogénase. La bétaine ne peut être reconvertie en choline. Elle sert d'osmolyte dans la cellule et de substrat pour la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT) qui peut également catalyser la reméthylation de l'Hcy en L-méthionine dans le foie et le rein.

La synthèse *de novo* de phosphatidylcholine s'effectue à partir de la phosphatidyléthanolamine, *via* une réaction catalysée par la phosphatidyléthanolamine N-methyltransférase (PEMT) qui utilise la S-adenosylméthionine (SAM) comme donneur intracellulaire de méthyle. La synthèse hépatique *de novo* de choline constitue une meilleure source de choline que l'apport alimentaire (Ueland, 2011).

L'acétylcholine est synthétisée dans les mitochondries du neurone à partir de l'acétylcoenzyme A et de la choline grâce à la choline acétyltransférase. Cependant, la choline n'est pas synthétisée dans le système nerveux. De ce fait, son captage est une étape limitante de la formation de l'acétylcholine.

I. 2. Sources d'apport en PDM

Folates **(Tableau 4)** *:* Chez l'Homme en bonne santé, les folates sont normalement apportés en quantité suffisante par les aliments : par ordre décroissant d'abondance, les légumes verts (épinards, salades) et secs (lentilles, haricots), les céréales entières, certains fruits (agrumes, fruits rouges), des fromages (surtout ceux de type bleu), les œufs, les levures ou encore les abats comme le foie. La cuisson et les différents processus de transformation industriels diminuent La teneur en folates des aliments, principalement du fait de leur instabilité à la chaleur.

Produits animaux	Produits végétaux	µg/100 g
levure		3900
foie de volaille et foie gras		500-700
	haricot blanc, farine de soja, germes de blé	250-350
	lentilles, cresson, cerfeuil, épinard, pissenlit	180-250
pâté de campagne, brie, fromage de chèvre, jaune d'œuf cru	persil frais, mâche, noix, céréales au son	130-170
	noisette, pistache, melon, cacahuète, pois chiche cuit	100-110
rognon de bœuf, de veau, d'agneaux cuits	laitue, chou fleur cru, farine de seigle	70-90
viandes, poissons	agrumes, kiwi, fruits rouges, pomme, pomme de terre	<50

Tableau 4 : Sources alimentaires des folates.

D'après l'Agence Nationale de sécurité sanitaire (ANSES), 2012

http://www.anses.fr/index.htm

Vitamine B12 : Elle est exclusivement présente dans les aliments d'origine animale. On la retrouve dans les abats (foie, rognons), la viande (mouton, veau, porc), la volaille, le poisson, les crustacés, les produits laitiers, le jaune d'œuf et la levure alimentaire. Différentes espèces bactériennes présentes dans le tractus digestif et le rumen, ainsi que les levures, sont capables de synthétiser la vitamine B12. En revanche, l'Homme est incapable de synthétiser *de novo* la méthylcobalamine. Ses besoins quotidiens en vitamine B12 (2-4 mg/jour chez l'adulte) sont en général bien couverts par ses apports alimentaires. Les réserves corporelles, principalement hépatiques, sont suffisantes pour environ 2 ans.

La *choline* et la *bétaine* apparaissent disponibles dans une variété d'aliments **(Tableau 3)**. Toutefois, les données de la cohorte Framingham montrent qu'elles sont apportées par un nombre limité de sources alimentaires (Cho *et al.*, 2006), principalement la viande rouge, la volaille, le lait et le jaune d'œuf pour la choline; les épinards, les pâtes et le pain (notamment à base de céréales complètes) pour la bétaine. Elles sont aussi présentes dans les noix (choline); et dans les mollusques ainsi que la betterave (bétaine) d'où elle est extraite.

I. 3. Rôles physiologiques des PDM

I. 3. 1. Le cycle de l'homocystéine et de la méthionine

Les folates, la vitamine B12 et la bétaine/choline ont différents rôles dans l'organisme. Toutefois, ces trois molécules participent ensemble à la reméthylation de l'Hcy en méthionine dans le cycle des unités monocarbonées, comme décrit ci-après.

I. 3. 1. 1. L'homocystéine

L'Hcy est un acide aminé soufré, porteur d'un groupement thiol réducteur (HS-CH_2-CH_2-$CH(NH_2)COOH$). L'Hcy n'est pas incorporé à la séquence primaire des protéines contrairement à la méthionine, un autre acide aminé soufré qui lui est indispensable et dont la déficience perturbe la synthèse protéique et entraîne la mort cellulaire. L'Hcy est le substrat de la voie de reméthylation de la méthionine **(Figure 6)**.

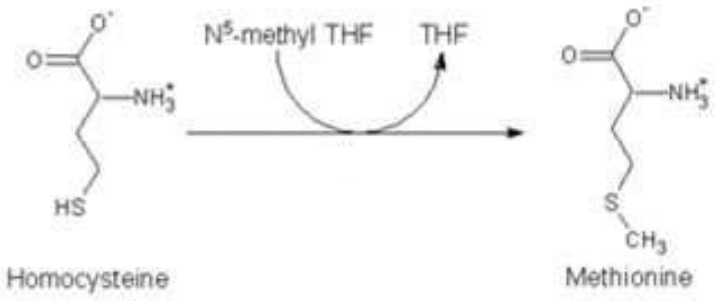


Figure 6 : Reméthylation de l'homocystéine en méthionine.

L'étude SUpplémentation en VItamines et Minéraux Anti-oXydants (SU.VI.MAX) réalisée sur un échantillon de 2070 sujets sains a estimé que la concentration moyenne de l'Hcy totale (tHcy) plasmatique dans la population était de 9 µM chez la femme et de 11 µM chez l'homme (Mennen *et al.*, 2002).

Dans le plasma, l'Hcy n'existe qu'en faible proportion sous sa forme réduite (-SH) libre (1-2% de la tHcy) (Refsum *et al.*, 2004). Par contre, 75 à 80% de la tHcy circulent sous une forme liée à des résidus cystéinyls de l'albumine par des ponts disulfures, les ~ 20% restants étant sous la forme d'homodimères Hcy-Hcy ou d'hétérodimères Hcy-cystéine **(Figure 7)**.

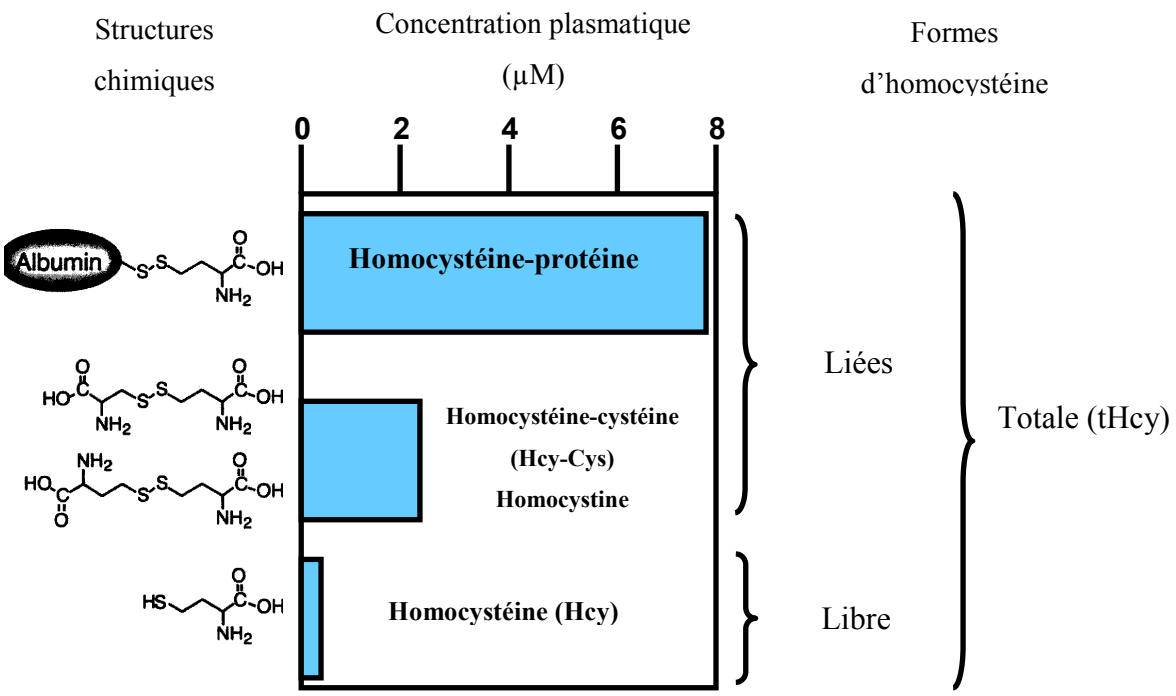


Figure 7 : Les différentes formes d'homocystéine retrouvées dans le plasma. *D'après Refsum et al., 2004*

I. 3. 1. 2. La reméthylation de l'homocystéine

Elle assure la conversion de l'Hcy en méthionine constituant sa voie métabolique principale dans l'ensemble des tissus de l'organisme. Entre 50 et 80% de l'Hcy générée à partir de la voie de transméthylation seraient reméthylées dépendamment du contenu en protéines (méthionine) et en choline du régime alimentaire *(Cf. § I.3.2. p19)*.

L'Hcy peut être convertie en méthionine grâce à l'action de différentes enzymes : **(Figure 8)**

- La méthionine synthétase (MS) :

Elle permet le transfert d'un méthyle du 5-MTHF à l'Hcy pour former la méthionine, avec libération de THF (Ohrvik *et al.*, 2011). La forme méthylée de la vitamine B12, la méthylcobalamine, est impliquée dans la réaction comme coenzyme de la MS. Le cycle des folates est donc lié au métabolisme des acides aminés soufrés. Il contribue notamment à la conversion de l'AF en 5-MTHF *via* différentes étapes avec le THF comme intermédiaire. Les 2 dernières réactions mettent en jeu la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) et la N5,10-méthylèneTHF réductase (MTHFR) dont les cofacteurs sont respectivement le phosphate de pyridoxal (vitamine B6) et la flavine adénine dinucléotide réduite, $FADH_2$ (vitamine B2).

✔ La BHMT :

Cette enzyme peut aussi transférer un méthyle à l'Hcy par déméthylation de la bétaine, un métabolite de la choline. La BHMT n'est toutefois exprimée significativement que dans les cellules hépatiques et rénales. En cas de déficience en folates, la voie de la BHMT permet une synthèse de méthionine afin de maintenir un niveau suffisant de SAM dans ces tissus.

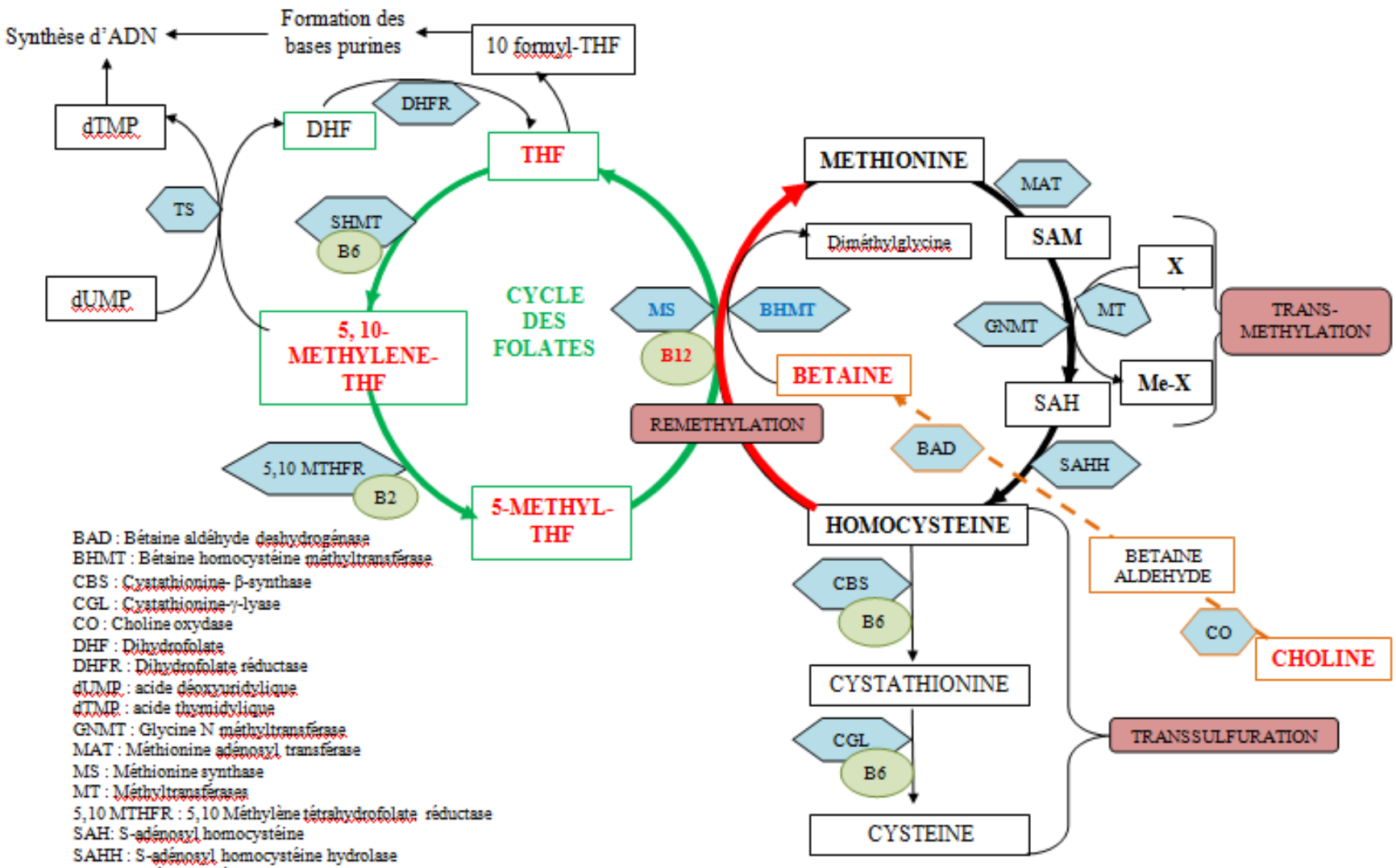
I. 3. 1. 3. La transméthylation de la méthionine

La méthionine est activée en SAM par la méthionine adénosyltransférase (MAT). La SAM est le donneur de méthyles de la plupart des réactions de méthylation intracellulaires, sur des substrats accepteurs tels que l'ADN, l'ARN ou encore des neurotransmetteurs. Au cours de ces réactions, la SAM est transformée en S-adénosylhomocystéine (SAH), laquelle est ensuite hydrolysée en Hcy et adénosine par la SAH hydrolase (SAHH). L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible.

Les études de la régulation du métabolisme de l'Hcy ont montré que l'orientation des flux d'Hcy vers la voie de la reméthylation ou de la transsulfuration *(Cf. § I.3.2. p19)* est sous le contrôle des concentrations cellulaires de méthionine et SAM disponibles.

I. 3. 1. 4. La transsulfuration de l'Hcy

Cette voie qui existe principalement au niveau du foie permet le catabolisme intracellulaire de l'Hcy (Mato *et al.*, 2008). La première étape est catalysée par la cystathionine-β-synthase (CBS) en générant la cystathionine à partir de l'Hcy et de la sérine. Au cours de la seconde étape, la cystathionine est scindée en cystéine, un précurseur du glutathion, par l'action de la cystathionine-γ–lyase. La vitamine B6, sous sa forme activée du phosphate de pyridoxal, est le coenzyme de ces 2 réactions. Ces 2 enzymes ont également la possibilité de générer de l'hydrogène sulfuré (H_2S) dans les tissus artériels et veineux (Tyagi *et al.*, 2009).



BAD : Bétaine aldéhyde deshydrogénase
BHMT : Bétaine homocystéine méthyltransférase
CBS : Cystathionine- β-synthase
CGL : Cystathionine-γ-lyase
CO : Choline oxydase
DHF : Dihydrofolate
DHFR : Dihydrofolate réductase
dUMP : acide déoxyuridylique
dTMP : acide thymidylique
GNMT : Glycine N méthyltransférase
MAT : Méthionine adénosyl transférase
MS : Méthionine synthase
MT : Méthyltransférases
5,10 MTHFR : 5,10 Méthylène tétrahydrofolate réductase
SAH: S-adénosyl homocystéine
SAHH : S-adénosyl homocystéine hydrolase
SAM: S-adénosyl méthionine
SHMT: Sérine hydroxyméthyltransférase
THF : Tétrahydrofolate
TS : Thymidylate synthase

Figure 8 : Cycle de l'homocystéine et de la méthionine.

I. 3. 2. Régulation nutritionnelle du cycle de l'Hcy et de la méthionine.

La méthionine est un acide aminé dit « essentiel ». Toutefois, le cycle de l'Hcy-méthionine permet, en plus de l'alimentation, de synthétiser de la méthionine dès lors que l'organisme en a besoin. La SAM est synthétisée à partir de méthionine et d'ATP par la MAT dont il existe 3 isoformes : MAT I, II et III. Elle constitue le substrat d'une variété de méthyltransférases telles que les ADN méthyltransférases et les histones méthyltransférases. Le rapport SAM/SAH est fréquemment utilisé comme indicateur de la capacité de méthylation.

Avec une alimentation normale et équilibrée, le métabolisme de l'Hcy chez des sujets sains se divise équitablement entre les voies de transsulfuration et de reméthylation. Lorsque l'apport en méthionine est normal, la molécule d'Hcy est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de transsulfuration (Guilland *et al.*, 2003a, b). Lorsque l'apport en méthionine augmente, l'Hcy se dirige vers la voie de transsulfuration. L'organisme a donc la capacité d'adapter l'utilisation de l'Hcy en fonction de l'apport en méthionine. Ceci implique l'existence d'une régulation commune aux deux voies. Elle se fait par la SAM qui, en fonction de sa concentration, peut inhiber ou non la MTHFR, orientant ainsi l'Hcy vers la voie de transsulfuration ou de reméthylation. Lorsque l'apport en méthionine est élevé, il va en résulter une augmentation de la concentration intracellulaire de SAM ce qui inhibe la MTHFR et active la CBS et donc la transsulfuration (Mato *et al.*, 2008). À l'opposé, lorsque l'apport en méthionine est faible, la concentration en SAM n'est pas suffisante pour inhiber la MTHFR (Fenech, 2012). La voie de reméthylation est alors favorisée et la CBS n'est pas stimulée.

I. 3. 3. Autres rôles des PDM

I. 3. 3. 1. Les folates

Outre leur rôle central dans la reméthylation de l'Hcy en méthionine, les folates sont des transporteurs d'unités monocarbonées essentiels à la réplication de l'ADN et la multiplication cellulaire, *via* la conversion du THF **(Figure 9)** :

en 5,10-méthylène-THF catalysée par la SHMT avec la sérine comme donneur de méthyle. Le 5,10-méthylène-THF peut être utilisé par la thymidylate synthase (TS) pour la synthèse de l'acide thymidylique (TMP) par transfert de son groupement $-CH_2$ sur l'acide déoxyuridylique

(dUMP). L'autre produit de la réaction est le dihydrofolate (DHF) qui peut être régénéré en THF par la DHFR;

en 10-formyl-THF (10-CHO-THF) utilisé comme donneur de groupements monocarbonés dans la synthèse des purines.

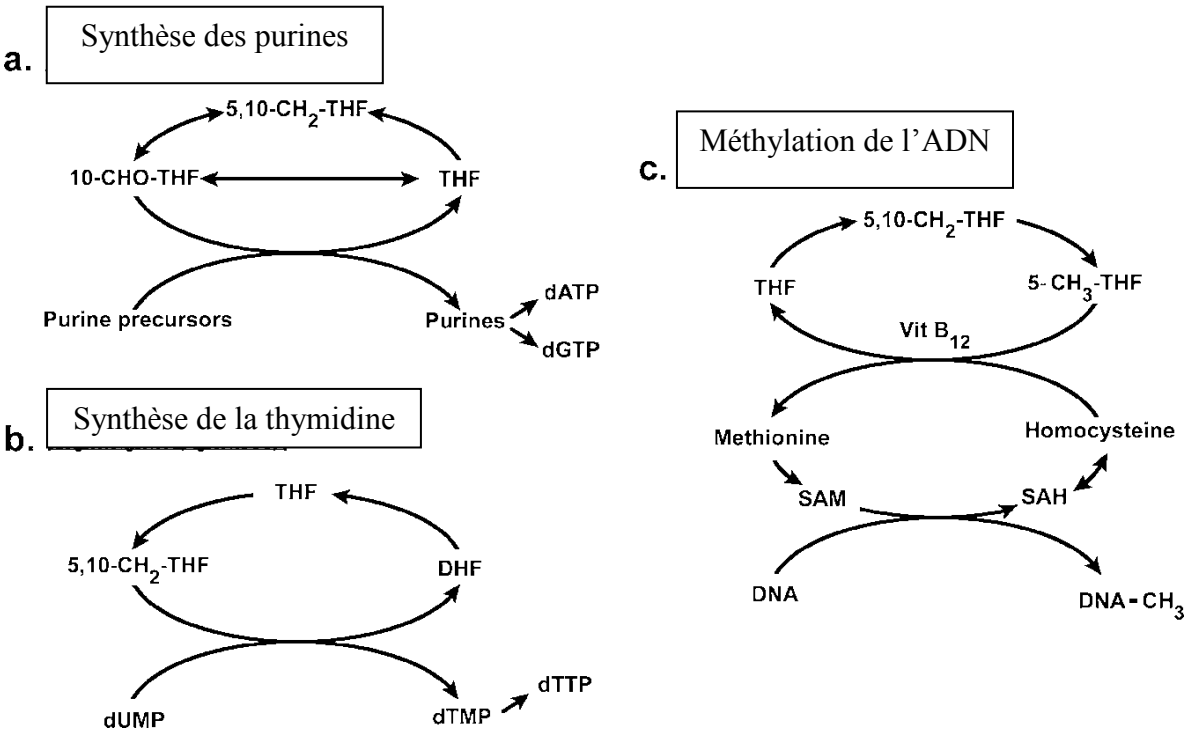


Figure 9 : Implication des folates dans différentes réactions métaboliques. *Adapté de Koury et al., 2004*

I. 3. 3. 2. La vitamine B12

En plus du rôle de la méthylcobalamine comme coenzyme de la MS, la vitamine B12 est cofacteur de la réaction catalysée par la méthylmalonyl CoA mutase mitochondriale sous la forme de 5-déoxyadénosylcobalamine. Cette réaction permet la conversion de l'acide méthylmalonique (MMA) en succinyl-CoA. Il a été montré qu'une augmentation de la concentration circulante du MMA est révélatrice d'une déficience en vitamine B12 (Bailey *et al.*, 2011). Le succinyl-CoA participe au cycle de Krebs et est essentiel à la synthèse de l'hémoglobine ainsi qu'au métabolisme des lipides et des protéines.

La vitamine B12 est donc indispensable à la multiplication cellulaire, plus particulièrement pour les cellules à renouvellement rapide comme les cellules hématopoïétiques (à l'origine de

toutes les cellules sanguines : globules rouges ou érythrocytes, globules blancs ou leucocytes et plaquettes). La déficience en vitamine B12 de même qu'en folates, entraîne l'apparition d'une anémie mégaloblastique caractérisée par l'altération de la synthèse d'ADN dans les cellules érythropoïétiques (*Cf. encadré : « anémie mégaloblastique »**).

***L'anémie mégaloblastique :** L'érythropoïèse est le processus permettant la formation de nouveaux érythrocytes. Les folates, ainsi que la vitamine B12, contribuent à la synthèse de l'ADN nécessaire à la prolifération et la différenciation des érythroblastes (Koury and Ponka 2004) . Lorsque les purines et pyrimidines constitutives des acides nucléiques sont en quantité insuffisante, ces cellules ne peuvent plus se diviser mais continuent à grossir. Une carence en folates peut ainsi contribuer à la génération de cellules mégaloblastiques contenant un ADN partiellement fragmenté, et 2 fois plus abondant que la normale. Dans ce cas, la synthèse de thymidylate est altérée et contribue à une incorporation anormale d'uracile dans l'ADN. La carence en vitamine B12 résulte en une anémie mégaloblastique similaire, dénommée anémie pernicieuse de Biermer. Elle est plus fréquente chez la personne âgée car elle s'installe très progressivement dans le temps du fait de la grande réserve corporelle de vitamine B12. Une des causes de cette maladie est la malabsorption de la vitamine du fait d'un défaut de production du facteur intrinsèque (FI). Ses effets sont similaires à ceux de l'anémie causée par une déficience en folates. Ceci s'explique par l'interrelation existante entre les folates et la méthylcobalamine au niveau de la reméthylation de la méthionine.

I. 3. 3. 3. La choline

La choline est aussi le constituant de base de la sphingomyéline, de la phosphatidylcholine et de l'ACh. Ce dernier est un neurotransmetteur important dans le processus de la mémoire et le contrôle de l'activité musculaire par le système nerveux périphérique. La phosphatidylcholine constitue plus de 50% des lipides présents dans les membranes cellulaires (Zeisel, 2006).

II. DEFICIENCE EN PRECURSEURS DE METHYLES ET HYPERHOMOCYSTEINEMIE (HHcy)

Les origines des déficiences en PDM sont diverses. Elles peuvent être dues à des apports alimentaires insuffisants ou à de besoins plus élevés en PDM, par ex. lors de la grossesse. Elles peuvent aussi être induites par la consommation d'alcool et de tabac, ainsi que la prise de certains médicaments. Elles sont détectables par le biais de la mesure de marqueurs spécifiques, tel le 5-MTHF plasmatique ou indirectement par l'homocystéinémie.

II. 1. La déficience en PDM

II. 1. 1. Les origines de la déficience en PDM

Les folates et la cobalamine sont des vitamines; elles sont donc indispensables à la vie et doivent être apportées par l'alimentation.

Pour rappel, la vitamine B12 est retrouvée seulement dans les aliments d'origine animale. Son apport est donc directement dépendant de la consommation de viandes, laitages, œufs poissons, fromages, etc. Ainsi, les personnes consommant des régimes végétariens (exclusion de toutes chairs animales : viande, poisson, crustacés), végétaliens (exclusion des chairs et des produits animaux : œuf, lait..) ou pauvres en viandes ont un risque accru de déficience en cette vitamine. Cette vitamine étant réabsorbée *via* la circulation entérohépatique, il faudrait 20 à 30 ans pour en épuiser les réserves après passage à un régime végétarien (Herbert, 1994). De ce fait, l'insuffisance de l'apport alimentaire est rarement la cause de déficience en cobalamine. En revanche, certains groupes de population ont un risque plus élevé de développer une carence. Ainsi, le foie des nouveaux nés ne contiendrait que 25 à 30 µg de vitamine B12 (Allen, 2009). Les enfants nés de mères déficientes ont donc un risque important d'être eux aussi déficients (Koc *et al.*, 2006). Chez la personne âgée, l'apport alimentaire en vitamine B12 est souvent insuffisant et les problèmes de malabsorption intestinale liée à l'âge contribuent à augmenter le risque de déficience **(Figure 10)** (Andres *et al.*, 2008). Une des causes de malabsorption de la vitamine B12 est le déficit en FI ou l'achlorhydrie gastrique (absence d'acide chlorhydrique, essentiel pour la digestion, dans le liquide gastrique). Des patients ayant un défaut de production du FI, retrouvé dans le cas de la maladie de Biermer, ne peuvent absorber la vitamine B12 (Banka *et al.*, 2011). Dans ce cas, la déficience peut s'installer très rapidement en 1 à 3 ans (Herbert, 1994). Les infections bactériennes, la gastrectomie ou la prise de médicaments, notamment pour traiter des

pathologies gastriques (ulcères, reflux gastroesophagique), peuvent également altérer le statut en vitamine B12 (Allen, 2008). La méta-analyse de Lahner *et al.* (2012), regroupant 14 études de patients porteurs de *Helicobacter pylori*, a montré que les infections par cette bactérie sont associées à des concentrations plasmatiques de cobalamine faibles et que leur traitement améliore significativement le statut en cobalamine (Lahner *et al.*, 2012). En revanche, la même étude indiquait que le traitement n'affectait pas le statut en folates des patients malgré un niveau en dessous de la normale du fait de l'infection.

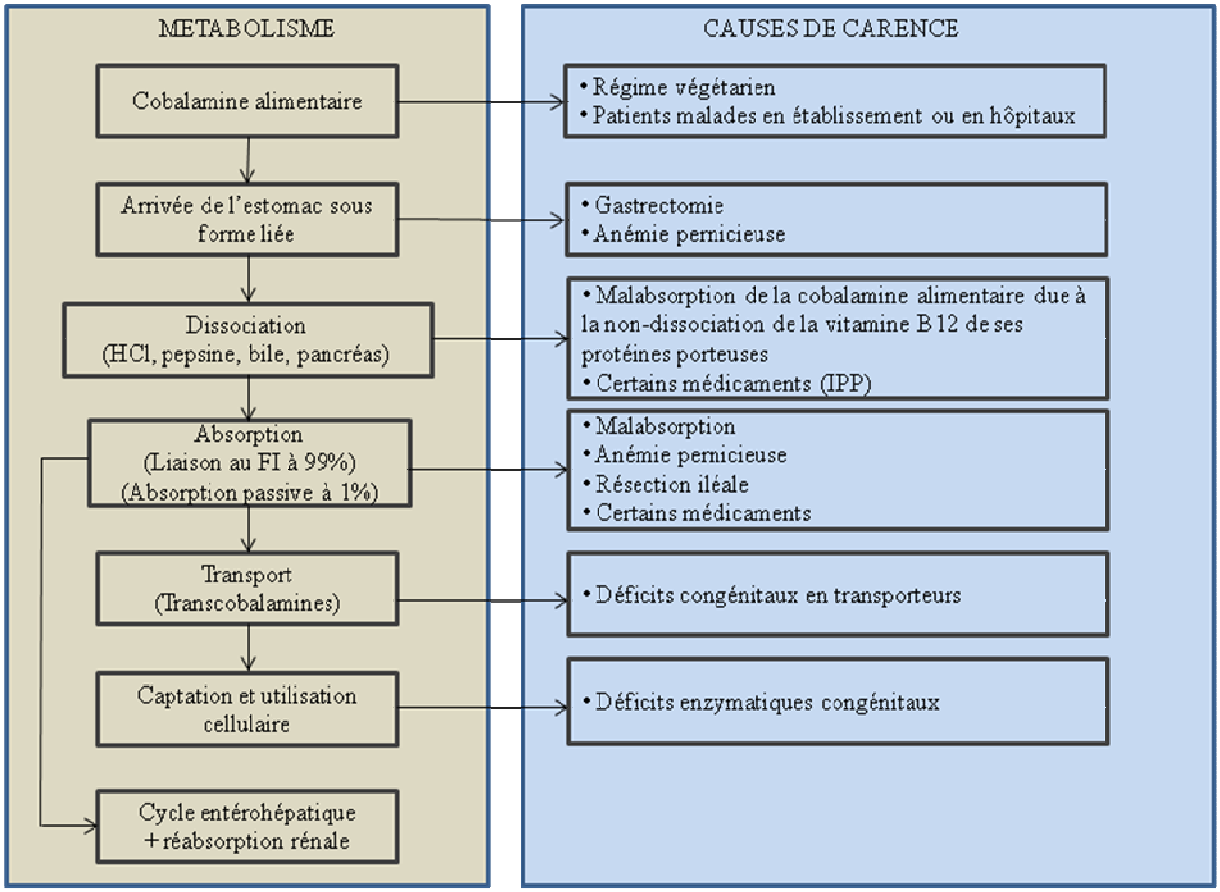
Des déficiences nutritionnelles en folates sont observées chez des personnes consommant insuffisamment des fruits et légumes ou encore chez des personnes dont les besoins sont augmentés. C'est notamment pour cette dernière raison que les ANC en folates ont été relevés à 400 µg/j chez la femme enceinte. Une supplémentation en AF est recommandée le plus précocement pendant la grossesse, voire même avant le début de la grossesse envisagée, afin de réduire les risques de malformations congénitales chez le fœtus *(Cf. § II.3.1. p28)*.

Les déficiences en vitamines B12 ou B9 peuvent aussi être d'origine génétique. Des polymorphismes ont été mis en évidence pour le gène codant pour le transporteur, la TC II. Ainsi, le polymorphisme 776C→G de la TC II (substitution d'un résidu proline par une arginine au niveau du codon 259) a été associé au statut en vitamine B12 : les individus homozygotes CC pour ce gène ont des concentrations circulantes de vitamines B12 plus faibles que les hétérozygotes CG et les homozygotes GG (Stanislawska-Sachadyn *et al.*, 2010). Ce polymorphisme est aussi associé à une augmentation de la concentration plasmatique de MMA d'après une étude réalisée dans une population de personnes âgées (Miller *et al.*, 2002). Cependant, une autre étude portant sur plus de 10000 hommes et femmes âgés en moyenne de 56 ans ne montrait aucune corrélation entre ce polymorphisme et les niveaux circulants de MMA mais montrait, en revanche, une association avec le polymorphisme TC II 67A→G (substitution d'une isoleucine par une valine au niveau du codon 23) (Fredriksen *et al.*, 2007).

Concernant les folates, 2 variants alléliques sont relativement fréquents dans la population générale dans le cas des polymorphismes C677T et A1298C de la MTHFR. Le premier polymorphisme qui est le plus commun, provient de la substitution de la cytosine en position 677 par une thymidine. Cette mutation se traduit par le remplacement d'une valine par une alanine dans la structure protéique de l'enzyme, avec comme conséquence une diminution de l'activité MTHFR. La fréquence du variant homozygote est variable, allant de 0 à 2% chez certaines populations asiatiques et africaines, et chez les Inuits du Canada, à 10% dans la

population caucasienne, et à plus de 20% chez les italiens du Nord. Ces polymorphismes altèrent l'activité de la MTHFR, surtout chez les homozygotes. Il en résulte une diminution de la disponibilité cellulaire du 5-MTHF qui est accentuée lorsque les apports alimentaires en folates sont insuffisants. Un polymorphisme (C1561T) a également été mis en évidence pour le gène codant la ptéroylglutamate hydrolase (qui catalyse l'hydrolyse des folates polyglutamates) : il se traduit par une réduction de l'activité de cette enzyme *in vitro*, mais son impact serait limité car il ne semble être présent que chez 0,5% de la population générale (Allen, 2008). Le statut en folates peut aussi être altéré par d'autres facteurs liés au mode de vie, comme la consommation d'alcool et de tabac.

Très rare, la carence en choline peut survenir chez des personnes alimentées par voie parentérale pendant de longues périodes (Buchman, 2009). C'est pourquoi elle est ajoutée aux solutions ainsi administrées.



HCl : acide chlorydrique, IPP : inhibiteur de la pompe à protons, FI : facteur intrinsèque

Figure 10 : Les causes de carence en B12 aux différentes étapes du métabolisme de la cobalamine. *D'après Andres et al., 2008*

II. 1. 2. Conséquences de la carence en PDM : l'hyperhomocystéinémie

Les PDM intervenant dans la reméthylation de l'Hcy en méthionine, une déficience en PDM altère cette voie et entraîne une augmentation de la production d'Hcy. Cette dernière, synthétisée dans la cellule, est rapidement exportée dans la circulation sanguine, ce qui provoque une augmentation de la concentration d'Hcy plasmatique donnant naissance à un état d'hyperhomocystéinémie (HHcy). L'HHcy est définie par une concentration de tHcy dans le plasma supérieure à 15 µM. On distingue l'HHcy modérée (15 < [tHcy] ≤ 30 µM) de ses formes intermédiaires (31 < [tHcy] ≤ 100 µM) et sévères ([tHcy] > 100 µM). La prévalence de l'HHcy varie entre 5 et 20% dans la population générale (Hornberger, 1998).

La déficience en vitamine B12 est aussi associée à une HHcy (Satyanarayana *et al.*, 2011). La choline et la bétaine alimentaires contribuent également à la régulation de l'homocystéinémie (Lee *et al.*, 2010). Il a été notamment montré qu'une déficience nutritionnelle en choline chez la souris entraîne une HHcy modérée (da Costa *et al.*, 2005). De plus, une augmentation de leur apport peut diminuer jusqu'à la normale, la concentration plasmatique d'Hcy, indépendamment des autres déterminants vitaminiques.

Autres causes d'hyperhomocystéinémie:

Des prédispositions génétiques affectant le métabolisme des PDM peuvent conduire à une HHcy. Il existe en effet des polymorphismes de gènes codant pour des enzymes du cycle des folates et de la reméthylation de l'Hcy (Garcia-Pinilla *et al.*, 2007). Ils sont la conséquence de mutations uniques de type « single nucleotide polymorphism » ou SNP :

- Le polymorphisme C677T de MTHFR diminue la disponibilité du 5-MTHF pour la reméthylation de l'Hcy (Narayanan *et al.*, 2004). En diminuant la disponibilité cellulaire des folates, le polymorphisme de la MTHFR peut générer une HHcy modérée ou intermédiaire particulièrement lorsque les apports en cette vitamine sont insuffisants.
- Par ailleurs, en bloquant le catabolisme de l'Hcy par la voie de transsulfuration, des polymorphismes du gène codant pour la CBS peuvent être à l'origine de concentrations d'Hcy supérieures à 100 µM dans le plasma des patients homozygotes (Kraus *et al.*, 1999; Yamanishi *et al.*, 2006). Environ une soixantaine de mutations différentes ont été décrites dont les plus communes sont la T833C et la G919A. La maladie génétique rare associée aux polymorphismes, connue depuis 1962, se nomme homocystinurie (accumulation de l'Hcy dans les urines). Ses signes cliniques sont une ectopie cristallinienne (un déplacement

spontané des cristallins), des occlusions vasculaires, une ostéoporose et des altérations neurologiques (Yamanishi *et al.*, 2006).

✔ Des polymorphismes tel que le P1173L, du gène codant pour la MS peuvent aussi induire une HHcy *via* une diminution de la capacité de reméthylation de l'Hcy en méthionine (Watkins *et al.*, 2002).

Cependant il a été aussi démontré que certaines mutations n'altèrent pas le statut en Hcy et pourraient même être associées avec des concentrations basses d'Hcy, tel que le polymorphisme A2756G de la MS (Yakub *et al.*, 2012).

Certaines pathologies (insuffisance rénale, plusieurs types de cancers), de même que la consommation de médicaments que l'on pourrait qualifier d'« antifoliques » (agissant sur un des paramètres clé de la voie des folates) peuvent également contribuer à augmenter la concentration circulante de tHcy (Nygard *et al.*, 1995; Haagsma *et al.*, 1999). Par exemple, le méthotrexate, un inhibiteur de la DHFR, entraîne une diminution de la quantité de THF disponible et donc altère la voie de reméthylation de l'Hcy en méthionine (Haagsma *et al.*, 1999).

Enfin, l'homocystéinémie est plus élevée chez les hommes que chez les femmes et elle augmente avec l'âge (Das *et al.*, 2010). Ces différences seraient liées au type d'alimentation notamment à travers son influence sur le statut vitaminique, ainsi qu'au style de vie. Une activité physique régulière a ainsi été associée à une concentration d'Hcy faible (Refsum *et al.*, 2006). Cependant des études récentes montrent que des activités de courte durée (30 min) ou prolongées (8h/semaine) ne modifient pas les concentrations d'Hcy plasmatiques chez des sportifs (Di Santolo *et al.*, 2009; Venta *et al.*, 2009). Enfin, une HHcy peut également survenir en conséquence de certains modes de vie, ex : consommations excessives d'alcool, de tabac ou encore de café (Nygard *et al.*, 1998; Nurk *et al.*, 2004).

II. 2. Prévalence dans la population (groupes à risque de déficience)

La prévalence est définie par le nombre de cas de maladies ou de personnes malades existant ou survenant dans une population déterminée, sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, soit à un moment précis, soit au cours d'une période donnée.

Les paramètres les plus couramment utilisés pour évaluer les statuts en folates et vitamine B12 sont leurs concentrations sériques ou plasmatiques, érythrocytaires ou encore sanguines (Yetley *et al.*, 2011). Cependant, les méthodes de dosage de ces composés n'étant pas standardisées, des problèmes se posent dans la comparaison des données. Pfeiffer *et al.* (2012)

ont récemment montré que les concentrations de folates plasmatiques et érythrocytaires nécessitaient d'être ajustées du fait des différentes méthodes de mesures utilisées et donc difficilement comparables d'une étude à l'autre (Pfeiffer *et al.*, 2012).

En France, l'Etude Nationale Nutrition Santé (ENNS) de 2006-2007 a montré que la prévalence du déficit en folates plasmatiques (< 3,0 ng/mL) s'élevait en moyenne à 6% chez les hommes et les femmes de 18 à 74 ans. Elle semble diminuer avec l'âge puisqu'elle est de 1,9% chez les hommes de 55-74 ans et de 2,1% chez les femmes ménopausées **(Figure 11)** (Institut de Veille Sanitaire, 2006). Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec l'augmentation de la consommation de fruits et légumes avec l'âge **(Figure 12)**. Les besoins sont augmentés au cours de la grossesse et de l'allaitement. Or, 6,8% des femmes françaises en âge de procréer seraient déficientes en ces vitamines. Ces taux varient d'un pays à l'autre : une étude portant sur 470 femmes Libanaises âgées de 15 à 45 ans montre que 25,1% sont déficientes en folates, 39,4% en vitamine B12 et 12,6% à la fois en folates et en vitamine B12 (Al Khatib *et al.*, 2006) alors que 40% des femmes en âge de procréer en Turquie seraient déficientes en vitamine B12 (Milman, 2011).

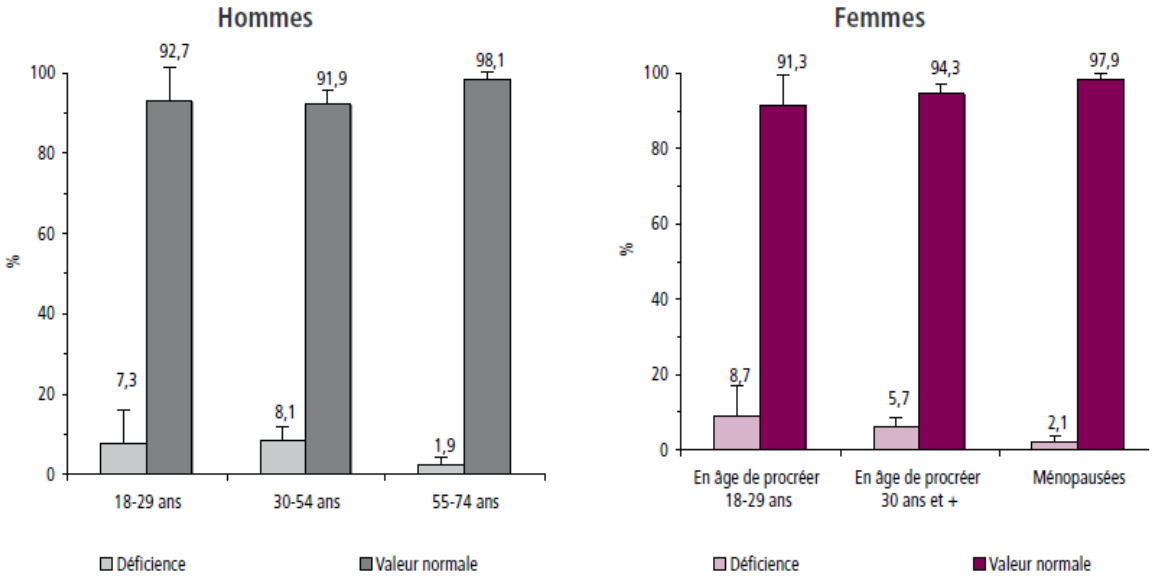


Figure 11 : Taux de déficience en folates dans différents groupes d'âges chez les hommes et les femmes (estimés sur la base de la concentration plasmatique en folates). *D'après l'Institut de Veille Sanitaire, Etude Nationale Nutrition Santé, 2006*

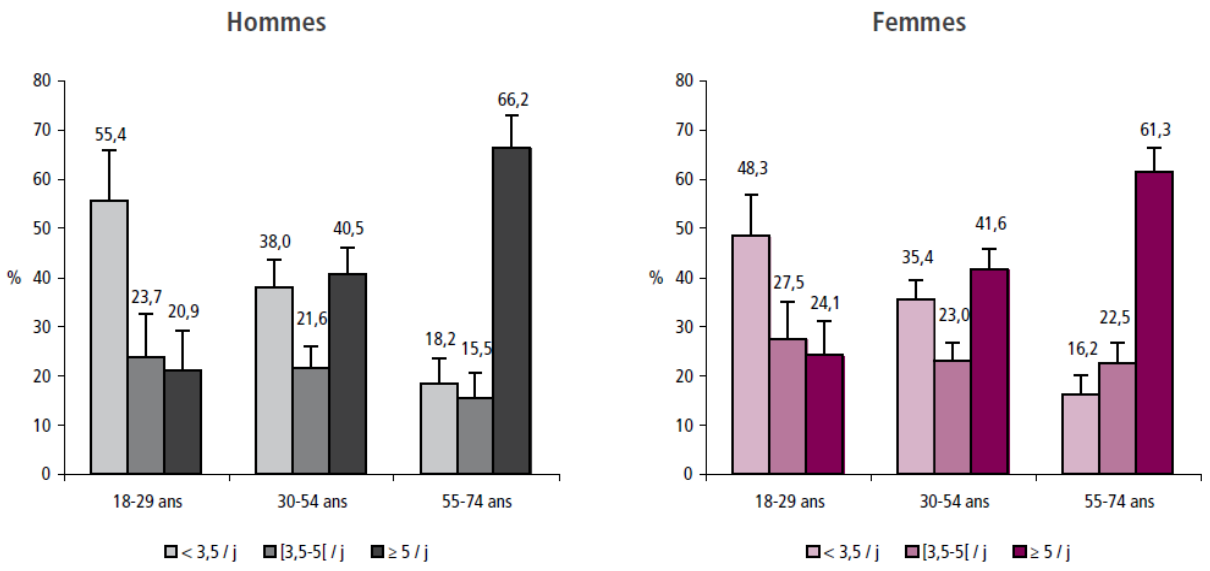


Figure 12 : Distribution des hommes et des femmes de 18-74 ans selon la fréquence quotidienne moyenne de consommation de fruits et légumes et l'âge. *D'après l'Institut de Veille Sanitaire, Etude Nationale Nutrition Santé, 2006*

Une étude récente du réseau d'excellence EURRECA (EURopean micronutrient RECommendations Aligned), en charge de développer des méthodologies afin de normaliser les processus d'établissement des recommandations en micronutriments, a estimé qu'en moyenne 10% (variation de 2,7 à 36,6%) de la population Européenne aurait des apports insuffisants en vitamine B12. Ce niveau est évalué entre 15 et 30% pour les folates. Ces données se basent sur 11 études européennes réalisées dans différents pays (ne comprenant pas la France) et sur des populations adultes (19-64 ans) ou âgées (> 64 ans). Elles soulignent que la déficience en folates ou en vitamine B12 est similaire dans les populations adultes ou âgées (Roman Vinas *et al.*, 2011). Cependant, la déficience en vitamine B12 serait sous-estimée et sous diagnostiquée chez les personnes âgées. Une étude transversale, réalisée en Finlande, a porté spécifiquement sur la prévalence du déficit en vitamine B12 chez 1048 sujets des deux sexes, âgés de 65 à 100 ans. Le déficit était déjà connu chez 27 (2,6%) des participants. La mesure simultanée de plusieurs paramètres, à savoir des concentrations de vitamine B12 sérique totale < 150 pM ou comprise entre 150 et 250 pM, d'HoloTC < 37 mM et d'Hcy > 15 µM, a révélé une prévalence du déficit atteignant 12% (Loikas *et al.*, 2007). Ainsi, dans cette population, 78% des sujets avec une déficience en vitamine B12 n'avaient pas été diagnostiqués. Comme indiqué précédemment, la malabsorption de la cobalamine alimentaire est la principale cause de déficience dans la population âgée, en grande partie du

fait de l'hypochlorhydrie gastrique. La déficience est encore plus fréquente chez les personnes âgées hospitalisées où elle est alors estimée entre 30 et 40% (van Asselt *et al.*, 2000).

Le régime alimentaire est un déterminant important du risque de déficience vitaminique, particulièrement en folates et en vitamine B12. Par exemple, une étude a révélé qu'en Angleterre, les concentrations sériques en vitamine B12 d'hommes végétaliens sont, respectivement, 33% et 57% inférieures à celles d'hommes végétariens et omnivores. Ceci alors que les apports en folates étaient proches des recommandations (estimées à 200 µg/j) chez 96% des omnivores, 99% des végétariens et 98% des végétaliens et que seulement 1% des omnivores étudiés présentaient une déficience en folates (0% chez les végétariens et végétaliens) (Gilsing *et al.*, 2010).

Concernant la choline, 20 à 25% des Américains consommeraient des quantités inférieures aux recommandations (entre 450 et 550 mg/j) (Food and Nutrition Board, 1998). La "Framingham Offspring Cohort" a estimé que les apports moyens étaient de seulement 312 mg/j pour les hommes et 314 mg/j pour les femmes (Cho *et al.*, 2006). L'étude Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) a rapporté des résultats similaires avec toutefois des différences entre les sexes, soit 322 mg/j pour les hommes et 287 mg/j pour les femmes (Bidulescu *et al.*, 2009).

II. 3. Pathologies liées à la déficience en PDM

II. 3. 1. Anomalies de fermeture du tube neural (AFTN)

Le tube neural se ferme normalement entre le 20ème et le 28ème jour après la conception. Les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) sont des anomalies congénitales fréquentes : leur prévalence en France est estimée à 1/1000 grossesses. Les plus fréquentes sont le *spina bifida* et l'anencéphalie **(Figure 13)**.

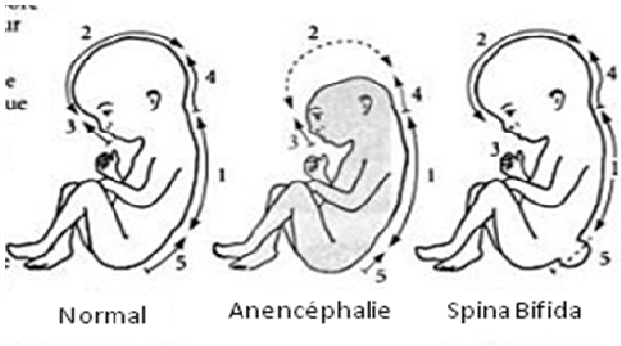


Figure 13 : Les différentes formes de défaut de fermeture du tube neural (AFTN).

Contrairement au *spina bifida*, l'anencéphalie est mortelle et entraîne souvent un avortement spontané. Aujourd'hui il est bien démontré qu'une déficience en folates au cours de la grossesse augmente significativement le risque d'AFTN chez le fœtus (Smithells *et al.*, 1976). De même, des concentrations plasmatiques faibles en vitamine B12 ont été rapportées chez les mères d'enfants atteints d'AFTN (Molloy *et al.*, 2008). De plus, des facteurs génétiques, nutritionnels et environnementaux joueraient un rôle dans le développement de cette pathologie (Blom *et al.*, 2006). Ce n'est que récemment qu'une association a été montrée entre une diminution de la biodisponibilité fœtale de la choline et la survenue d'AFTN chez la souris et l'Homme (Fisher *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2004). Durant la grossesse, d'importantes quantités de choline sont délivrées au fœtus à travers le placenta. Les concentrations de choline du fœtus seraient ainsi très supérieures à celles de la mère et diminueraient dès la naissance pour atteindre rapidement chez le nouveau-né des concentrations similaires à celle de l'adulte (Ueland, 2011). Comme pour les folates, une déficience en choline pourrait affecter la méthylation globale de l'ADN, ainsi que l'équilibre prolifération/apoptose des cellules souches du cerveau (Zeisel, 2006).

L'effet préventif des folates sur les AFTN est aujourd'hui bien montré. Par exemple, une étude randomisée, en double aveugle a montré qu'une supplémentation maternelle de 4 mg/j d'AF durant la période péri-conceptionelle permet de diminuer par 3 le risque de récidive d'une AFTN chez le fœtus (Vitamin Study Research Group, 1991). Plus largement, une méta-analyse a associé la supplémentation et l'enrichissement des aliments en AF avec une diminution de 35 à 75% du risque de survenue d'une AFTN (Blencowe *et al.*, 2010). Ce résultat a confirmé les observations d'un grand nombre d'études antérieures, à l'origine de la politique d'enrichissement d'aliments en AF qui a été décidée dans certains pays *(Cf. § II.4. p30)*.

II. 3. 2. La stéatose hépatique

La stéatose hépatique est une pathologie caractérisée par l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. Elle est souvent retrouvée chez les personnes diabétiques, obèses ou encore alcooliques. Le métabolisme des unités monocarbonées jouerait un rôle important dans cette pathologie. Des modèles nutritionnels de stéatose hépatique existent chez l'animal nourri avec un régime carencé en PDM et enrichi en méthionine (Shinohara *et al.*, 2010). Par exemple, des souris nourries avec un régime carencé en folates peuvent développer une stéatose et présenter une augmentation significative de l'Hcy plasmatique simultanément à une

diminution significative de la concentration hépatique en bétaine (Christensen *et al.*, 2010). Une carence en choline ou bétaine conduirait également à une stéatose en diminuant la synthèse de la phosphatidylcholine présente dans les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) dont le rôle est de transporter les lipides du foie (Polyzos *et al.*, 2012). L'alcoolisme chronique est connu depuis longtemps pour compromettre la disponibilité des vitamines impliquées dans le métabolisme des unités monocarbonées, ce qui pourrait expliquer le développement de stéatose au cours de cette pathologie (Tsuchiya *et al.*, 2012). Une étude des effets d'un régime enrichi en éthanol chez la souris et le rat montre une HHcy plasmatique présente seulement chez les souris et une accumulation hépatique de lipides dans les deux espèces animales (Shinohara *et al.*, 2010). Par contre, une étude récente (2012) a montré que des sujets avec une stéatose hépatique non alcoolique présentaient des concentrations diminuées d'Hcy sérique pouvant entraîner une réduction de la synthèse du glutathion par la voie de transsulfuration (Polyzos *et al.*, 2012). Ceci altérerait la capacité anti-oxydante des cellules, favorisant un déséquilibre de l'état redox pro-oxydant et augmentant *in fine* la sévérité de la pathologie hépatique. Enfin, un traitement avec la SAM, les folates ou la bétaine atténuerait les lésions du foie, possiblement *via* un effet protecteur passant par une réduction du stress oxydant, de l'inflammation et de l'apoptose (Purohit *et al.*, 2007).

II. 3. 3. Autres pathologies

La trisomie 21 ou syndrome de Down est une pathologie dont le point de départ est un défaut de séparation durant la méiose du chromosome 21, aboutissant à un chromosome surnuméraire. Cet événement d'origine maternelle dans 95% des cas, est l'anomalie chromosomique la plus fréquente avec une incidence de 1/700 à 1/1000 nouveaux nés et la première cause de retard mental. L'augmentation du risque de trisomie 21 pourrait être liée à des polymorphismes des gènes codant pour les enzymes du cycle de la méthionine et de l'Hcy. L'altération du cycle de la méthionine et l'Hcy peut concerner d'une part le sujet trisomique lui-même et d'autre part sa mère. La présence en triple exemplaire du gène de la CBS, localisé dans le chromosome 21 conduit, chez le trisomique, à une diminution de l'activité de la MS, avec comme conséquences une diminution de (i) la conversion du 5-MTHF en THF, la forme active des folates nécessaire à la synthèse nucléotidique *de novo* et (ii) la concentration de SAM suggérant une réduction de la capacité de méthylation cellulaire (Pogribna *et al.*, 2001). Des polymorphismes maternels de gènes codant pour les enzymes du

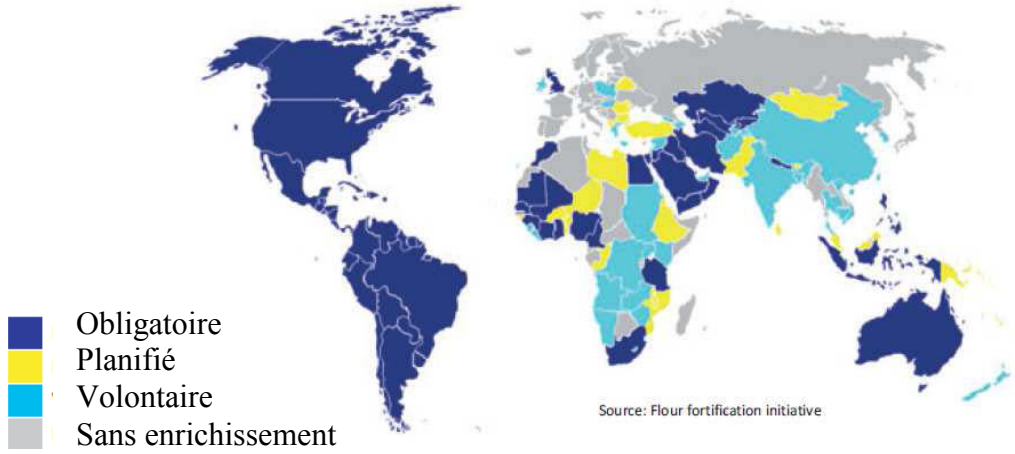
métabolisme des unités monocarbonées pourraient aussi augmenter le risque de trisomie 21 chez l'enfant (Thompson *et al.*, 2009). Ce risque serait par exemple augmenté de 2,6 fois lorsque la mère est hétérozygote (CT) pour le polymorphisme C677T du gène MTHFR relativement aux mères homozygotes CC (James *et al.*, 1999; Sheth *et al.*, 2003).

Pathologies neurologiques : Quatre cent millions de personnes souffriraient de pathologies neurologiques et de désordres mentaux dans le monde (Stanger *et al.*, 2009). Les groupements monocarbonés sont indispensables au bon fonctionnement cérébral puisqu'ils permettent la synthèse de certains neurotransmetteurs, principalement la noradrénaline, la sérotonine et la dopamine. Ils jouent un rôle dans le contrôle des mouvements et l'apprentissage, l'attention, le sommeil, la douleur et les émotions. Parmi les maladies neurodégénératives associées aux PDM et à l'HHcy, on peut citer la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Diaz-Arrastia, 2000; Faux *et al.*, 2011).

Cancers : La déficience en PDM jouerait un rôle dans le développement de nombreux cancers : colorectal, pulmonaire, du col de l'utérus, de l'estomac, du foie ou encore mammaire (Duthie, 2011). Les principaux mécanismes impliqués se situent au niveau de la méthylation des gènes, de l'incorporation anormale d'uracile dans l'ADN et de défauts de réparation de l'ADN (Jang *et al.*, 2005).

II. 4. Effets des politiques d'enrichissement alimentaire sur l'homocystéinémie

En janvier 1998, la Federal Drug Administration (FDA) a imposé l'enrichissement en AF de tous les aliments céréaliers aux Etats-Unis afin d'améliorer le statut en folates des femmes en âge de procréer. Le but premier était, en effet, de réduire la prévalence des AFTN chez le nouveau-né. Aujourd'hui plus de 60 pays pratiquent l'enrichissement des farines en AF et/ou en fer **(Figure 14)** (Jagerstad, 2012).



Caribbean	Middle East/North Africa	Latin America
Barbados	Bahrain	Argentina
Cuba	Egypt	Belize
Dominican Republic	Iran	Bolivia
Grenada	Iraq	Brazil
Guadeloupe	Jordan	Chile
Guyana	Kuwait	Colombia
Haiti	Mauritania	Costa Rica
Jamaica	Morocco	Ecuador
Puerto Rico	Oman	El Salvador
Saint Vincent	Palestine, Occupied Territory	Guatemala
Trinidad & Tobago*	Qatar	Honduras
Central and Eastern Europe	Saudi Arabia	Mexico
Kazakhstan	Yemen	Nicaragua
Kyrgyz Republic	**Sub-Saharan Africa**	Panama
Turkmenistan	Cameroon	Paraguay
Uzbekistan	Côte d'Ivoire	Peru
Asia	Ghana	Suriname #
Indonesia	Guinea	Uruguay
Nepal	Mali	Venezuela*
Philippines*	Nigeria*	**Oceania**
North America	Senegal	Australia +
Canada	South Africa	Fiji
United States	Tanzania	
	European Union	
	United Kingdom*	

Countries fortify with at least iron and folic acid unless otherwise noted
*Standard includes iron but not folic acid
+ Standard includes folic acid but not iron
# Unknown fortificants in country standard

Figure 14 : Le statut « d'enrichissement des farines » en fer et/ou acide folique (AF) des différents pays en 2012. Les pays qui ont mis en œuvre l'enrichissement en AF obligatoire sont sur le continent américain et en Australie (bleu foncé), mais également de nombreux pays d'Afrique et du Moyen-Orient. La carte indique également les pays qui envisagent de rendre obligatoire l'enrichissement en AF (jaune) et les pays qui l'autorisent (turquoise). *Adapté de Jägerstard., 2012*

Différentes études ont déterminé l'impact de cette politique d'enrichissement dans la population américaine mais aussi dans d'autres pays comme le Canada qui ont également mis en place cette réglementation. La comparaison des résultats des études National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) avant et après le début de l'enrichissement des farines (en moyenne 1,4 mg d'AF/kg) chez respectivement 9919 et 2121 sujets, a montré une augmentation significative des apports en folates, indépendamment de l'âge ou du sexe. Cette augmentation s'élevait en moyenne à 28%, les apports totaux passant de 275 à 351 µg/j (Dietrich *et al.*, 2005). Par la suite, les données de NHANES 2003-2006 regroupant 8258 volontaires des deux sexes, âgés de plus de 19 ans, ont montré que l'enrichissement des produits céréaliers, parfois associé à une supplémentation en AF, augmentait les concentrations sériques et érythrocytaires en folates des individus. Ces dernières seraient significativement liées à une diminution de l'homocystéinémie et à une augmentation de la concentration sérique en vitamine B12 retrouvées chez les volontaires (Yang *et al.*, 2010). Cette même étude précise que moins de 3% des adultes Américains auraient un apport en folates supérieur à 1000 µg/j, niveau qui a été défini comme la limite de tolérance *(Cf. § II.6. p35)*. Une enquête sur la santé réalisée au Canada entre 2007 et 2009 incluant 5600 participants âgés entre 6 et 79 ans a suggéré que l'enrichissement obligatoire en AF aurait quasiment éliminé la déficience en folates, 95% de cette population présentant des concentrations de tHcy normales. Dans la même étude, seulement 1% des adultes, pour l'essentiel des personnes âgées, étaient déficients en vitamine B12 (MacFarlane *et al.*, 2011). Une des conséquences de cet enrichissement a été la réduction significative des AFTN dans ces pays avec une diminution de 26% aux Etats-Unis entre 1995 et 2000 (Dietrich *et al.*, 2005); et une prévalence qui passait de 1,58 pour 1000 naissances en 1993 au Canada (avant enrichissement) à 0,86 pour 1000 naissances en 2002 (après enrichissement) (De Wals *et al.*, 2007).

En France, la Direction Générale de la Santé (DGS) a émis en 2000 des recommandations incitant les professionnels de santé à prescrire en période péri-conceptuelle une supplémentation individuelle de 5 mg d'AF/j aux femmes avec un antécédent obstétrical d'AFTN et de 400 µg/j aux femmes sans antécédent. Mais est-ce vraiment efficace ? Le réseau « European Surveillance of Congenital Anomalies » (EUROCAT), réunissant 18 pays européens et assurant la surveillance épidémiologique des anomalies congénitales, a établi en 2005 un bilan des AFTN de 1980 à 2002 **(Figure 15)**. Malgré les recommandations, aucune diminution de leur prévalence en Europe n'a été observée (Busby *et al.*, 2005).

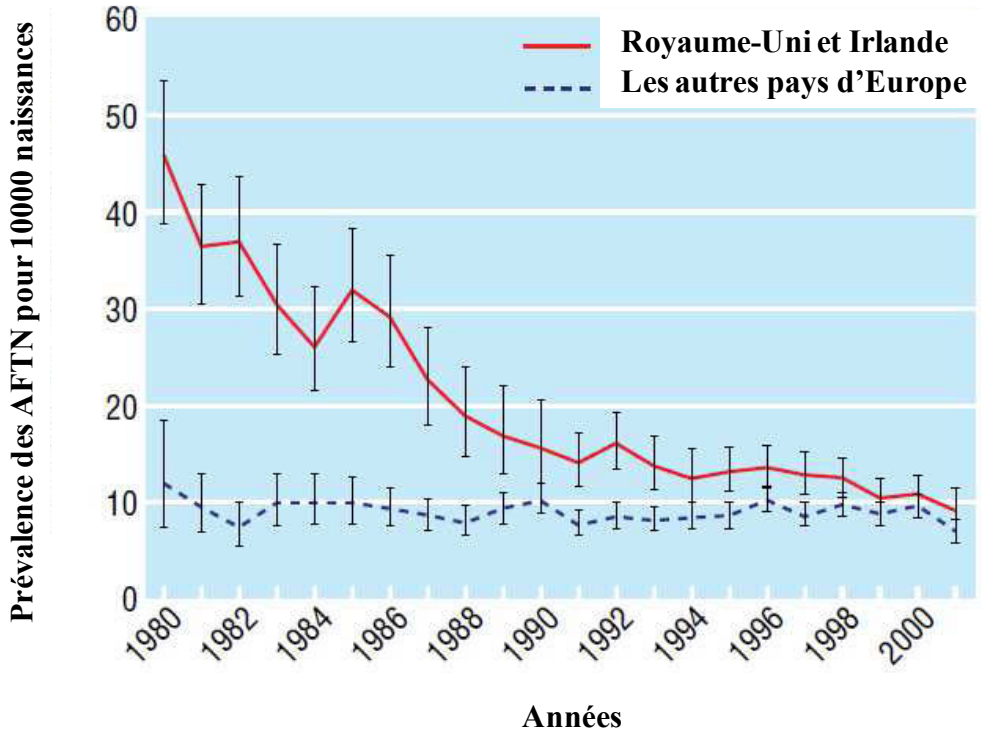


Figure 15 : Evolution de la prévalence moyenne des AFTN pour 10000 naissances au Royaume-Uni et en Irlande comparativement aux autres pays d'Europe, entre 1980 et 2001. En Europe, les premiers gouvernements à établir une politique de supplémentation en AF pendant la grossesse ont été le Royaume-Uni (1992) et l'Irlande (1993). Dans ces deux pays, le taux d'AFTN était environ 4 fois plus élevé que celui des autres pays d'Europe en 1980. Leur prévalence a ensuite rejoint celui des autres pays d'Europe dans les années 2000. *Adapté de Busby et al., 2005*

Les principales causes de ces résultats sont qu'une grande partie des grossesses ne sont pas planifiées et que beaucoup de femmes restent encore mal informées. Ainsi, une récente étude (2012) réalisée sur 500 femmes Italiennes ayant planifiées leur grossesse, montre que 57% d'entres elles n'ont pas été supplémentées en AF avant d'être enceintes (De Santis *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que les politiques de recommandation d'une simple supplémentation ne seraient pas efficaces.

II. 5. La déficience en PDM, l'HHcy et les maladies cardiovasculaires

Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde. Certains facteurs de risques sont bien connus, tels que le diabète et une pression sanguine ou une

cholestérolémie élevée, tandis que d'autres facteurs, telle que l'HHcy, sont fréquemment évoqués mais encore sujets à discussion. En 1969, McCully a été le premier à associer une concentration plasmatique en Hcy élevée avec la présence de lésions athérosclérotiques (McCully, 1969). Son hypothèse se basait sur des observations faites lors de l'autopsie de jeunes patients atteints d'homocystinurie, lesquels présentaient fréquemment des pathologies cardiovasculaires. Les observations de McCully ont été confirmées par de nombreuses études rapportant l'existence d'une HHcy chez des patients atteints de MCV ou suggérant plus spécifiquement que l'abaissement de l'homocystéinémie des patients homocystinuriques par une supplémentation quotidienne en AF et/ou vitamines B6 et B12 pourrait améliorer leurs fonctions cardiovasculaires. La prévention de la survenue des MCV et/ou le ralentissement de leur progression par une supplémentation en vitamines B reste toutefois encore à démontrer *(Cf. § II.6. p33)*. Wilcken *et al.* ont été les premiers en 1976 à observer une association entre la concentration circulante d'Hcy et les MCV chroniques (Wilcken *et al.*, 1976). Différentes études ont, par la suite, analysé cette association. Il a ainsi été rapporté une élévation de la concentration plasmatique de l'Hcy chez 30% des patients coronariens et 47% des patients avec une maladie des artères périphériques (Mayer *et al.*, 1996). Sadeghian *et al.* (2006) ont également montré sur 225 patients ayant eu une maladie coronarienne, que 11% présentaient une déficience en folates, 25% en vitamine B12 et que le niveau d'Hcy plasmatique était significativement plus élevé chez les hommes (mais pas chez les femmes malades) malades comparativement à des contrôles sains (Sadeghian *et al.*, 2006). Plus récemment, une méta-analyse concluait qu'une élévation de tHcy de 5 µM augmenterait le risque de MCV de 20%, indépendamment des autres facteurs de risque, suggérant qu'une HHcy modérée serait un facteur de risque indépendant de pathologies vasculaires (Humphrey *et al.*, 2008). Des études ont, par ailleurs, associé une concentration élevée en tHcy avec un accroissement du risque de formation de plaques d'athérome dans l'aorte (Sen *et al.*, 2010a), d'accidents vasculaires cérébraux (Virtanen *et al.*, 2005), d'infarctus du myocarde, d'ischémie cardiaque ou encore d'arythmie (Redeen *et al.*, 2010). L'homocystéinémie de sujets sains a également été corrélée avec les concentrations circulantes d'autres facteurs du risque cardiovasculaire tels que le cholestérol total et les apolipoprotéines A et B (El Oudi *et al.*, 2011).

Un statut faible en folates, vitamine B12 ou choline a aussi été considéré comme étant un facteur de risque de MCV. Une étude cas-témoins a ainsi montré qu'une faible concentration érythrocytaire de 5-MTHF est significativement liée au risque de thromboses veineuses (Quere *et al.*, 2002). Dans une autre étude, une carence en vitamines (folates et B12)

apparaissait être facteur de risque significatif de thrombose artérielle (Remacha *et al.*, 2002). Toutefois, lorsque l'HHcy a été incluse dans l'analyse, la carence en vitamines ne constituait plus le facteur de risque. Ceci suggère que l'HHcy est responsable de l'augmentation du risque de thrombose chez les sujets déficients en folates et vitamine B12. Plus récemment, une analyse portant sur 1772 adultes a rapporté qu'un apport en folates insuffisant serait corrélé à une augmentation du risque d'accident vasculaire ischémique. En revanche dans cette étude, la concentration plasmatique des folates n'était pas associée à un tel risque (Weng *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'existence d'une association entre les concentrations circulantes d'Hcy et de vitamine B12 mais pas de folates a été observée chez 82 patients diabétiques de type 2. Ils seraient également reliés à la rigidité artérielle qui est un facteur de risque majeur d'accident cardiaque (Shargorodsky *et al.*, 2009). De même que pour les folates et la vitamine B12, un statut déficient en choline pourrait aussi être un facteur de risque de MCV du fait de sa contribution à la reméthylation de l'Hcy en méthionine (Ueland, 2011).

II. 6. Effets des supplémentations en PDM sur les MCV

Une supplémentation en PDM peut constituer un moyen de diminuer les concentrations de tHcy chez des sujets déficients en l'une ou l'autre des vitamines. Il a été ainsi observé qu'une supplémentation de 2 semaines en phosphatidylcholine diminuait de 18% la concentration de tHcy chez des hommes sains présentant une HHcy modérée (Olthof *et al.,* 2006). En prévention primaire, des supplémentations et/ou enrichissements en PDM semblent diminuer le risque de survenue de MCV, tout comme une consommation régulière d'aliments riches en folates et en autres vitamines du groupe B (Liu *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2010).

Au niveau de la prévention secondaire, y a t-il un réel impact de la réduction de l'homocystéinémie observée après une supplémentation en PDM ? Plusieurs études ont tenté de répondre à cette question **(Tableau 5)**.

Les premières études d'intervention CHAOS, FOLARDA et GOES concluaient en une absence d'effet bénéfique d'une supplémentation en AF (Baker, 2002; Liem *et al.*, 2003; Liem *et al.*, 2004; Liem *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2008). Une méta-analyse regroupant 7 interventions sur plus de 35000 patients souffrant de MCV a récemment conclu à l'absence d'effet d'un traitement avec des vitamines B sur le risque de récidive (Clarke *et al.*, 2011), en accord avec les observations plus anciennes de l'étude Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) (Spence *et al.*, 2005). Cette étude montrait, en effet, que l'administration d'un mélange d'AF et de vitamines B6 et B12 durant 2 ans permettait de réduire l'homocystéinémie de patients relevant d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, sans affecter la fréquence de cet évènement comparativement à des patients ayant reçu un placebo. De même, l'étude HOPE 2 (Heart Outcomes Prevention Evaluation 2), réalisée sur 5522 patients âgés de 55 ans ou plus et atteints d'une affection vasculaire stable ou d'un diabète, a permis d'observer une diminution progressive de leur homocystéinémie après 5 années de supplémentation quotidienne avec 2,5 mg d'AF, 50 mg de vitamine B6 et 1 mg de vitamine B12 relativement à la prise d'un placebo (Lonn *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2007). Toutefois aucune réduction du risque de récidive d'évènements cardiovasculaires chez ces patients n'a été observée. Des résultats similaires ont aussi été rapportés dans l'étude norvégienne NORVIT (Norwegian Vitamin Trial). À plus petite échelle, une étude réalisée sur 40 personnes en bonne santé a montré qu'une supplémentation en PDM diminue l'homocystéinémie sans toutefois améliorer les fonctions vasculaires (Bonaa *et al.*, 2006; Olthof *et al.*, 2006). Enfin, l'étude Norvégienne récente « Western Norway B Vitamin Intervention Trial » (WENBIT) a révélé que le traitement de patients coronariens avec un

mélange AF/vitamines B6 et B12 non seulement ne diminuait pas la fréquence des évènements pathologiques artériels, mais pouvait même l'accélérer chez certains individus (Ebbing *et al.*, 2008; Loland *et al.*, 2010).

Tableau 5 : Les principales études sur l'effet de la supplémentation en acide folique, vitamines B12 et B6, sur les risques cardiovasculaires.

Etudes	Année	Participants	Durée de l'étude	Acide folique (mg/j)	Vitamine B12 (mg/j)	Vitamine B6 (mg/j)	Controls	Conclusions de ces études
CHAOS-2	2002	1882 patients ayant eu infarctus du myocarde ou angine de poitrine	1,7 ans	5	0	0	placebo	Aucun bénéfice. L'étude conclut que l'utilisation systématique de la supplémentation en AF chez les patients atteints de MCV n'est pas conseillée.
GOES	2003	593 patients ayant eu infarctus du myocarde	1 an	0,5	0	0	placebo	Aucun effet positif de la supplémentation en AF sur le risque de récidive d'évènements cardiovasculaires
FOLARDA	2004	283 patients, d'âge moyen 59 ans, ayant eu infarctus du myocarde	1 an	5	0	0	placebo	Aucun effet positif de la supplémentation en AF sur la mortalité et la morbidité en post-infarctus du myocarde
VISP	2004	3 680 patients ayant présenté un infarctus cérébral	2 ans	2,5	0,4	25	AF : 0,02 vit.B12 : 0,06 vit.B6 : 0,2	Aucun bénéfice de la supplémentation
HOPE-2	2006	5522 patients âgés de plus de 55 ans présentant un antécédent personnel de maladie vasculaire et/ou un diabète	5 ans	2,5	1	50	placebo	Diminution de l'homocystéinémie de 2,4 mM en moyenne dans le groupe traité. Augmentation de l'homocystéinémie de 0,8 nmol/L en moyenne dans le groupe placebo. Aucun bénéfice de la supplémentation sur les évènements cardiovasculaires.
NORVIT	2006	3 749 patients en postinfarctus du myocarde immédiat (<7 jours)	40 mois	groupe A : 0,8 groupe B : 0,8 groupe C : 0	groupe A : 0,4 groupe B : 0,4 groupe C : 0	groupe A : 40 groupe B : 0 groupe C : 40	placebo	Diminution de l'Hcy plasmatique par 27 % dans les groupes A et B mais pas dans le groupe C. Tendance à un risque cardiovasculaire accru (RR = 1,22 ; p = 0,05) dans le groupe A. Groupe A et C associés à une élévation du risque d'infarctus du myocarde (augmentation de risque de 30% pour le groupe A et de 17% pour le groupe C). Cependant, ces associations pourraient être fortuites compte tenu de l'augmentation modérée du risque.
WAFACS	2008	5 442 femmes d'au moins 40 ans présentant un antécédent cardiovasculaire	7,29 ans	2,6	1	50	placebo	Aucun bénéfice de la supplémentation
WENBIT	2008	3096 patients ayant eu une coronarographie	4 ans	groupe A : 0,8 groupe B : 0,8 groupe C : 0	groupe A : 0,4 groupe B : 0,4 groupe C : 0	groupe A : 40 groupe B : 0 groupe C : 40	placebo	Aucun bénéfice de la supplémentation

Au vu des différentes données d'interventions secondaires, il n'y aurait pas d'effet d'une réduction de l'homocystéinémie par la supplémentation en vitamines B sur la morbidité et la mortalité des patients atteints de MCV. Toutefois, une amélioration des fonctions cardiovasculaires a souvent été rapportée *(Cf. chapitre IV p57)*. L'hypothèse proposée pour tenter d'expliquer l'absence d'effet de la supplémentation est que la surcharge en PDM pourrait contrecarrer les bénéfices apportés par la réduction de la concentration circulante d'Hcy. En effet, la majorité des études d'intervention ont utilisé des doses importantes de

vitamines. Or, une étude récente chez des patients hémodialysés a montré l'absence de réduction supplémentaire de l'homocystéinémie avec des supplémentations journalières supérieures à 2 mg d'AF (Tamadon *et al.*, 2011). Malgré l'hypothèse d'une faible toxicité de l'AF, normalement éliminé *via* l'urine, l'IOM a fixé l'apport maximal tolérable (AMT) en folates à 1 mg/j pour les hommes et les femmes adultes. Une supplémentation en AF ne devrait pas aboutir à augmenter les apports en folates au-delà de leur AMT du fait des risques (i) de masquage des signes hématologiques de la déficience en vitamine B12 chez le sujet âgé et (ii) de développement de cancers non diagnostiqués chez des individus, du fait de l'activation de la prolifération cellulaire par les folates. En effet, une étude réalisée sur une fraction de la cohorte « Cancer Prevention Study II Nutrition » (70656 femmes ménopausées dont 3898 développant un cancer du sein) montrent que les volontaires consommant les quantités de folates (supplément + aliments) les plus élevées (> 900 µg/j) avaient un risque significativement augmenté de développer un cancer du sein (Stevens *et al.*, 2010). Mason *et al.* (2007) ont également montré que les courbes d'incidence des cancers colorectaux, en décroissance depuis les recommandations d'enrichissement systématique en AF des céréales aux Etats-Unis, ré-augmentées entre 2000 et 2004 (Mason *et al.*, 2007). Récemment, une méta-analyse montre aussi que la supplémentation et l'enrichissement en AF augmentent significativement et principalement le risque de cancers de la prostate (Wien *et al.*, 2012). De même, il a été défini une AMT pour la choline égale à 3,5 g/j, au-delà de laquelle des signes indésirables d'hypotension ont été reportés chez l'Homme (Food and Nutrition Board, 1998; Buchman, 2009).

Une supplémentation en PDM permet de diminuer les concentrations d'Hcy et aurait un effet préventif sur la survenue de ces pathologies. En prévention secondaire, les résultats actuels ne montrent pas d'effet bénéfique sur la récidive d'évènement cardiaque. Certaines études reportent des AMT au dessus desquelles, la supplémentation n'a plus d'effet, voire même aurait des conséquences négatives puisqu'elle pourrait être associée à une augmentation du risque de cancers.

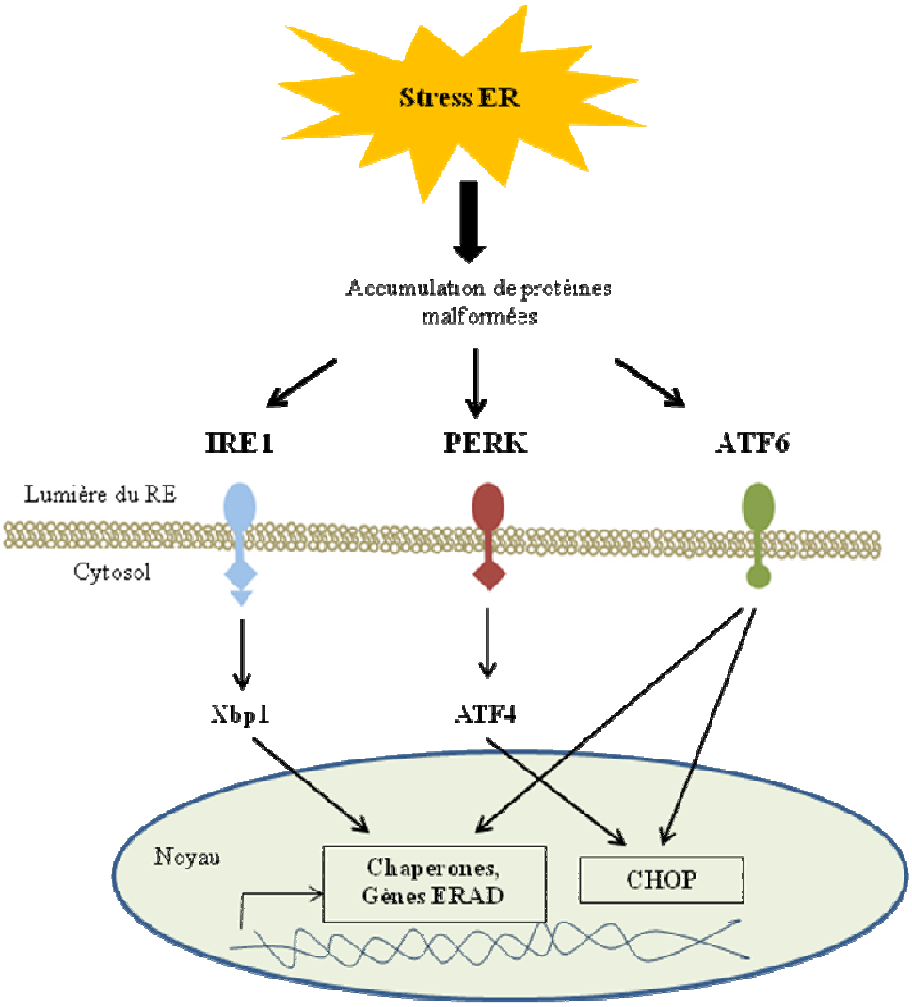
III. PROCESSUS ET MOLECULES CIBLES DE LA DEFICIENCE EN PDM ET DE L'HHcy

La déficience en PDM et l'HHcy sont associées à un risque de développement de diverses pathologies. Ce chapitre décrit l'intervention des PDM et/ou de l'HHcy dans plusieurs processus cibles (stress du réticulum endoplasmique, stress oxydant…) ainsi que sur différentes cibles (ADN, gène, protéines) pouvant expliquer les mécanismes pathologiques mis en jeu.

III. 1. Processus cibles

III. 1. 1. Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site de traduction et de repliement lors de la synthèse des protéines. Les protéines y subissent un contrôle de qualité qui les conduira soit vers l'appareil de Golgi pour être sécrétées, soit vers la dégradation en cas de mauvaise conformation. L'accumulation de protéines malformées dans la lumière du RE va entraîner un stress du RE et une réponse cellulaire : l'UPR (unfolded protein response). Celle-ci se met en place à partir de l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK (PKR-like εR protein kinase), ATF6 (activating transcription factor 6) et IRE1 (inositol requiring enzyme 1) et a pour but d'augmenter les capacités de repliement, de maturation, voire de dégradation du RE **(Figure 16)** (Jing *et al.,* 2012). ATF6, IRE1, et PERK activent des gènes de la réponse UPR tels que GRP78 (Glucose Related Protein 78 encore appelé BiP), CHOP (C/EBP-homologous protein ou GADD153), et Herp (protéine du RE induite par l'Hcy) (Ji *et al.*, 2004).



ATF4 et ATF6 : activating transcription factor 4/6; CHOP : C/EBP-homologous protein; ER : endoplasmic reticulum; ERAD : endoplasmic reticulum-associated protein degradation; IRE1 : Inositol requiring enzyme 1; PERK : PKR-like εR protein kinase; UPR : Unfolding Protein Response; Xbp1: X-box binding protein 1.

Figure 16 : Les voies de signalisation de la réponse UPR. L'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique induit le stress ER. En réponse au stress, Bip active les régulateurs de la réponse des protéines malformée (UPR) : IRE1, PERK et ATF6. IRE1 active Xbp1. L'activation de PERK conduit à une atténuation globale de la synthèse des protéines et une augmentation concomitante d'ATF4. ATF6 activé induit la transcription des gènes ERAD et régule l'expression de CHOP. De même, ATF4 induit l'expression de CHOP et Xbp1, celle de chaperones et de gènes ERAD. *D'après Jing et al., 2012*

Peu d'études se sont encore intéressées à l'induction d'un stress du RE après une déficience en PDM. Une étude sur des mini-porcs nourris avec un régime déficient en folates montre que l'apoptose et la stéatose retrouvées au niveau de leur foie est lié à la génération d'un stress du RE évalué par l'augmentation de l'expression de la protéine GRP78 (Esfandiari *et al.*, 2005). Les auteurs reportent que le stress du RE est significativement lié à l'augmentation de l'Hcy dans le foie. Aussi, des souris normales ou $ApoE^{-/-}$ (modèle d'invalidation du gène de l'apolipoprotéine E, ApoE) nourries avec un régime enrichi en méthionine et pauvre en folates et vitamines B12 et B6, présentaient une HHcy modérée ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes GRP78, et de l'endoplasmine (GRP94) au niveau vasculaire (Alessio *et al.*, 2011). Les études montrent donc que la génération d'un stress du RE, en cas de déficience en PDM, serait, principalement liée à l'excès d'Hcy. Les résultats des études cellulaires confirment ces observations. Au niveau des cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC) traitées par de fortes concentrations d'Hcy (5 et 10 mM) une augmentation du niveau de l'ARNm de ATF4 (activating transcription factor 4) et GRP78/BiP a également été rapportée (Kokame *et al.*, 1996; Outinen *et al.*, 1999). De même, des ostéoblastes exposées pendant 24h à 2,5 mM ou 5 mM d'Hcy présentaient une augmentation de l'expression des gènes de GRP78, IRE-1α (inositol-requiring transmembrane kinase and endonuclease 1α), CHOP et ATF4 (Park *et al.*, 2012). Des niveaux élevés d'Hcy intracellulaires pourraient aussi augmenter l'expression de gènes GRP94, Herp (homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein) et RTP (Reducing agents and tunicamycin-responsive protein) (Agarwala *et al.*, 2000; Kokame *et al.*, 2000).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'induction du stress ER par l'augmentation des niveaux cellulaires d'Hcy. Le premier serait par une N-homocystéinylation c'est-à-dire l'incorporation anormale de cet acide aminé soufré dans la protéine entraînant la formation d'Hcy thiolactone (HTL) *(Cf. § III.2.3.1 p51)*. Roybal *et al.* (2004) ont rapporté que le traitement de cellules épithéliales de la rétine humaine par des quantités élevées d'HTL induisait une augmentation de l'expression des ARNm de GRP78 et GADD153 (Roybal *et al.*, 2004). L'Hcy pourrait également perturber la formation de ponts disulfures dans les protéines néosynthétisées, conduisant à leur mauvais repliement. En effet, l'Hcy peut se lier avec d'autres résidus cystéines protéiques et former des ponts disulfures, modifiant ainsi la structure tertiaire de la protéine (Mato *et al.*, 2005). Or, la structure tridimensionnelle est intimement liée à la fonction; lorsqu'elle est altérée, la protéine peut

perdre sa fonction. Les protéines mal repliées se retrouvent accumulées dans le RE et entraînent le stress du RE.

Si l'implication de l'Hcy dans l'induction d'un stress du RE a été montrée, celle des PDM n'a été que faiblement étudiée jusqu'à présent. On sait ainsi que la supplémentation en bétaine chez des souris présentant une stéatose hépatique alcoolique diminue l'Hcy plasmatique de 54% ainsi que le stress ER (Ji *et al.*, 2003).

III. 1. 2. Stress oxydant

On définit le stress oxydant comme un déséquilibre entre les niveaux d'oxydants et d'antioxydants (Sies, 1991). Les deux classes d'oxydants sont regroupées sous la catégorie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des espèces réactives de l'azote (ERN). Elles comprennent des espèces radicalaires et non radicalaires **(Figure 17)**.

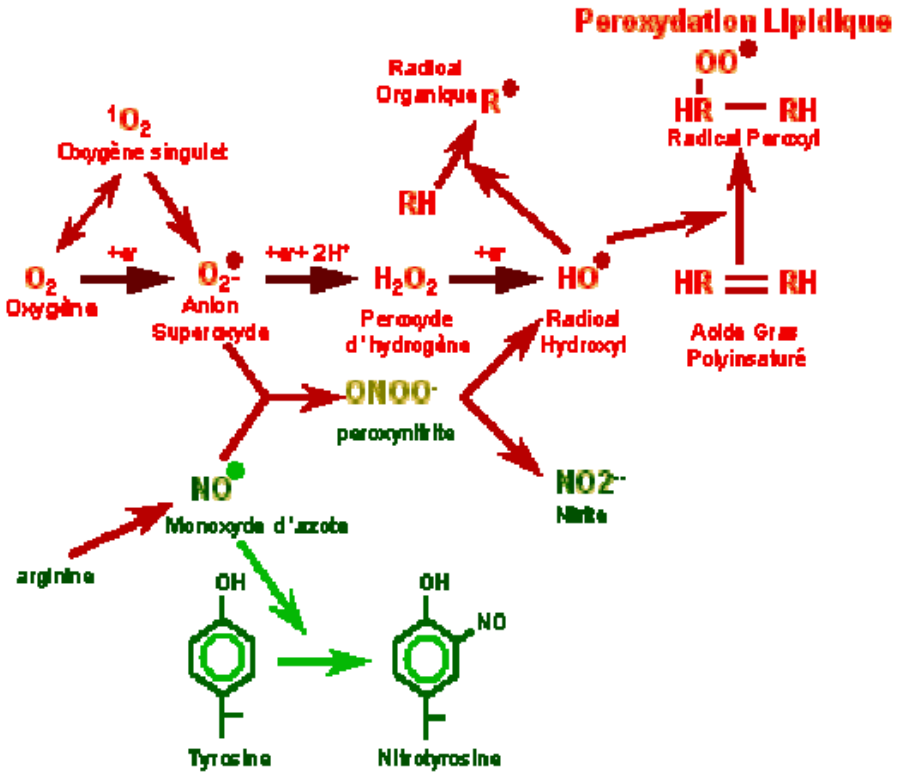


Figure 17 : Relations existantes entre les espèces réactives issues de l'oxygène (en rouge) et celles issues de l'azote (en vert). *Adapté de Matés et al., 1999*

Plusieurs enzymes et systèmes enzymatiques peuvent produire des ERO/ERN en condition normale. On en trouve principalement quatre : la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). D'un point de vue vasculaire, ils participent à la signalisation cellulaire normale (Griendling *et al.*, 2000), en régulant la contraction, la relaxation et la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires (Zafari *et al.*, 1998). La cellule aérobie dispose de systèmes de protection qui lui permettent de contrôler le niveau physiologiques de ces espèces radicalaires **(Figure 18)**.

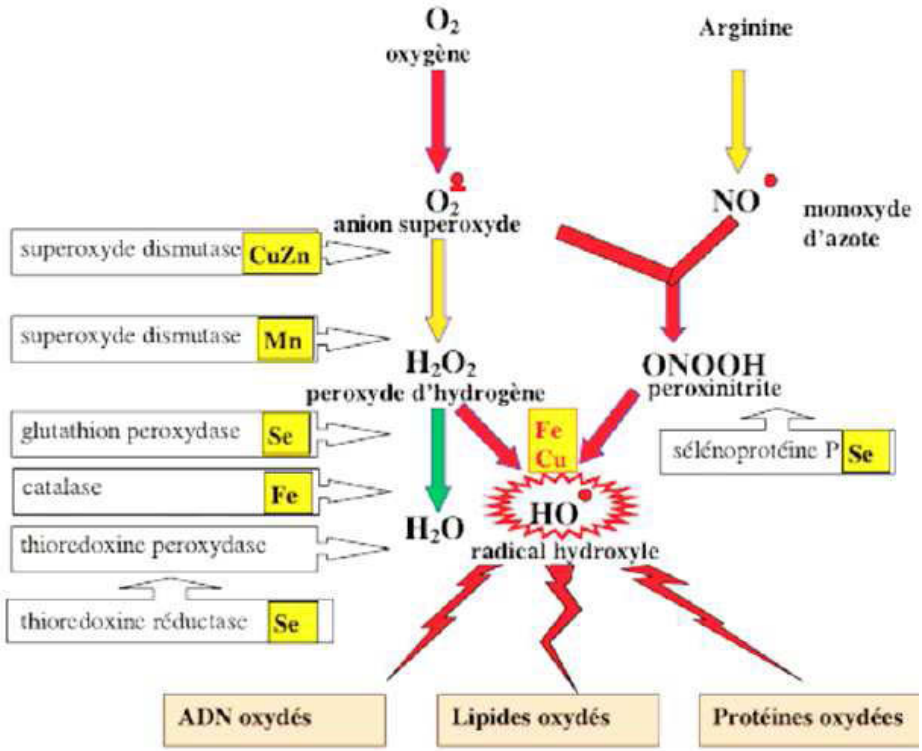


Figure 18 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques. *Adapté de Matés et al., 1999*

Il s'agit d'une part, d'enzymes anti-oxydantes dont les plus importantes sont :

✔ les superoxydes dismutases (SOD) qui sont des enzymes de dégradation de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ -}$) en oxygène et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). On en distingue 3 types : les SOD dépendantes du Cu et du Zn (SOD1 et SOD3) qui sont respectivement cytoplasmique et extracellulaire, et la SOD dépendante du Mn (SOD2) qui est mitochondriale.

✔ Les glutathion peroxydases (GPx) qui réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau et les hydroperoxydes organiques en alcools en utilisant la capacité réductrice du couple glutathion réduit/oxydé (GSH/GSSG). Le GSH est régénéré par la glutathion réductase en présence de NADPH.

✔ Les catalases, enzymes ubiquitaires et quasiment toujours peroxysomales, qui catalysent l'hydrolyse du H_2O_2 en eau et oxygène.

✔ Les thiorédoxines (Trx)/glutarédoxines, oxydoréductases responsables du maintien des cystéines dans leur état réduit. Elles existent sous deux isoformes, la Trx1, cytosolique et nucléaire et la Trx2, mitochondriale.

D'autre part, il s'agit un dispositif de défense non enzymatique, constitué de différentes molécules de faibles poids moléculaires telles que le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C), la vitamine E et le coenzyme Q_{10}. Le glutathion est le principal antioxydant cellulaire; c'est un tripeptide: γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine. Il existe sous une forme oxydée (GSSG) et une forme réduite (GSH) qui lui permettent de participer au maintien du potentiel redox cellulaire.

L'évaluation du stress oxydant peut se faire par la mesure dans les tissus ou fluides biologiques, de l'activité et/ou de l'abondance d'enzymes anti-oxydantes ou de différents produits d'oxydation secondaire, issus de l'action des ERO/ERN (généralement beaucoup plus stables) sur les lipides, les protéines ou l'ADN (Halliwell, 1999). Les mesures des niveaux de plusieurs produits issus de la peroxydation lipidique sont utilisées comme marqueurs du stress oxydant, tels que le 4-hydroxynonenal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) ou les F_2-isoprostanes (Uchida, 2003; Aldini *et al.*, 2005) *(Cf encadré**). Pour les protéines, la formation de dérivés carbonyles étant plus importante que les autres types de modifications oxydatives (Dean *et al.*, 1997), le contenu en protéines carbonylées est souvent utilisé comme marqueur de stress oxydant *(Cf. § III.2.3.2 p52)*.

*La nature et l'abondance des lipides polyinsaturés tels que les phospholipides, le cholestérol, les esters de cholestérol, les glycolipides des membranes cellulaires et les lipoprotéines en font des cibles principales pour l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés (Halliwell, 1999). Cette oxydation déclenche une série de réactions en chaîne, la peroxydation lipidique, qui conduit à la formation de lipides hydroperoxydés (LOOH) ou d'aldéhydes. Les LOOH étant en effet instables en milieu aqueux, ils se décomposent facilement en produits secondaires, tels que les aldéhydes plus ou moins toxiques comme le 4-hydroxynonenal (HNE), le malondialdéhyde (MDA) et les isoprostanes (Uchida *et al.,* 2003; Aldini *et al.,* 2005). La quantification de ces derniers composés est d'ailleurs la référence actuelle pour l'évaluation du stress oxydant *in vivo* et biomarqueur de la peroxydation lipidique dans le cadre de nombreuses pathologies inflammatoires et chroniques. Les protéines sont également des cibles des radicaux libres, les chaînes latérales de certains acides aminés étant très sensibles à l'oxydation. Les protéines comportant un groupement sulfhydryle (-SH) sont les plus affectées. La présence de ce groupement dans les enzymes et les protéines de transport est généralement impliquée dans la structure tridimensionnelle et le fonctionnement du site catalytique et par conséquent dans la fonctionnalité. L'oxydation de ces protéines entraîne donc généralement une perte des propriétés biologiques et les rend plus sensibles à l'action des protéases.

Comme nous allons le développer dans le paragraphe suivant, la déficience en PDM peut induire un stress oxydant, du fait de la diminution des concentrations en vitamines qui auraient des propriétés anti-oxydantes (folates notamment) et/ou *via* l'augmentation de la concentration en Hcy potentiellement pro-oxydante.

Peu d'études ont évalué le statut redox des personnes déficientes en PDM. En 1998, Jacob *et al.* ont montré que les femmes ménopausées ayant consommé un régime pauvre en folates (56 µg/j) pendant 5 semaines présentaient une homocystéinémie et une concentration urinaire en MDA significativement augmentée (Jacob *et al.*, 1998). D'autres études ont également montré que le statut en folates et/ou vitamine B12 pouvait être modifié dans des populations atteintes ou à risque de pathologies sans montrer un lien direct. Ainsi, des mères d'enfants ayant le syndrome de Down présentent des concentrations sériques en folates et vitamine B12 inférieures à celles des contrôles et une augmentation significative de l'Hcy et des TBARS *(Cf encadré**) (Meguid *et al.*, 2010).

*TBARS : « substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » ou *thiobarbituric acid reactive substances*. Ce dosage repose sur la formation, en milieu acide et chaud, d'un pigment coloré liant le MDA et l'acide thiobarbiturique. Néanmoins, ce dosage mesure le MDA préexistant mais aussi le MDA formé de manière artéfactuelle par décomposition thermique des peroxydes.

De plus, il a été rapporté chez des patients atteints d'un cancer du foie, des concentrations en folates, vitamine B12 et enzymes anti-oxydantes plasmatiques (SOD et GPx) significativement inférieures à celles de leurs contrôles sains (Lin *et al.*, 2007a). Plusieurs études chez l'animal ont également montré l'impact de la déficience en PDM sur l'état redox. Un régime déficient en choline chez le rat entraîne au niveau hépatique, une augmentation de la production mitochondriale d'H_2O_2, ainsi qu'une diminution des concentrations des antioxydants vitaminiques C et E, et une augmentation des niveaux de TBARS (Grattagliano *et al.*, 2000). De même, il a été observé une augmentation de l'activité ou de l'abondance de plusieurs enzymes du métabolisme du glutathion (GPx1, glutathion réductase et/ou glutathion S-transférase) dans le foie ou le cerveau de rats nourris avec un régime déficient en folates (Chanson *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2007). Dans une autre étude avec le même modèle, l'activité mitochondriale de la GPx, était augmentée au niveau hépatique, sans variation de l'activité MnSOD et de la production des TBARS (Chang *et al.*, 2007). Ces études suggèrent donc que la déficience en PDM pourrait s'accompagner d'un état de stress oxydant, notamment, *via*

l'altération des enzymes anti-oxydantes. Or, le stress oxydant joue un rôle clé dans le développement d'un grand nombre de pathologies (Lipinski, 2011; Gandhi *et al.*, 2012).

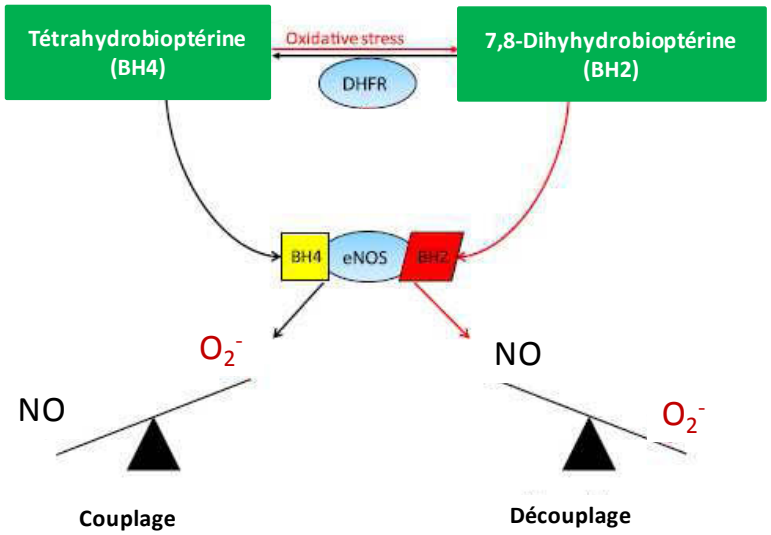
Les PDM pourraient aussi induire un stress oxydant *via* l'augmentation de l'Hcy. En effet, dans l'organisme, la concentration intracellulaire de l'Hcy est maintenue basse grâce aux voies de reméthylation et de transsulfuration. Dès lors qu'elle est produite en excès, l'Hcy est exportée par les cellules vers le plasma où elle est rapidement oxydée par fixation sur des protéines (ex. albumine) ou des molécules soufrées de petite taille (ex. cystéine). Grâce à son groupement thiol réducteur, l'Hcy peut aussi s'auto-oxyder en présence de métaux de transition formant ainsi de l'homocystine (Hcy-Hcy) avec libération de H_2O_2 et favorisant ainsi les conditions pour le développement d'un stress oxydant. Ces observations ont été faite *in vitro* sur cellules endothéliales, microgliales ou encore vasculaires avec pour conséquences l'apoptose et l'altération de l'ADN notamment (Yan *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007b). Chez des souris $CBS^{+/-}$ hyperhomocystéinémiques (du fait de l'altération de la voie de transsulfuration), il a été observé une augmentation de la concentration de la protéine NOX-4 et une diminution de celle de la thioredoxine 1 au niveau de l'os tibial, ce qui conduirait à une perte osseuse. Une supplémentation de 6 semaines en AF a permis d'inverser ces changements (Tyagi *et al.*, 2011). Chez des chiens hyperhomocystéinémiques, l'abondance de NOX-2 était augmentée, au niveau du cœur, et celle de la eNOS était diminuée au niveau des artères coronaires (Suematsu *et al.*, 2007). Ces observations indiquaient une réduction de la disponibilité du monoxyde d'azote (NO) et une augmentation de la production d'ERO conduisant à un dysfonctionnement endothélial et une altération du fonctionnement cardiaque.

Par ailleurs, les PDM posséderaient une activité anti-oxydante propre. Une supplémentation en folates (5 mg/j) pendant 8 semaines chez des patients atteints de diabète de type 2, permettait de diminuer de manière significative le MDA et l'Hcy tout en augmentant le statut antioxydant et la quantité de folates et vitamine B12 dans le plasma (Aghamohammadi *et al.*, 2011). L'amélioration du statut redox a aussi été démontrée 1) chez des patientes anémiées et enceintes après une supplémentation de 2 mois en folates (400 µg/j) ou vitamine B12 (1 mg/j), 2) chez des patients atteints de syndrome métabolique supplémentés pendant 4 semaines avec 5 mg/j d'AF ou encore 3) chez des enfants atteints de fibrose kystique (ou mucoviscidose) supplémentés pendant 14 jours avec des doses quotidiennes de 3 g de bétaine ou 2 g de choline (Innis *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2011). Il a aussi été montré chez des volontaires sains qu'une consommation d'épinards (225 g/j) pendant 16 jours

permettait d'augmenter la folatémie de 27% et de prévenir les dommages oxydatifs de l'ADN lymphocytaire (Moser *et al.*, 2011). L'amélioration du statut redox par la supplémentation en PDM serait due à la diminution des ERO et l'augmentation des capacités anti-oxydantes. Par exemple, l'incubation de cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) avec 50 à 200 µM d'Hcy augmentait de manière significative et dose-dépendante la production d'O_2^- (Moreira *et al.*, 2011). Le pré-traitement de ces cellules avec des concentrations de 10 à 50 nM de cobalamine diminuait ce phénomène. Une autre étude a montré que le traitement de cellules endothéliales hépatiques ou d'HUVEC avec différentes formes de cobalamines (adénosyl-, cyano- et méthyl- cobalamines) permet de diminuer significativement la production de peroxydes induite en présence d'Hcy (Birch *et al.*, 2009). Une étude récente montre qu'une supplémentation en AF permet de contrecarrer la production de MDA et la baisse des capacités anti-oxydantes observées dans le cerveau de rats au cours du vieillissement (Singh *et al.*, 2011). Enfin, une supplémentation en PDM (bétaine, choline, AF, vitamine B12 et méthionine) entraine une amélioration du ratio GSH/GSSG (par diminution du niveau de GSSG) chez la souris intoxiquée avec de l'alcool (Powell *et al.*, 2010).

III. 1. 3. Métabolisme du monoxyde d'azote

Le NO est important pour maintenir un débit sanguin correct et c'est l'un des principaux facteurs anti-athérogéniques (Napoli *et al.*, 2001). Il régule le tonus musculaire et influe sur l'interaction des globules blancs et plaquettes avec l'endothélium. Il est formé par la eNOS, un homodimère stabilisé par l'hème, à partir de l'arginine en présence de tétrahydrobioptérine (BH_4). Un des mécanismes attribué à la déficience en folates est le découplage de l'enzyme, du fait d'une diminution de la biodisponibilité de la BH_4 oxydée en dihydrobioptérine (BH_2), sa forme inactive **(Figure 19)** (Crabtree *et al.*, 2011).



BH_2 : dihydrobioptérine; BH_4 : tétrahydrobioptérine; DHFR : dihydrofolate réductase; eNOS : NO synthase endothéliale; NO : monoxyde d'azote; O_2^- : anion superoxyde

Figure 19 : Le découplage de la eNOS. En condition normale et en présence de la DHFR, le BH_4 se lie à la eNOS pour former le NO. En cas de stress oxydant, notamment lorsque les folates sont déficients, le BH_4 fait place à BH_2 qui se lie aussi à la eNOS mais privilégie la formation de O_2^- au détriment du NO. On parle alors de découplage de la eNOS. *Adapté de Crabtree et al., 2011*

La eNOS produit alors de l'O_2^- qui réagit rapidement avec le NO présent pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$), une molécule très réactive et pro-oxydante. Une exposition à l'angiotensine II diminue l'expression de la DHFR et le niveau de BH_4, et induit le découplage de la eNOS dans des cellules endothéliales aortiques bovines (Chalupsky *et al.*, 2005). Par contre, la production du NO est restaurée et la formation d'O_2^- diminuée lorsque le gène *dhfr* est surexprimé dans ces cellules. De même, l'injection de methotrexate, un inhibiteur de la DHFR, bloque la conversion de BH_2 en BH_4 et entraîne un dysfonctionnement de la eNOS dans l'aorte de rats (Noguchi *et al.*, 2011). Enfin, une amélioration du couplage de la eNOS a été observée chez des patients souffrant de pathologies coronariennes après injection intraveineuse de 5-MTHF (0,13 mg/kg de poids corporel) du fait d'une augmentation de la quantité de BH_4 disponible (Antoniades *et al.*, 2006).

Les folates auraient un effet bénéfique sur le fonctionnement de la eNOS et différents mécanismes ont été proposés. Ils auraient la capacité de restaurer la biodisponibilité du BH_4 **(Figure 20)** (Cau *et al.*, 2012).

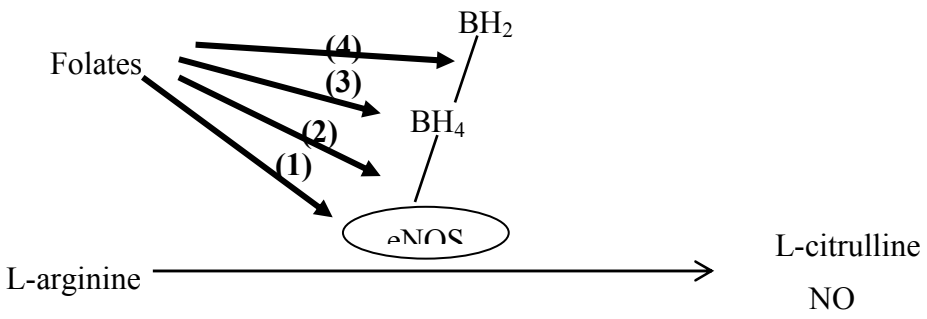
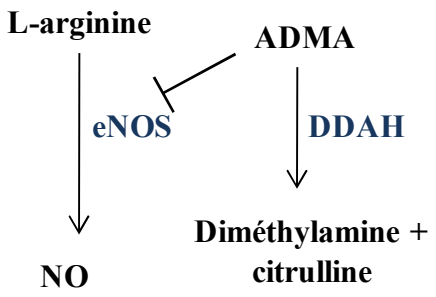


Figure 20 : L'interaction des folates avec la eNOS. Les folates (1) ont la capacité de se lier directement avec la eNOS, (2) peuvent augmenter l'efficacité de liaison entre le BH_4 et la eNOS et (3) stabiliser le BH_4 et (4) contribuer à la régénération du BH_4 à partir du BH_2

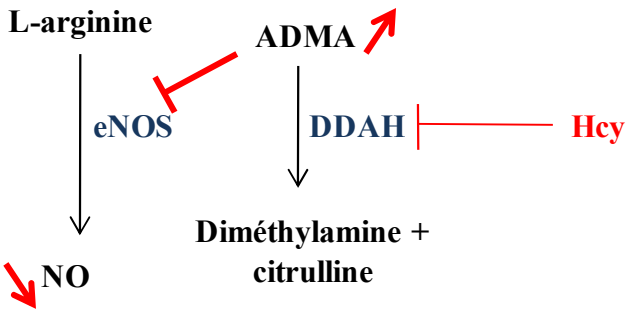
L'AF pourrait diminuer la production d'O_2^- et améliorer l'affinité de liaison du BH_4 à la eNOS (Stroes *et al.*, 2000). Hyndman *et al.* ont également constaté que le 5-MTHF est capable de se lier au site ptérine de la eNOS et peut donc directement interagir avec l'enzyme (Hyndman *et al.*, 2002). La consommation d'AF peut également augmenter la phosphorylation de la eNOS sur la sérine 1177 et donc son activité (Seto *et al.*, 2010). En outre, l'AF peut améliorer la régénération de BH_4 de sa forme inactive et oxydée le BH_2 et peut le stabiliser chimiquement (Moens *et al.*, 2008).

L'augmentation des quantités d'Hcy intracellulaires peut aussi avoir un impact sur le métabolisme du NO *via* la diméthylarginine diméthylaminohydrolase (DDAH), l'enzyme qui catabolise la diméthylarginine asymétrique (ADMA) **(Figure 21)**.

En condition normale:



En cas d'HHcy



ADMA : diméthylarginine asymétrique; DDAH : diméthylarginine diméthylaminohydrolase; eNOS : NO synthase endothéliale; NO : monoxyde d'azote

Figure 21 : Relation entre HHcy et métabolisme du NO.

En effet, l'Hcy est un inhibiteur de l'activité de la DDAH (Stuhlinger *et al.*, 2001). L'ADMA, présent dans la circulation sanguine, est un dérivé méthylé de l'arginine dont le donneur de méthyle est la SAM. L'augmentation de la concentration de l'Hcy est associée à celle de l'ADMA dans le sang de patients atteints de MCV (Sanli *et al.*, 2012). L'homocystéinémie des personnes âgées semble être inversement corrélée aux concentrations plasmatiques des vitamines B6, B12 et folates et positivement à celles de l'ADMA (Fabian *et al.*, 2011). L'ADMA étant un inhibiteur de la eNOS, une HHcy pourrait donc induire une diminution de la formation du NO. Il a été montré *in vitro*, que la concentration de l'ADMA était également augmentée dans le milieu de culture de cellules endothéliales exposées à des concentrations similaires à celles observées en conditions pathophysiologiques d'Hcy, tandis que la quantité de NO exporté par les cellules était diminuée (Stuhlinger *et al.*, 2001). Il semble que l'Hcy puisse agir directement sur la production d'ADMA, et de ce fait sur le métabolisme du NO,

indépendamment des vitamines. Une étude a, en effet, montré chez de jeunes patients épileptiques, une augmentation des niveaux sériques de l'ADMA associée à celle de la tHcy, alors que leurs statuts en vitamine B12 et folates étaient normaux (Ozdemir *et al.*, 2011).
Les effets de la déficience en PDM et de l'HHcy décrits précédemment ont conduit à étudier l'impact d'une supplémentation en vitamines B sur le métabolisme du NO. Une telle intervention a semblé sans effet, après 8 semaines, sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez des patients atteints de maladies artérielles périphériques occlusives (Sydow *et al.*, 2003). Par contre, cette fonction pourrait à l'inverse, être améliorée par une supplémentation en L-arginine (Sydow *et al.*, 2003). Un traitement continu à la nitroglycérine provoque un dysfonctionnement de la eNOS qui peut être prévenue par une supplémentation de 10 mg/j d'AF (Gori *et al.*, 2001). En revanche, l'utilisation de plus faible quantité d'AF (1 mg/j) n'a aucun effet (DiFabio *et al.*, 2010).

III. 1. 4. Voie de l'inflammation

Le processus inflammatoire est constitué d'un ensemble de mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine les substances identifiées comme étrangères. Elle commence par une réaction de « reconnaissance » faisant intervenir certaines cellules de l'organisme (monocytes, macrophages, lymphocytes) ou des protéines circulantes (anticorps, protéines du complément, …). Fait suite la mise en jeu de médiateurs dont l'ordre d'intervention est complexe et variable. L'inflammation est évaluée par la mesure de plusieurs molécules produites par les cellules du système immunitaire dont les principales sont :

- les cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF-α (Tumor necrosis factor-α), les chimiokines comme MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) ou l'interleukine 8 (IL-8) et les interleukines IL-1, IL-6, IL-12 et IL18,
- les cytokines anti-inflammatoires incluant l'IL-10 et le TGF-β (Transforming growth factor- β),
- les interférons (IFN).

La protéine C réactive (CRP) est induite par des cytokines (surtout IL-6) et se fixe sur les microorganismes pathogènes. C'est également un marqueur de l'inflammation aigüe.

Les études relatives d'un effet pro-inflammatoire de l'Hcy sont peu nombreuses et discordantes. Une forte association a été observée entre l'HHcy modérée et les concentrations

plasmatiques en CRP, TNF-α et de l'IL-12 chez des patients atteints de maladies coronariennes (Schroecksnadel *et al.*, 2010) et l'augmentation de cytokines plasmatiques chez des patients ayant un syndrome coronarien aigu (Gokkusu *et al.*, 2010). Ces mêmes observations ont été faites chez des hommes sains présentant une HHcy comparativement à leurs contrôles sans HHcy (Yun *et al.*, 2011). Cependant, Asanuma *et al.* (2007) ont montré *ex vivo* que des concentrations élevées d'Hcy (50 et 100 µM) n'avaient pas d'effet sur celles de CRP, d'IL-6 ou encore de MCP-1 sur le sang total de sujets sains (Asanuma *et al.*, 2008).

Les effets pro-inflammatoires de l'HHcy ont également été étudiés *in vivo* chez l'animal. Da Cunha *et al*. (2011) ont montré qu'une HHcy chronique (induite par des injections sous-cutanées journalières d'Hcy pendant 28 jours) chez des rats Wistar induisait une augmentation significative des concentrations de TNF-α, IL-1β, IL-6 et MCP-1 dans le sérum et l'hippocampe (da Cunha *et al.*, 2011). De même, l'HHcy sévère induite chez des souris $ApoE^{-/-}$ $CBS^{-/-}$ était significativement corrélée avec les niveaux plasmatiques de TNF-α et MCP-1, en relation avec l'accumulation de monocytes inflammatoires dans les lésions athérosclérotiques (Zhang *et al.*, 2009a). Néanmoins, les effets de l'Hcy pourraient être différents selon les conditions physiopathologiques. Ainsi, un régime enrichi en Hcy pendant 5 mois n'a pas induit d'augmentation des facteurs de l'inflammation (IL-1α, IL-6, IL-10 et MCP-1) dans le cortex de rat normal et pourrait même atténuer l'inflammation induite par un régime enrichi en cholestérol sans toutefois reverser le déficit cognitif (Pirchl *et al.*, 2010; Pirchl *et al.*, 2012). De plus, les mêmes auteurs ont montré *in vitro* dans des cultures primaires de cellules microgliales de cortex cérébral, que l'inflammation causée par l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA, augmenté par l'hypercholestérolémie chez le rat) pouvait être contrecarrée par l'Hcy (Pirchl *et al.*, 2012). Cette dernière pourrait donc avoir un effet anti-inflammatoire *via* un mécanisme dépendant du t-PA. Par ailleurs, l'exposition de cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) et de macrophages à des concentrations d'Hcy entre 10 et 50 µM augmente l'expression de l'IL-8 et/ou du MCP-1 (Poddar *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001a).

Certains PDM pourraient jouer un rôle sur l'inflammation. Ainsi, une relation inverse entre les apports en folates et le niveau plasmatique d'IL-8 et de MCP-1 a été observée chez des patients ayant une insuffisance cardiaque (Chung *et al.,* 2011). La supplémentation en AF chez des volontaires sains en surpoids diminue les concentrations plasmatiques de MCP-1, d'IL-8 et de CRP (Solini *et al.*, 2006). Récemment, une étude a montré qu'une supplémentation médicamenteuse de Leucovorine (5-formyl-THF) pendant 17 mois chez une

enfant atteinte de la maladie de Alpers (maladie neurodégénérative) a amélioré son statut en 5-MTHFR, parallèlement à une réduction des concentrations circulantes d'IL-6 et d'IFN-γ, mais pas d'IL-8 (Hasselmann *et al.*, 2010). Peu d'études ont recherché une implication de la bétaine et de la choline dans l'inflammation. L'étude épidémiologique ATTICA réalisée sur 3042 personnes saines a montré qu'une consommation de choline >310 mg/j diminue en moyenne les concentrations de CRP de 20%, d'IL-6 de 26% et de TNF-α de 6% (Detopoulou *et al.*, 2008). Une consommation de bétaine >360 mg/j a des effets similaires sur la CRP (-19%) et le TNFα (-12%) mais n'a curieusement pas d'impact sur l'IL-6 (Detopoulou *et al.*, 2008).

Les effets de l'Hcy sur l'inflammation pourraient donc dépendre de sa concentration circulante, mais des études sont encore nécessaires pour en comprendre les mécanismes. L'hypothèse d'un effet bénéfique des apports en PDM sur l'inflammation mérite également de nouvelles investigations.

III. 1. 5. Prolifération, apoptose et nécrose cellulaire

La prolifération des cellules vasculaires musculaires lisses (CVML) est fréquemment observée dans l'athérosclérose. La déficience en folates peut perturber la prolifération cellulaire et l'apoptose. En effet, il a été montré qu'une déficience en folates pouvait altérer la prolifération de colonocytes humains immortalisés et de cellules souches neurales de rat (Duthie *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009b). L'exposition de lymphocytes humains à un milieu déficient en folates pendant 4 jours, conduirait à une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire et une diminution du nombre de cellules en phase G0/G1, suggérant un arrêt de leur prolifération (Lin *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'apoptose de ces cellules était activée.

Les phénomènes apoptotiques sont évalués par une famille de protéases spécifiques : les caspases. Une déficience en folates de 14 jours entraîne une augmentation significative de l'activité polycaspase (1, 3, 4-9) dans des colonocytes humains en culture (Duthie *et al.*, 2008). Cependant, la mort cellulaire induite par ces protéases n'alerte pas le système immunitaire. En effet, les débris cellulaires sont éliminés par les cellules voisines ou par les macrophages et les neutrophiles. Après phagocytose, ces débris sont détruits par les enzymes lysosomales. L'apoptose joue un rôle crucial dans la régulation du renouvellement cellulaire et, de ce fait, des protéines. La survie de cultures primaires de cellules neuronales de souris est aussi significativement diminuée après exposition à un milieu déficient en méthionine et folates ou à un supplément d'Hcy (Kruman *et al.*, 2002). L'Hcy intervient également dans ces

phénomènes. L'induction de l'apoptose (*via* l'activation de la caspase 3) par des concentrations pathophysiologiques d'Hcy (respectivement 50 et 30 µM) a également été observée dans des cellules HUVEC et la lignée de cellules hépatiques Sk-Hep-1 (Birch *et al.*, 2009). Une préincubation en présence de certaines formes de la cobalamine peut freiner ce processus d'apoptose, mais aussi la nécrose induite après exposition à l'H_2O_2 (25 et 50 µM).
La choline et la bétaine semblent également avoir un impact sur l'apoptose et/ou la nécrose cellulaire. Une étude a montré que le nombre de lymphocytes humains en apoptose ou en nécrose était inversement proportionnel avec les concentrations en AF et/ou en choline du milieu de culture (Lu *et al.*, 2012b). Les effets protecteurs des folates se révélaient toutefois supérieurs à ceux de la choline. Un régime déficient en choline (pendant 42 jours) chez des sujets sains âgés de 18 à 70 ans induit une augmentation de l'apoptose de leurs lymphocytes (da Costa *et al.*, 2006). Cette altération disparaît partiellement après retour à un régime suffisant en choline. La bétaine a aussi un effet protecteur sur la nécrose et l'apoptose de cellules hépatiques en culture ou sur les hépatocytes de rats *in vivo* (Graf *et al.*, 2002; Oliva *et al.*, 2012).

III. 2. Molécule cibles

III. 2. 1. Les acides nucléiques

Les PDM jouent un rôle important dans le métabolisme des acides nucléiques. Ils contribuent à la méthylation de l'ADN et à la synthèse de l'acide thymidylique et des bases puriques. L'altération de ces mécanismes affecte particulièrement la stabilité de l'ADN.

III. 2. 1. 1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un élément de la régulation épigénétique affectant les cytosines des îlots CpG durant, notamment, le développement embryonnaire, et déterminant au final, l'expression de gènes cibles. Les PDM jouent un rôle important puisqu'ils sont nécessaires à la synthèse de la méthionine, préalablement à son activation en SAM, le principal donneur de méthyle de l'organisme. Une déficience en PDM se traduit fréquemment par une réduction de la concentration cellulaire et/ou circulante de SAM. Chez des patients anémiés par une déficience en cobalamine, le ratio SAM/SAH sanguin est diminué du fait d'une augmentation de la concentration de SAH, mais il peut être normalisé par l'injection de cobalamine (Guerra-Shinohara *et al.*, 2007). Une étude réalisée au Brésil sur des femmes enceintes âgées en moyenne de 25 ans, a montré que plus les concentrations plasmatiques de cobalamine étaient

basses, plus celles de SAH étaient élevées et celle de SAM étaient faibles, entraînant ainsi une diminution du ratio SAM/SAH (Guerra-Shinohara *et al.*, 2004). Cette situation a aussi été observée au niveau de la veine placentaire. Un régime alimentaire déficient en choline diminuerait également les concentrations tissulaires de SAM chez l'animal (Zeisel *et al.*, 1989). Le ratio SAM/SAH était altéré dans le cœur de ratons nés de mères nourries avec un régime carencé en PDM (choline, folates et vitamine B12) (Garcia *et al.*, 2011). Or, la diminution de ce ratio pourrait avoir un impact sur la méthylation de l'ADN. Il a ainsi été montré qu'une diminution de la disponibilité de la SAM, au cours de la déficience en PDM, entraînait une hypométhylation globale de l'ADN. Ceci a été mis en évidence dans le cas des cellules du sang chez des hommes et des femmes ayant un statut en folates bas (Wang *et al.*, 2012a). Chez la souris gestante, une alimentation déficiente en choline induisait une diminution de la méthylation globale de l'ADN dans l'hippocampe du fœtus (Niculescu *et al.*, 2006). Le même phénomène a été rapporté dans le foie et le colon de rats nourris avec un régime déficient en folates pendant 24 semaines, conjointement à une diminution du ratio SAM/SAH hépatique (Duthie *et al.*, 2010). Une autre étude chez la même espèce montre un impact similaire d'une déficience nutritionnelle en vitamine B12 sur le colon (Choi *et al.*, 2004). Or, l'hypométhylation de l'ADN peut activer des proto-oncogènes et induire des tumeurs malignes, notamment chez l'homme (Arasaradnam *et al.*, 2008). De plus, une déficience en PDM peut induire une hyperméthylation de certaines régions spécifiques de l'ADN, entraînant une inhibition de l'expression de gènes comme les gènes suppresseurs de tumeur. Ceci a été rapporté dans le cas du gène *p53* au niveau du colon de souris nourries avec un régime déficient en folates et vitamine B12 (Liu *et al.*, 2008). Les mécanismes du développement de cancers au cours de la déficience en PDM pourraient impliquer une augmentation des ADN methyltransférases (Dnmt). Ces enzymes catalysent le transfert du groupement méthyle de la SAM sur un résidu cytosine. Chez des rats déficients en méthionine, choline et folates, et développant une hépatocarcinogenèse, il a, en effet, été observé une diminution simultanée des concentrations hépatiques de SAM et une augmentation des niveaux de l'ARNm et de la protéine Dnmt1, susceptibles d'entraîner une hyperméthylation de gènes importants dans le processus néoplasique (Ghoshal *et al.*, 2006). Indépendamment de la diminution de la disponibilité de leur substrat, les Dnmt pourraient donc être surexprimées et contribuer ainsi aux effets délétères de la déficience en PDM. *In vitro*, une déficience en folates peut aussi provoquer une hypométhylation globale de l'ADN, par exemple dans des colonocytes humains; cet effet étant réversible après ré-exposition à un

milieu complet (Pogribny *et al.*, 2004; Wasson *et al.*, 2006). Une telle réversibilité n'a cependant pas été retrouvée *in vivo* au niveau leucocytaire après une supplémentation en AF d'hommes et de femmes présentant initialement une HHcy modérée (Jung *et al.*, 2011).

III. 2. 1. 2. Incorporation inadéquate d'uraciles

La déficience en folates et vitamine B12 entraîne une perturbation de la synthèse de dTMP du fait d'un défaut de méthylation du dUMP (Fenech, 2012). Cette dernière molécule s'accumule alors dans la cellule au détriment du dTMP et peut être alors incorporée par erreur dans l'ADN au cours de sa synthèse (« misincorporation » d'uraciles). Une incorporation inadéquate d'uraciles dans l'ADN peut survenir au cours d'une déficience en PDM, indépendamment d'une HHcy (Achon *et al.*, 2009). Ainsi, l'incorporation d'uracile dans l'ADN de colonocytes exposés à un milieu déficient en folates a été montrée 5 fois plus élevée que dans des cellules contrôles après 14 jours (mais inchangée après 7 et 10 jours) (Duthie *et al.*, 2008). De même, ce niveau dans l'ADN de lymphocytes humains en culture, ainsi que la quantité de cassures de brins, étaient inversement proportionnels à la quantité d'AF apportée par le milieu (Duthie *et al.*, 1998).

Des études *in vivo* ont également montré l'effet de la déficience en certains PDM, principalement les folates, sur l'incorporation inadéquate d'uracile dans l'ADN. Chez le rat, une incorporation anormale d'uraciles dans l'ADN a été rapportée au niveau colique ou lymphocytaire, après respectivement ingestion d'un régime déficient en vitamine B12 pendant 10 semaines ou en folates pendant 24 semaines (Choi *et al.*, 2004; Duthie *et al.*, 2010). De même, chez des souris, un régime déficient en folates a induit une augmentation de l'incorporation d'uraciles dans l'ADN par la diminution de l'expression de l'enzyme TDG (Thymine DNA glycosylase) qui excise les appariements aberrants U-G (Uracile-Guanine) présents (Knock *et al.*, 2011). Il faut toutefois noter qu'une supplémentation avec 1 mg/jour d'AF pendant 3 ans n'a pas entraîné de diminution de ce processus dans les leucocytes, ainsi que dans la muqueuse colorectale de patients américains présentant un adénome à ce niveau (Hazra *et al.*, 2010).

Les études sur cellules et chez l'animal montrent que la déficience en folates, entraîne principalement une incorporation anormale d'uraciles dans l'ADN. Or, l'incorporation de dUMP dans l'ADN, au lieu de la dTMP, va non seulement induire des mutations mais aussi générer des cassures simples et double brins de l'ADN, des cassures chromosomiques et la formation de micronoyaux. La perturbation des deux processus de méthylation est souvent

observée dans la cancérogenèse. Ceci pourrait, en partie, expliquer l'association existante entre la carence en folates et le développement de certains cancers.

III. 2. 1. 3. Stabilité/réparation

Une des conséquences de l'incorporation d'uraciles dans l'ADN et de son hypométhylation est la formation de micronoyaux **(Figure 22)**.

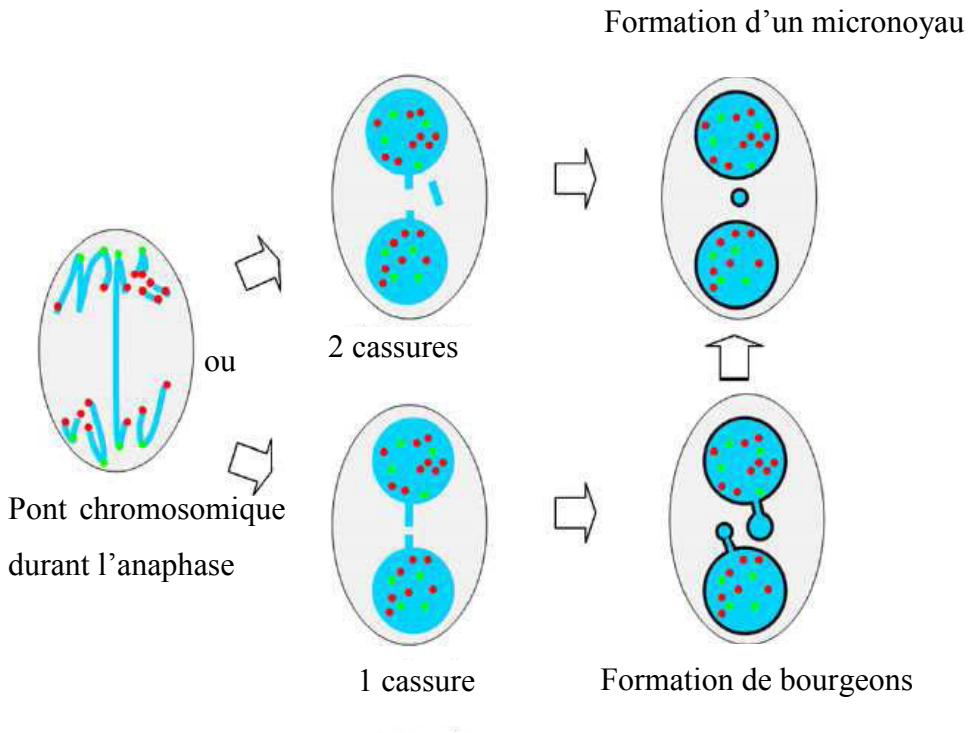


Figure 22 : Conséquences de l'altération de la méthylation de l'ADN et de son incorporation anormale d'uraciles. *D'après Lindberg et al., 2007*

Les micronoyaux se forment dès qu'un chromosome ou un fragment de chromosome n'est pas incorporé dans l'un des noyaux fils lors de la division cellulaire. Il a été mis en évidence qu'une déficience en folates et, à un degré moindre, en choline, augmentait la fréquence des micronoyaux et des bourgeons nucléaires dans des lymphocytes humains sains en culture *ex vivo* (Lindberg *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2012b). Ce phénomène a aussi été inversement corrélé à la concentration sérique d'AF et de vitamine B12 dans les lymphocytes de volontaires sains âgés de 22 à 56 ans (Milić, 2010). Peu d'études ont spécifiquement analysé l'impact de l'apport en choline sur l'intégrité de l'ADN et des chromosomes. Une augmentation des dommages à l'ADN a toutefois été rapportée au niveau des lymphocytes de sujets sains âgés

de 18 à 70 ans après 42 jours de consommation d'un régime déficient en choline (da Costa *et al.*, 2006). Une supplémentation en folates seuls ou combinés à la vitamine B12 atténuait l'augmentation de la fréquence des micronoyaux dans les lymphocytes de patients souffrant d'insuffisance rénale (Stopper *et al.*, 2008). Les folates sont aussi particulièrement impliqués dans la réparation de l'ADN. Il a été montré qu'une déficience de 14 jours dans des colonocytes humains entraîne *ex vivo*, une augmentation des cassures de l'ADN et une diminution des capacités cellulaires à les réparer (Duthie *et al.*, 2008). Cette augmentation des dommages à l'ADN a également été décrite dans le cas d'autres lignées cancéreuses de l'épithélium colique humain après 32 jours de déficience (Crott *et al.*, 2008). L'organisme dispose alors de systèmes de réparation de l'ADN. La déficience nutritionnelle en folates chez des rats augmente de 25% l'activité d'enzymes jouant un rôle dans la réparation de l'ADN (OGG-1 : O-alkylguanine-DNA alkyltransférase et MGMT : méthylguanine méthyltransférase) (Duthie *et al.*, 2010).

Une autre cible de la déficience en PDM est l'ADN mitochondrial (ADNmt), celui-ci est en renouvellement permanent aussi bien dans les cellules se divisant que dans celles différenciées. Un régime déficient en folates, dans le cerveau de souris âgées $Ung^{-/-}$ (modèle n'exprimant pas l'uracil-DNA glycosylase qui catalyse l'élimination des uraciles anormalement incorporées à l'ADN) entraîne la délétion d'un fragment chromosomique de l'ADNmt (Kronenberg *et al.*, 2011). La déficience en folates pourrait donc contribuer à la neurodégénération *via* l'altération de l'ADNmt (Fenech, 2010). Cette dernière peut induire une modification du nombre, de la taille et de la fonction des mitochondries, avec des conséquences délétères sur l'apport en énergie aux tissus, notamment le cerveau et le cœur dont les besoins sont élevés (Chang *et al.*, 2007; Chou *et al.*, 2007; Mancuso *et al.*, 2007; Chou *et al.*, 2009).

La méthylation et la réparation de l'ADN sont au cœur de la régulation épigénétique. Du fait de son implication dans ces processus, la déficience en PDM influe sur l'expression des gènes.

III. 2. 2. Expression génique

L'expression d'un grand nombre de gènes peut être affectée par une déficience nutritionnelle en PDM et une HHcy. Une étude a identifié 135 gènes affectés par l'HHcy et intervenant dans

le métabolisme et le transport des lipides, le stress oxydant et le stress du RE (Sharma *et al.*, 2006). L'effet de l'HHcy sur l'expression de gènes pourrait, en partie, être lié à l'élévation de SAH qui inhibe les réactions de transméthylation, altérant ainsi la méthylation des gènes (Jiang *et al.*, 2007).

Un des principaux risques d'une déficience maternelle en folates mais aussi en vitamine B12 et en choline est l'apparition d'une AFTN chez le fœtus. Des mécanismes épigénétiques tels que l'altération de la méthylation globale de l'ADN, de la méthylation d'histones ou le remodelage de la chromatine, des déterminants importants de l'expression génique, sont associés aux AFTN lors de la déficience en PDM (Greene *et al.*, 2011). La déficience en méthionine, AF et choline chez le rat modifie l'expression de 33 gènes intervenant notamment dans le développement du système nerveux, en relation avec les mécanismes épigénétiques décrits précédemment (Pogribny *et al.*, 2008). Champier *et al.* (2012) ont montré qu'une déficience nutritionnelle en folates induisait la surexpression de 64 gènes et la sous-expression de 5 autres dans le foie de souris (Champier *et al.*, 2012). Ces gènes codaient pour des protéines membranaires et mitochondriales et intervenaient principalement dans la dégradation des acides gras. L'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du rythme circadien et dans la synthèse des lipides est également perturbée par la déficience en folates.

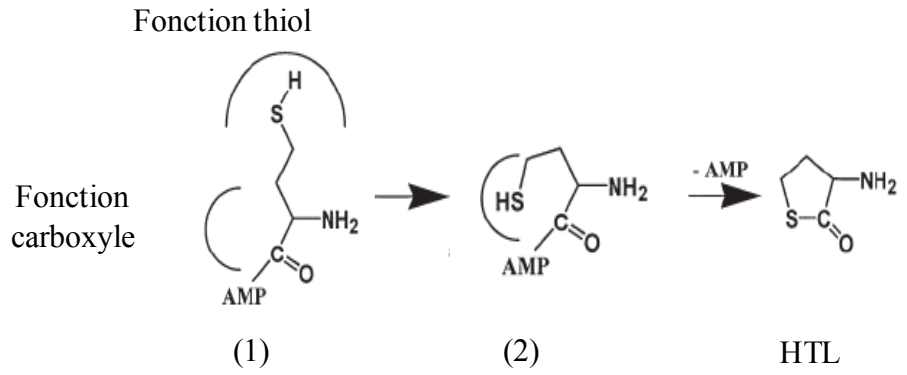
Par ailleurs, chez le rat, les apports maternels en choline en période prénatale ont un impact sur la vitesse de croissance des tumeurs du sein induites chimiquement chez la progéniture, les 2 paramètres étant en effet inversement corrélés (Kovacheva *et al.*, 2009). La supplémentation des mères en choline induisait dans les tumeurs notamment la sous-expression de 10 gènes associés à un pronostique défavorable parmi lesquels *jag1* (jagged 1) et *Bcar3* (Breast cancer antieostrogen resistence 3). L'étude a également mis en évidence une hyperméthylation et une expression réduite du gène *Sfn* (Stratifin) en situation de déficience en choline. Les apports en choline mais aussi en folates et vitamine B12 pourraient donc contribuer à la régulation épigénétiques et être ainsi capables d'affecter l'expression génique chez la génération suivante.

III. 2. 3. Protéines

La déficience en PDM et l'HHcy peuvent affecter l'abondance et la fonction des protéines cellulaires *via*, par exemple, l'homocystéinylation et la carbonylation.

III. 2. 3. 1. Homocystéinylation

Une des modifications post-traductionnelles (MPT) affectant la fonctionnalité des protéines est l'homocystéinylation de leurs résidus amino-acyles. Comme présenté dans la **Figure 23**, l'HTL, thioester cyclique de l'Hcy, est générée suite à l'incorporation erronée par la methionyl-tRNA synthase (MetRS) d'une Hcy au lieu d'une méthionine dans une séquence protéique. L'Hcy forme alors une liaison amide avec un résidu lysine dans la protéine **(Figure 24)**.



AMP : adénosine monophosphate; ATP : adénosine triphosphate; HTL : homocystéine thiolactone; MetRS : méthionyl-tRNA synthase; PPi: diphosphate inorganique

Figure 23 : Formation de l'homocystéine-thiolactone. *D'après Jakubowski et al. 2000*

Le mécanisme de synthèse implique 2 étapes :

(1) Le groupement carboxyle de l'Hcy est activé par l'ATP et lie l'AMP :

MetRS + Hcy + ATP ⟶ MetRS + Hcy + AMP + PPi

(2) Cyclisation de la molécule : la fonction thiol de l'Hcy a un impact sur la chaîne latérale : elle se lie au groupement carboxyle et forme l'HTL en libérant l'AMP.

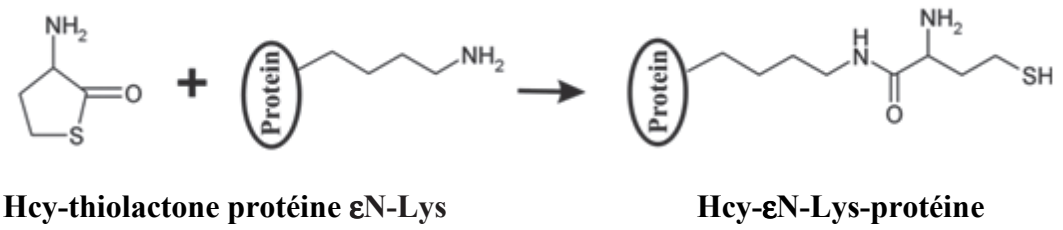


Figure 24 : Homocystéinylation des résidus lysyles de protéines. Les Hcy-εN-Lys-protéines contiennent un résidu Hcy relié par une liaison amide à un résidu lysine. *D'après Jakubowski, 2000*

Des HHcy génétiques et nutritionnelles conduisent à une augmentation de la formation d'HTL, que ce soit chez l'homme ou l'animal (Borowczyk *et al.*, 2012; Khodadadi *et al.*, 2012). Ainsi, un régime enrichi en méthionine, ainsi que les génotypes $CBS^{-/-}$ et $MTHFR^{-/-}$, induisent une augmentation des concentrations plasmatiques d'HTL chez la souris; le même effet a été observé chez des patients homocystinuriques (Glowacki *et al.*, 2010). L'homocystéinylation introduit dans les protéines de nouveaux résidus thiols qui peuvent s'oxyder et former des ponts disulfures, conduisant à des malformations structurales et fonctionnelles et à leur agrégation (Jakubowski, 2000). Les protéines circulantes telles que l'albumine et le fibrinogène sont facilement homocystéinylées et ont été de ce fait, les plus étudiées (Jakubowski, 2011). Il a notamment été montré que des concentrations élevées en HTL entraînaient une augmentation de la polymérisation du fibrinogène en fibrine dans le plasma humain sain et par voie de conséquence, du risque de formation de caillots sanguins (Malinowska *et al.*, 2011). L'agrégation des protéines homocystéinylées pourrait contribuer aux pathogenèses neurodégénératives ou cardiovasculaires (Paoli *et al.*, 2010). En effet, la neurotoxicité du peptide amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer pourrait être liée à l'effet de l'homocystéinylation de certains de ses résidus lysyles sur son accumulation cellulaire, comme observé dans le modèle de cellules neuronales immortalisées PC12 (Khodadadi *et al.*, 2012).

III. 2. 3. 2. La carbonylation

Une autre conséquence possible de la déficience en PDM et de l'HHcy associée est la carbonylation des protéines du fait de la génération d'un stress oxydant. Cette MPT oxydative est irréversible. La formation de groupements carbonyles (aldéhydes ou cétones) dans les protéines peut s'effectuer par différents mécanismes. Tout d'abord, les résidus lysine, arginine, proline et thréonine sont particulièrement sensibles à l'oxydation catalysée par les métaux. De plus, des dérivés carbonylés peuvent se former sur des résidus lysine, cystéine et histidine par des réactions secondaires avec des sucres réducteurs ou des composés dicarbonylés dérivés des sucres (produits de glycoxydation et produits finaux de glycation avancée ou AGEs) (Aldini *et al.*, 2006). Enfin, la formation de carbonyles peut résulter d'une interaction entre des résidus amino acyles protéiques et des produits de la peroxydation lipidique, tels que le HNE ou le MDA (Vieira *et al.*, 2000; Poli *et al.*, 2008b). Les protéines carbonylées doivent être dégradées par le système protéolytique puisqu'elles sont irréparables. Si leur quantité est trop importante, elles ne peuvent être éliminées par le système protéolytique, ce qui perturbe l'activité cellulaire. Une augmentation de la carbonylation de

certaines protéines a ainsi été mise en évidence dans le myocarde de patients souffrant d'une insuffisance cardiaque mais également en *post-mortem* dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Barone *et al.*, 2011; Brioschi *et al.*, 2012). Il en est de même dans le cas de protéines plasmatiques de jeunes patients atteints d'homocystinurie : un traitement de 11 ans avec la pyridoxine, l'AF, la bétaine et la vitamine B12 a pu ramener leur niveau total de carbonylation à celui des protéines plasmatiques de sujets sains (Vanzin *et al.*, 2011).
Une augmentation de la carbonylation protéique a aussi été observée chez le rat au cours d'une stéatose hépatique induite par l'éthanol mais pas dans le cas d'une stéatose induite par une déficience en choline (Domenicali *et al.*, 2005; Galligan *et al.*, 2012). Dans ce dernier cas, les protéines hépatiques deviennent plus sensibles à la carbonylation chez des rats ischémiés/reperfusés après un jeûne de 18 h (Domenicali *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été observé une augmentation de la quantité de HNE dans le foie de souris ayant une stéatose hépatique provoquée par une déficience en choline (Min *et al.*, 2012). Le statut altéré en choline pourrait donc induire une peroxydation des lipides conduisant à la formation de HNE qui a la capacité de se lier à certains acides aminés (Poli *et al.*, 2008a). Or l'augmentation de la formation de carbonyles a été régulièrement retrouvée dans le développement de pathologies cardiovasculaires, neurodégénératives et de cancers (Negre-Salvayre *et al.*, 2008). La carbonylation des protéines est également augmentée chez le rat après une déficience nutritionnelle en folates, notamment *ex vivo* au niveau des mitochondries d'hépatocytes isolés (Chang *et al.*, 2007). Une supplémentation en AF du milieu de culture de ces cellules permet de diminuer le niveau de carbonylation protéique. Hung *et al.* ont même tenté de cibler les protéines sensibles à la carbonylation. Leur étude protéomique a permis d'identifier GRP75, la tropomyosine et de la vimentine comme cibles dans des cellules musculaires lisses de rats exposées à une concentration d'Hcy de 100 µM (Hung *et al.*, 2009). Ces changements pouvaient être atténués en présence d'un extrait végétal antioxydant (le salvia miltorrhiza).

III. 2. 3. 3. Les protéines de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle essentiel dans le soutien structural, l'adhérence, le mouvement et la régulation de la cellule. Les constituants de la MEC ont de nombreux domaines de liaison avec les cellules, facilitant leur adhérence mutuelle et leur organisation en tissus. Les principales macromolécules de la MEC sont des polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycanes) et des protéines fibreuses, de structure (collagènes et élastine) ou d'adhérence (fibronectine et laminine), jouant un rôle important dans les

interactions cellule-cellule et cellule-MEC (Labat-Robert, 2012). Le remodelage cellulaire constitue un processus physiologique nécessaire pour la morphogenèse des tissus et la réparation cellulaire et entraîne une dégradation de la MEC. Cette dégradation est hautement régulée et dépendante des métalloprotéinases (MMP) et de leur inhibiteurs, TIMP (Brew *et al.,* 2010). Il existe 23 isoformes de MMP qui ont pour rôle de dégrader les protéines de la MEC (Murphy *et al.,* 2008). L'Hcy agirait sur la structure de la MEC. En effet, une étude récente réalisée in vitro et ex vivo avec des fibroblastes humains en culture a montré que la fibronectine pouvait être homocystéinylée et ainsi causer une diminution de sa liaison avec la fibrine, ces deux protéines jouant un rôle dans l'adhérence des différents constituants de la matrice (Hubmacher *et al.,* 2011). Les MMP sont des marqueurs de l'altération de la MEC : leur expression, généralement faible dans les tissus sains, augmente lors des processus de remodelage tissulaire pathophysiologiques via l'action des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). L'Hcy à une concentration de 0,3 mM, induit une augmentation de l'abondance et de l'activité de MMP-9 dans des macrophages péritonéaux de souris en culture (Lee *et al.,* 2012). De plus, l'Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK), un membre de la famille des MAPK, jouerait un rôle prépondérant dans l'induction de MMP-9 par l'Hcy. Il a aussi été montré que la SAH pouvait augmenter la quantité de MMP-2 dans des cellules microgliales (Lin *et al.*, 2009). Ces différentes observations montrent que l'excès d'Hcy dans les cellules pourrait perturber l'organisation de la MEC et augmenter l'activation des MMP et par conséquent, conduire à la rupture de la plaque d'athérome (Holven *et al.*, 2006).

III. 2. 4. Lipoprotéines et lipides intracellulaires

Les lipoprotéines (LP) sont de grands complexes de protéines et de lipides, hydrosolubles, qui transportent ces derniers dans tout l'organisme. Les LP de très faible densité (VLDL : very low density lipoproteins), de densité intermédiaire (IDL : intermediary density lipoproteins) et de faible densité (LDL: low density lipoproteins) transportent les lipides endogènes du foie vers les tissus utilisateurs. Les LP de haute densité (HDL : high density lipoproteins) transportent le cholestérol des tissus vers le foie. Leur membrane externe est une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et une ou plusieurs apolipoprotéines (par exemple ApoA, ApoB, etc.) et, leur partie centrale contient des triglycérides (TG), des esters de cholestérol et d'autres molécules en petites quantités comme des vitamines liposolubles.

Plusieurs études ont établi un lien entre une déficience en PDM, une HHcy et les lipides. Ainsi, une étude épidémiologique sur 317 jeunes de 13 à 17 ans a montré que les facteurs de

risque de l'HHcy chez ces adolescents étaient le polymorphisme du gène MTHFR C677T, la déficience en folates ainsi que celle en cHDL (fraction du cholestérol dans les HDL) (Gil-Prieto *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'HHcy est également corrélée (i) positivement à l'hypertriglycéridémie, un autre facteur de risque d'athérosclérose, chez des patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (Fimognari *et al.*, 2009) et (ii) négativement aux concentrations plasmatiques de cHDL et d'ApoAI, le principal constituant des HDL, chez des patients ayant subi une angiographie coronarienne (Xiao *et al.*, 2011). De même, les niveaux circulants d'Hcy, de LDL et de LDL oxydés de patients ayant une athérosclérose étaient plus élevés que ceux de sujets sains, tandis que l'inverse était observé pour les niveaux de folates, de HDL et d'ApoAI. Le niveau de vitamine B12 était en revanche similaire dans les 2 groupes (Seo *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été rapportés dans des modèles animaux d'HHcy. Ainsi, Mikeal *et al.* (2009) ont montré que l'HHcy de souris $MTHFR^{+/-}$ était corrélée à une hypertriglycéridémie due à une diminution de la concentration d'ApoAI (Mikael *et al.*, 2009). Des études sur des cellules endothéliales en culture et sur le plasma humain ont, de plus, montré que l'Hcy peut se fixer sur les ApoB (Zinellu *et al.*, 2006; Zinellu *et al.*, 2009). Cette homocystéinylation des apolipoprotéines peut induire un stress oxydant, une altération des LDL et une dysfonction endothéliale comme nous le verrons dans le chapitre 4.

Des concentrations plasmatiques élevées de bétaine ont, par ailleurs, été associées à des quantités faibles de cholestérol non HDL (correspondant au cholestérol allant vers les tissus pouvant provoquer un risque de surcharge en cas d'excès) dans une cohorte de patients atteints de maladie des artères coronaires (Lever *et al.*, 2011). Ceci est à rapprocher de l'utilisation régulière de régimes déficients en bétaine ou en choline pour générer des modèles animaux de stéatose hépatique (Fu *et al.*, 2010b; Marcolin *et al.*, 2011). En effet, l'absence de choline, indispensable à la synthèse des VLDL, bloque le transport des TG à l'extérieur des hépatocytes conduisant à leur accumulation intracellulaire. Les concentrations plasmatiques en TG, cholestérol et phospholipides sont néanmoins aussi augmentées par une déficience nutritionnelle en choline chez le rat (Grattagliano *et al.*, 2000).

L'action des PDM sur le statut lipidique pourrait résulter de leur impact sur l'expression de gènes, notamment ceux intervenant dans la régulation de la synthèse ou de la β-oxydation des acides gras. En effet, le niveau des ARNm des gènes des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR), notamment PPARα et PPARγ, était augmenté de 25% dans le foie de rates gestantes nourries avec un régime déficient en folates, choline et méthionine (McNeil *et al.*, 2008). Les PPAR sont des protéines de la superfamille des

récepteurs nucléaires liant naturellement les lipides. PGC-1α joue un rôle de coactivateur transcriptionnel, notamment sur l'activité des PPAR. Sous la forme de dimères, ces derniers agissent comme des facteurs de transcription d'une variété de gènes, dont certains participent au métabolisme des lipides et à l'adipogenèse. Le PPARα aurait une action sur le niveau de cHDL en induisant la transcription d'ApoAI (Mikael *et al.*, 2006).

III. 2. 5. Métabolisme énergétique mitochondrial

La déficience en PDM et l'excès d'Hcy pourraient être impliqués dans l'altération mitochondriale. Ainsi, l'activité de la carnityl palmito-transférase (CPT I) et la vitesse de la β-oxydation hépatiques étaient diminuées chez le rat ayant développé une stéatose suite à un régime déficient en choline (Serviddio *et al.*, 2011) *(Cf. encadré*)*. Par contre, la déficience en folates et vitamine B12 n'induisait pas de modification de l'activité CPT I mais altérait la vitesse d'oxydation du palmitoyl-coA (Pooya *et al.*, 2012). Dans le modèle d'HHcy sévère chez la souris $CBS^{-/-}$, l'activité des acétyl-CoA acétyltransférases intervenant dans la quatrième et dernière étape de la β-oxydation est significativement diminuée (Namekata *et al.*, 2004).

*La mitochondrie joue un rôle clé dans la production d'énergie et particulièrement en situation de carence nutritionnelle. Elle a un rôle central dans la β-oxydation des acides gras en acétyl-CoA, laquelle délivre des coenzymes réduits (NADH et $FADH_2$) utilisés pour la synthèse d'ATP. Les acides gras à chaînes courte et moyenne (C < 10) peuvent directement entrer dans la mitochondrie alors que ceux à longue chaîne (C > 11) y sont transportés *via* un processus multi-enzymatique. Dans le cytosol, l'acide gras libre est activé par une liaison thioester au coenzyme A (CoA) sous l'action de l'acyl-CoA synthétase. Le groupe acyl ainsi fixé est ensuite transféré sur la carnitine sous l'action de la carnitine acyl-transférase (encore appelée carnitine palmitoyltransferase I, CPT I) située dans la membrane externe mitochondriale. Puis l'acyl-carnitine est transférée à travers la membrane vers la matrice mitochondriale grâce aux 2 autres enzymes du système carnitine palmitoyltransferase : la carnitine-acylcarnitine translocase (CAT) et la carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) situées dans la membrane interne mitochondriale.

Les PPAR participent au contrôle de la β-oxydation mitochondriale. L'activation de PPARα par les fibrates augmente l'expression de CPT I dans le foie et le muscle de hamster soumis à un apport hyperlipidique durant 3 jours (Minnich *et al.*, 2001). Une déficience maternelle en folates et vitamine B12 alimentaires induit une hypométhylation de PGC-1α dans le foie de ratons de 21 jours, ce qui entraîne une diminution de l'interaction PGC-1α/PPAR et donc

également de l'expression de gènes de la β-oxydation des acides gras (Garcia *et al.*, 2011). La β-oxydation serait donc perturbée par une déficience en PDM et une HHcy.

Des études ont montré que la déficience en certains PDM peut également altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire *(Cf. encadré*)*. Une diminution de l'activité des complexes I et II a ainsi été observée dans le foie de ratons issus de mères déficientes en PDM (Pooya *et al.*, 2012). Le fonctionnement de la chaîne respiratoire pourrait aussi être altéré du fait du déséquilibre pro-oxydant généré par l'accumulation d'Hcy. En effet, cette dernière, ainsi qu'une supplémentation en méthionine, modifient la génération de ERO (H_2O_2) au niveau des complexes I et III de différents tissus (cœur, foie, cerveau et rein) du rat (Gomez *et al.*, 2011).

*La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne mitochondriale. Cette chaîne de transport d'électrons est constituée de quatre complexes protéiques : complexe I : NADH-coenzyme Q oxydoréductase, complexe II : succinate-coenzyme Q oxydoréductase, complexe III : coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase et complexe IV : cytochrome c oxydase. Une grande partie de l'énergie produite dans les voies cataboliques se retrouve contenue dans le NADH et le $FADH_2$ (flavin adenine dinucleotide); elle sera convertie en ATP dans la mitochondrie.

IV. DEFICIENCE EN PDM ET PHYSIOPATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES (CV)

IV. 1. Anatomie du système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est constitué du cœur, des artères et des veines pour le transport du sang. Les capillaires assurent la continuité entre les artères et les veines; ils forment un réseau dense permettant l'irrigation des tissus.

IV. 1. 1. Le cœur

Chez l'homme, le cœur est un organe musculaire creux qui se situe dans le médiastin, 2/3 à gauche et 1/3 à droite de la ligne médiane. Il assure la circulation du sang dans tout l'organisme, permettant aux cellules de recevoir l'oxygène et les nutriments. Chaque jour, il pompe l'équivalent de 8000 litres de sang pour un équivalent de 100 000 battements cardiaques.

Constitué de deux oreillettes et deux ventricules, le cœur est aussi séparé par le septum en deux parties, droite et gauche **(Figure 25)**. Sa structure est constituée de 3 parties :

- **l'endocarde**, où passent les nerfs et les vaisseaux sanguins,
- **l'épicarde**, membrane séreuse formant la paroi interne du péricarde,
- **le myocarde**, partie véritablement active du cœur, constitué de 3 types de cellules (les cardiomyocytes contractiles, les cellules nodales et les cellules endocrines).

Le tissu cardiaque est constitué pour 30% de cardiomyocytes qui représentent 75% du volume total du myocarde et assurent la contraction musculaire (Zak, 1973; Frank *et al.*, 1974; Joseph *et al.*, 2002).

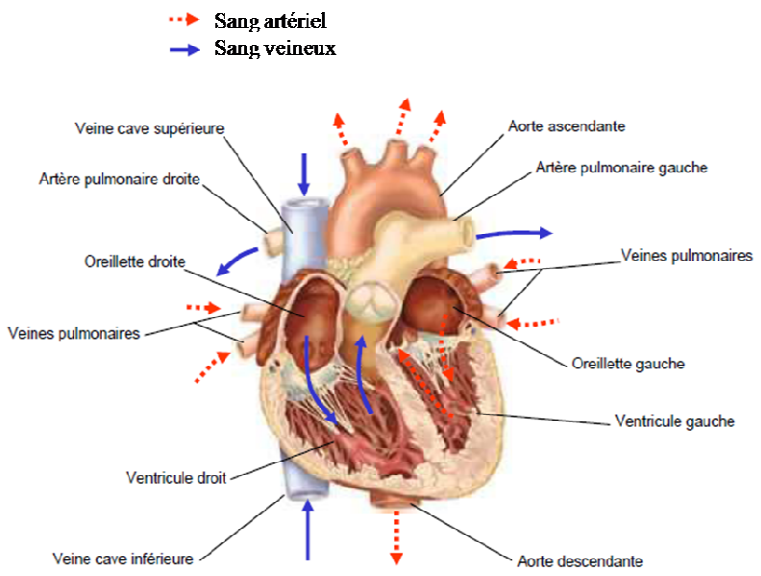


Figure 25 : Anatomie du cœur.

L'activité cardiaque est un phénomène constitué de deux phases, la systole et la diastole :

- la systole est la phase de contraction du muscle cardiaque (myocarde) durant laquelle les ventricules se remplissent de sang, puis sous l'effet de la pression, l'éjectent dans l'aorte et l'artère pulmonaire.
- la diastole est la phase durant laquelle le ventricule du myocarde se relâche. L'ouverture des valvules auriculo-ventriculaires permet simultanément le passage du sang des oreillettes vers les ventricules. Leur fermeture signe la fin du remplissage ventriculaire et le début d'une nouvelle systole.

Le cœur se développe progressivement à partir de la 3ème semaine de la vie embryonnaire; il est le premier organe fonctionnel de l'organisme. Le stade postnatal est marqué par la fin de l'hyperplasie cellulaire. Au stade adulte, l'augmentation de la masse musculaire est essentiellement due à l'augmentation de la taille des cardiomyocytes. Ces derniers sont à la base de l'activité contractile du cœur. Chez le rat, 90% des cardiomyocytes sont binucléés (seulement 50% chez l'homme).

Le myocarde est composé de cellules myocytaires, contractiles et non-myocytaires dont la cohésion est assurée par un squelette fibreux formé par la MEC. L'organisation et la proportion de chaque type cellulaire ainsi que les interactions entre chaque composant vont influer le développement et la fonction du cœur. Parmi les cellules dites non-myocytaires, on

distingue les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Baudino *et al.*, 2006).

IV. 1. 1. 1. Les cellules myocytaires

✔ La fonction de contraction cardiaque des cardiomyocytes

Ce sont des cellules musculaires striées qui, à la différence de celles du muscle squelettique, présentent la caractéristique essentielle de se contracter spontanément de façon rythmique en l'absence de commande nerveuse. Cette propriété est également observée in vitro. Bien que spontanée, l'activité contractile du myocarde est toutefois sous le double contrôle de l'innervation parasympathique qui ralentit le rythme cardiaque (neurotransmetteur = l'acétylcholine (ACh)) et de l'innervation sympathique qui l'accélère (neurotransmetteur = la noradrénaline). Les cardiomyocytes ont une forme de cylindre dont les extrémités présentent des bifurcations permettant leur interconnexion pour former un réseau tridimensionnel complexe (myotubes). Leurs mitochondries sont plus grosses et plus nombreuses, et leurs grains de glycogène plus abondants que dans les cellules musculaires striées squelettiques.

✔ La fonction de conduction cardiaque est liée aux cellules cardionectrices

Le tissu cardionecteur est organisé en « nœuds » et « faisceaux ». Les cellules cardionectrices sont des cardiomyocytes spécialisés dans l'initiation et la conduction de la contraction musculaire. Ces cellules dites nodales forment le nœud sino-auriculaire, le "stimulateur" de l'excitation cardiaque. D'autres cellules cardionectrices assurent non pas une fonction d'initiation mais de transmission de l'excitation. Elles forment alors des faisceaux circulant dans la paroi myocardique. C'est le cas du faisceau de His qui se divise rapidement en deux branches principales puis se ramifie vers la pointe du cœur dans l'ensemble des parois ventriculaires puis en réseau de Purkinje. La contraction cardiaque se fait ainsi d'abord à partir de la pointe du cœur rendant efficace la vidange ventriculaire vers les orifices valvulaires.

✔ La fonction endocrine cardiaque est liée aux cellules myoendocrines

Les cardiomyocytes endocrines sont des cellules situées essentiellement dans les oreillettes, sites de sécrétion des facteurs natriurétiques contribuant à la régulation de la pression artérielle et du volume sanguin (Goetze *et al.*, 2006). Il existe 2 types de peptides natriurétiques :

- l'ANP (atrial natriuretic peptide) qui est sécrété par les cellules myoendocrines atriales en réponse à une dilatation auriculaire. Ce peptide est considéré comme un biomarqueur d'hypertrophie cardiaque (Lu *et al.*, 2012a).

- le BNP (brain natriuretic peptide) qui est sécrété par les cellules myoendocrines ventriculaires en réponse à l'élévation de pression en fin de diastole et à l'augmentation de volume. Ce facteur peptidique est couramment dosé lorsqu'une insuffisance cardiaque est recherchée.

IV. 1. 1. 2. Les cellules non myocytaires

On distingue les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Les cellules musculaires lisses sont des cellules irrégulières en forme de bâtonnets avec habituellement un seul noyau. Elles possèdent une longueur moyenne de 100 µm pour un diamètre de 15 µm.

IV. 1. 2. L'endothélium et les cellules endothéliales vasculaires (CEV)

L'endothélium constitue une interface cellulaire entre le sang circulant et la paroi interne de tous les vaisseaux sanguins. Les CEV sont pavimenteuses et allongées dans le sens de l'écoulement du sang. Leur surface est lisse, minimisant ainsi les frottements et optimisant le flux sanguin. Elles forment une monocouche continue constituant une barrière métabolique et protectrice dans les conditions physiologiques. L'endothélium maintient les vaisseaux dans un état d'équilibre entre vasodilatation et vasocontraction selon les conditions, et inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Dans des états pathologiques comme l'athérosclérose, le dysfonctionnement des CEV entraîne une augmentation des réponses vasoconstrictrices, l'adhésion des plaquettes et la prolifération des CMLV.

L'endothélium a deux fonctions principales importantes :

- ✔ La régulation du tonus vasomoteur

Elle s'effectue *via* la libération de différentes substances endothéliales pouvant agir localement, après diffusion dans les CMLV sous-jacentes, ou sur des vaisseaux éloignés, après transfert dans la circulation. Certaines de ces substances sont vasodilatatrices comme le NO et la prostacycline, d'autres sont vasoconstrictrices comme l'endothéline (ET) et le platelet activating factor (PAF). Le NO traverse la membrane endothéliale pour diffuser rapidement (sa demi-vie courte est estimée entre 3 et 30 secondes) dans la circulation sanguine ou les CMLV sous-jacentes (Schroeder *et al.*, 1995; Dhir *et al.*, 2011). Dans ces

dernières, par sa fixation sur l'hème, il active la guanylate cyclase soluble qui catalyse la formation de GMP cyclique, activateur de la protéine kinase G (PKG). Cette enzyme contribue (i) à diminuer les stocks de calcium libre cytosolique et (ii) à inhiber la contraction des CMLV en agissant sur la phosphatase qui déphosphoryle la chaîne légère de la myosine, provoquant la rupture de l'interaction de cette dernière avec l'actine.

- La modulation de l'hémostase primaire et de la coagulation

L'hémostase permet d'interrompre le saignement et ainsi éviter l'hémorragie. La phase primaire consiste en l'adhésion des plaquettes au vaisseau sanguin lésé et leur agrégation en vue de la formation d'un caillot. L'activation des protéines de la coagulation vise ensuite à former le caillot définitif avant l'action des mécanismes de réparation tissulaire et de fibrinolyse. L'endothélium a une activité anticoagulante qui veille notamment à limiter la génération permanente de thrombine. Cependant, sous l'effet de différents facteurs physiques ou chimiques, les CEV peuvent aussi orienter leur programme génétique vers un phénotype procoagulant afin de limiter les dommages créés par une infection, un traumatisme ou une inflammation. L'endothélium contribue donc aussi à l'équilibre entre état anti- et pro-coagulant dans l'organisme.

IV. 1. 3. Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont composés de trois couches superposées **(Figure 26)** :

- l'intima est la couche la plus interne. Elle est formée par un endothélium reposant sur une lame basale.
- la media ou tunique moyenne est la plus épaisse et importante. Elle est formée de CMLV qui lui confèrent des propriétés contractiles. Ainsi, c'est elle qui permet le changement de diamètre des vaisseaux.
- l'adventice est la tunique la plus externe. Elle est fibreuse et formée de tissu conjonctif. On y trouve aussi les filets nerveux assurant l'innervation végétative et aboutissant à la media.

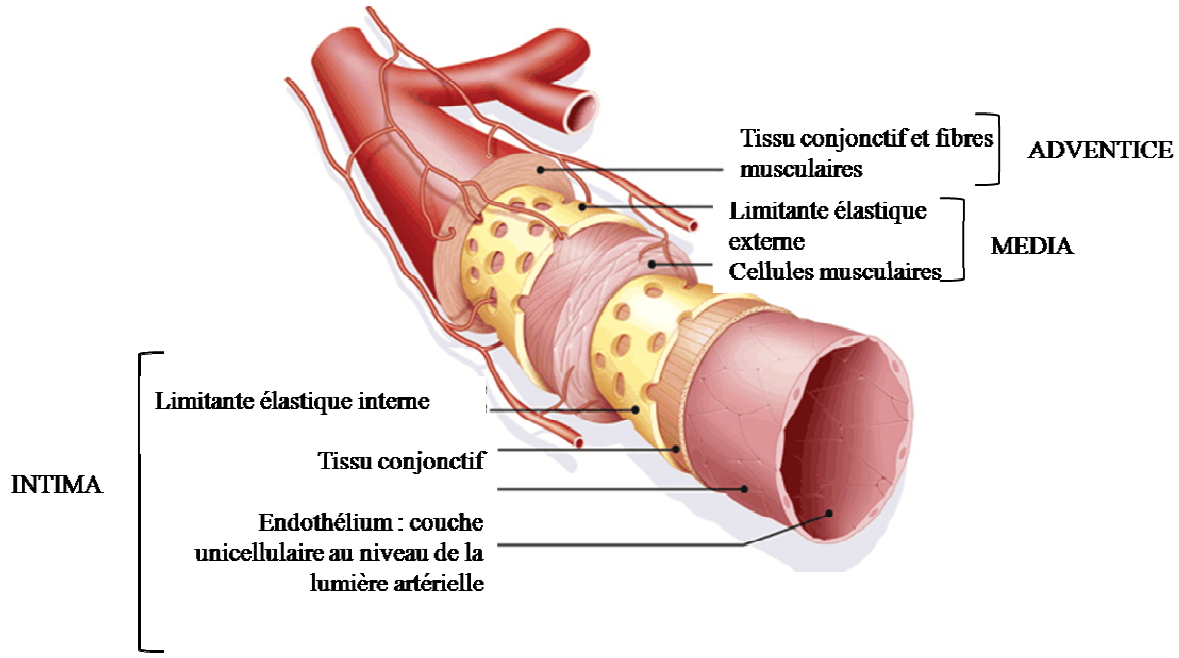


Figure 26 : Les différentes couches des vaisseaux sanguins.

IV. 1. 3. 1. Le système artériel et veineux

Le système artériel du cœur comporte une *composante élastique* et un *système résistif*. La composante élastique est dans les grosses artères proches du cœur. En systole, ces dernières emmagasinent l'énergie développée par le ventricule gauche et la restituent en diastole en assurant l'écoulement du sang. Leur compliance ou distensibilité, c'est-à-dire la capacité des vaisseaux à se distendre sous une pression, dépend de la qualité intrinsèque de la paroi, en particulier de sa composante élastique et fibreuse. Le système résistif est constitué par les artérioles périphériques. Le niveau des résistances vasculaires est hautement variable. Les plus grosses artères du cœur sont les artères coronaires régulièrement explorées par coronarographie pour la détection de problème.

L'aorte qui quitte le cœur au niveau de l'orifice de sortie du ventricule gauche est la plus grosse des artères systémiques. Son élasticité naturelle lui permet d'amortir les importantes élévations de pression lors de la période de contraction cardiaque. Le retour élastique de cette même paroi pendant la période de repos cardiaque permet de conserver dans le réseau artériel une pression minimale (pression diastolique).

Les veines ramènent le sang vers le cœur et les poumons. Elles ont une faible teneur en oxygène ce qui leur donne une couleur bleuâtre.

IV. 2. Métabolisme cardiaque

Le cœur est un organe très riche en lipides en raison de son matériel membranaire, particulièrement des mitochondries qui occupent près de 30% de son volume. Plus de 90% du métabolisme cardiaque est aérobie. La mitochondrie fournit l'ATP nécessaire à la contraction musculaire tandis que les transports ioniques du sarcolemme sont responsables de l'activité électrique des cellules cardiaques (Aon *et al.*, 2012).

IV. 2. 1. Couplage excitation-contraction

Les cardiomyocytes se composent de myofibrilles formées par l'enchaînement d'unités contractiles nommées « sarcomères » **(Figure 27)**. Ces derniers regroupent des myofilaments fins constitués d'actine associé à de la tropomyosine et de la troponine et des myofilaments épais constitués de myosine.

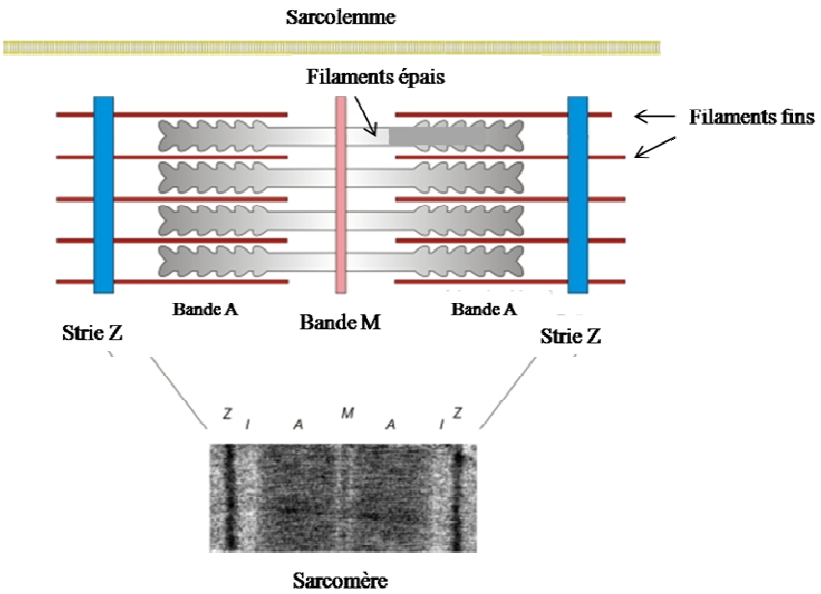


Figure 27 : Schéma d'un sarcomère. Un sarcomère se trouve entre 2 stries Z. La bande M est uniquement constituée de filaments épais (myosine) tandis que la bande A est constitué de filaments fins (actine + troponine + tropomyosine) et de filaments épais. Le rapprochement des filaments fins et épais conduit à la réduction de la longueur des sarcomères au sein des cardiomyocytes générant une contraction. *Adapté de Frank et al., 2011*

La transmission du potentiel d'action le long du sarcolemme de chaque cellule provoque un raccourcissement du sarcomère à l'origine de la contraction (Frank *et al.*, 2011). En effet, lors de la dépolarisation membranaire se produit un influx calcique depuis le milieu extracellulaire vers le cytoplasme *via* les canaux calciques **(Figure 28)**. Cette entrée d'ions permet la

libération de calcium intracellulaires (notamment présents dans le réticulum sarcoplasmique) qui se lient à la troponine C et génère un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. Les sites actifs d'actine ainsi libérés, vont activer l'ATPase des têtes de myosine et permettre une libération d'énergie nécessaire au glissement des myofilaments de myosine par rapport au myofilaments d'actine (Bers, 2002).

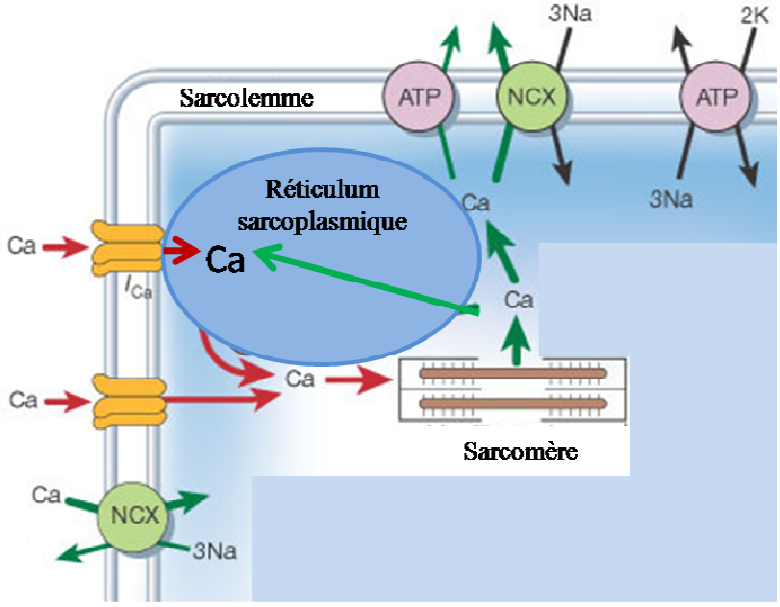


Figure 28 : Couplage excitation-contraction. Durant la systole (flèches rouges, le calcium pénètre dans la cellule afin de permettre la contraction des myofibrilles. Lors de la systole (flèches vertes), le stock de calcium est repompé dans le réticulum sarcoplasmique ou exporté hors de la cellule par des pompes calciques présentes sur le sarcolemme. *Adapté de Bers et al., 2002.*

IV. 2. 2. Sources énergétiques cardiaques

Dans des conditions physiologiques normales, les principales sources d'énergie du myocarde sont issues de la β-oxydation des acides gras (AG) et de la glycolyse/métabolisme du pyruvate **(Figure 29)**.

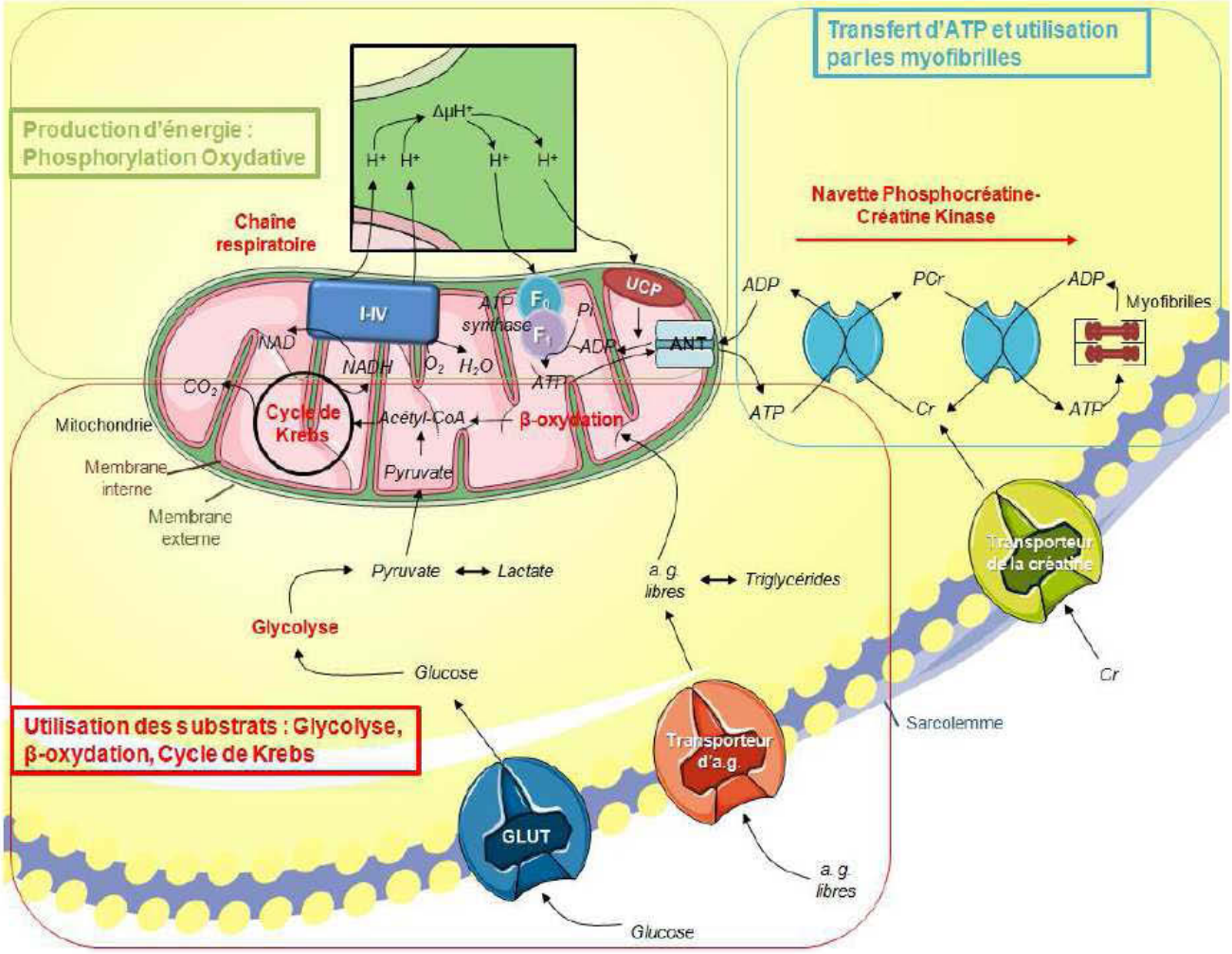


Figure 29 : Métabolisme énergétique du cœur. Le métabolisme cardiaque a 3 composantes : L'utilisation de substrat (1 : cadre rouge) est nécessaire pour la production d'énergie (2 : cadre vert) ; puis l'ATP est transféré vers les sites de consommation (3 : cadre bleu): a.g : acides gras ; Cr : créatine ; PCr : Phosphocréatine.

La membrane mitochondrial interne est imperméable aux AG à longue chaîne. Ils nécessitent donc un système de transporteurs spécifiques (CPT I et II). Dans la mitochondrie, les AG sont ensuite dégradés par les enzymes de la β-oxydation, en libérant de l'acétyl-CoA. Le glucose entre, quant à lui, dans la cellule cardiaque *via* les transporteurs GLUT1 et GLUT4. La glycolyse permet sa transformation en pyruvate qui est métabolisé en acétyl-CoA dans la mitochondrie sous l'action du complexe pyruvate déshydrogénase. Le pyruvate peut également être carboxylé en oxaloacétate, par la voie anaplérotique, et entrer ainsi dans le cycle de Krebs (Des Rosiers *et al.*, 2011). L'acétyl-CoA est ensuite dégradé *via* le cycle de Krebs. En condition normale, 60 à 90% de l'acétyl-CoA entrant dans ce cycle provient de

l'oxydation des AG contre 10 à 40% provenant de l'oxydation du glucose (Nagoshi *et al.*, 2011). Ce cycle produit les équivalents réduits (NADH et $FADH_2$) nécessaires à la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale pour la phosphorylation oxydative produisant l'ATP à partir d'ADP, de phosphate et d'oxygène. En condition pathologique (avec par ex., élévation de la fréquence cardiaque ou de la pression sanguine), où la demande en énergie est augmentée il y a un shift vers une plus grande utilisation du glucose. Par exemple, en cas d'hypoxie ou d'ischémie, malgré le maintien de la captation cellulaire des AG et de leur β-oxydation mitochondriale, la formation d'ATP est diminuée du fait d'un manque d'oxygène et donc d'une phosphorylation oxydative inefficace (Kienesberger *et al.*, 2012). Chaque glucose catabolisé par la voie anaérobie ne génère que 2 ATP, au lieu de 38 par la voie aérobie, ce qui ne permet plus de satisfaire la demande en énergie du cardiomyocyte, qui est placé alors en situation de déficit énergétique (Nagoshi *et al.*, 2011).

IV. 3. Maladies cardiovasculaires

Selon la définition de l'OMS, les MCV constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles regroupent diverses pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, les cardiopathies coronariennes (angor, infarctus du myocarde), les accidents vasculaires cérébraux, les artériopathies périphériques, les cardiopathies rhumatismales ou encore les thromboses veineuses profondes et embolies pulmonaires. La plupart de ces évènements sont en réalité la traduction clinique d'une pathologie chronique et évoluant sur des dizaines d'années : l'athérosclérose. Cette dernière se caractérise par des remaniements et un épaississement de l'intima des grosses et moyennes artères aboutissant à la formation de la plaque d'athérome, encore appelée lésion athéromateuse (chape fibreuse entourant un corps lipidique).

L'infarctus du myocarde est la conséquence immédiate de l'occlusion complète de l'artère coronaire, par formation d'un thrombus obstruant la lumière vasculaire **(Figure 30)**.

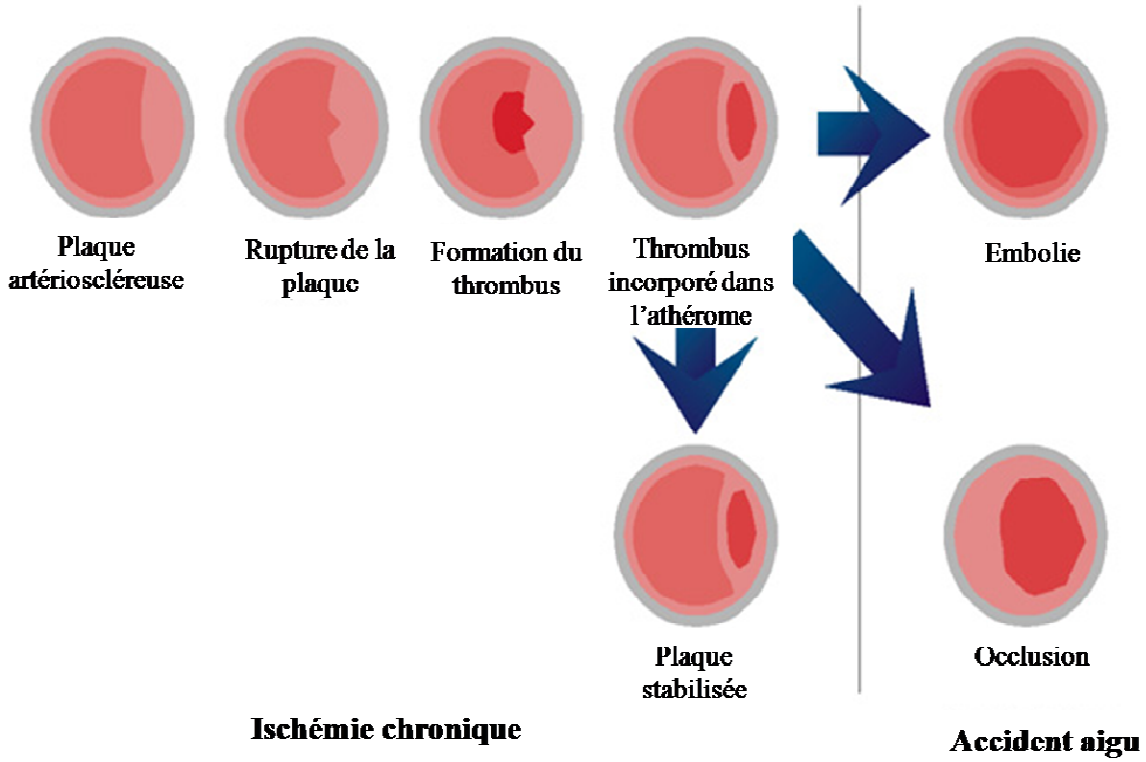


Figure 30 : Processus pathologiques de l'athérothrombose. *Adapté du site http://www.123bio.net/cours/*

Cette obstruction résulte majoritairement d'une rupture de la plaque d'athérome et entraîne *in fine* une diminution de l'apport sanguin (ischémie) au niveau du cœur. Le cœur se cicatrise ensuite mais ses capacités de contraction sont dès lors fortement altérées. Durant les mois qui suivent, le ventricule gauche peut se dilater progressivement (« remodelage »), ce qui altère son activité de « pompe » et engendrer une complication redoutable de l'infarctus, l'insuffisance (ou défaillance) cardiaque. Cette anomalie de la fonction cardiaque est responsable de l'incapacité du myocarde à assurer un débit sanguin suffisant pour couvrir les besoins énergétiques de l'organisme.

La défaillance cardiaque peut être le reflet d'une anomalie de la contraction du muscle cardiaque ventriculaire (dysfonction systolique) ou de son remplissage (dysfonction diastolique), voire des deux mécanismes. Elle peut résulter d'une diminution de la contraction du ventricule (dysfonction systolique), de son remplissage par altération de la relaxation et de la compliance (dysfonction diastolique), ou de ces deux étapes. La contractilité myocardique peut par exemple être altérée du fait d'une oxygénation insuffisante des cardiomyocytes par l'athérosclérose des artères coronaires ou bien de leur atteinte toxique ou inflammatoire.

L'insuffisance cardiaque peut également résulter de la perte de la capacité des cavités cardiaques à se dilater, par exemple dans le cas d'une fibrose réduisant l'élasticité du cœur, d'une hypertrophie du myocarde ou d'une myocardiopathie dilatée idiopathique.

IV. 4. Le cycle de l'homocystéine dans les cellules cardiaques

Le cycle de l'Hcy et de la méthionine dans les cellules cardiaques est particulier. Chen *et al.* (1999) ont montré que les activités enzymatiques et l'abondance des protéines CBS et BHMT sont très faibles dans le cœur humain. Ces observations suggèrent qu'il est limité dans sa capacité à métaboliser l'Hcy *via* ces voies (Chen *et al.*, 1999). La seule possibilité de reméthylation de l'Hcy en méthionine passe donc par la voie catalysée par la MS dépendante des folates et de la vitamine B12 (Finkelstein, 1998). Par conséquent, le cœur apparaît particulièrement sensible à une augmentation de l'homocystéinémie.

IV. 5. Conséquences physiologiques et métaboliques de la déficience en PDM au niveau cardiovasculaire

La déficience en PDM et l'HHcy altèrent la fonction cardiovasculaire à différents niveaux. Leur impact sur les vaisseaux sanguins et le cœur, ainsi que les mécanismes physiopathologiques sous-jacents actuellement connus, sont décrits ci-après dans le cas de l'athérosclérose, la thrombose et l'insuffisance cardiaque. Ces 3 conditions sont présentées séparément bien qu'étant inter-reliées.

IV. 5. 1. Athérosclérose

IV. 5. 1. 1. Dysfonction endothéliale

<u>Les mécanismes de la dysfonction endothéliale :</u> L'endothélium joue un rôle important dans la circulation sanguine, les réactions de coagulation ou encore dans l'activation des plaquettes. La dysfonction endothéliale est caractérisée par une atténuation de la réponse dilatatrice de l'endothélium. Elle serait prédictive quant à la survenue de complications cardiovasculaires (Cai *et al.*, 2000; Luk *et al.*, 2012). En outre, l'anomalie vasculaire la plus couramment observée dans des modèles murins d'HHcy est la dysfonction endothéliale, principalement lié à l'altération de la eNOS (Dayal *et al.*, 2007, 2008a). La déficience en PDM et l'HHcy agissent sur l'équilibre entre les facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs de l'endothélium. Comme déjà évoqué dans le chapitre 3, ils peuvent affecter la production de NO *via* une réduction de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS. Dans le modèle murin

ApoE$^{-/-}$, développant une hypercholestérolémie sévère ainsi qu'une athérosclérose dans des conditions alimentaires normales, une HHcy induite par un régime enrichi en méthionine et pauvre en folates entraîne une diminution de la capacité vasodilatatrice de l'endothélium stimulée par l'injection carotidienne d'acétylcholine (Wilson *et al.*, 2007). De même, une HHcy (40 µM) induite par l'administration de méthionine chez le rat a été associée à une diminution de 70% du niveau plasmatique de NO et une altération de la vasodilatation de l'endothélium aortique (Yan *et al.*, 2010). Des effets similaires, dose-dépendants, ont été observés *in vitro* sur des anneaux aortiques de rats traités avec 0,01 à 1 mM d'Hcy (Zhang *et al.*, 2012a).

L'altération de la biodisponibilité du NO est multifactorielle. Ainsi, une inhibition de l'activité eNOS, via sa phosphorylation au niveau de la thréonine 495 par activation de la phosphokinase C et sa déphosphorylation au niveau de la serine 1177 par désactivation de Akt, a été associée à l'effet de l'Hcy sur la disponibilité du NO et sur le dysfonctionnement endothélial en résultant (Yan *et al.,* 2010; Cheng *et al.,* 2011). De plus, l'Hcy semble capable d'agir sur la voie DDAH/ADMA comme nous l'avons déjà évoqué dans le chapitre 3. Des concentrations plasmatiques d'ADMA ont été associées avec une altération de la vasodilation dépendante de l'endothélium, au niveau des artères coronaires de singes rendus hyperhomocystéinémiques après un régime enrichi en méthionine et déficient en folates (Boger *et al.,* 2000). L'élévation plasmatique d'ADMA a aussi été corrélée avec la dysfonction endothéliale chez des rats hyperhomocystéinémiques et chez des hommes présentant une HHcy due à une surcharge en méthionine (Boger *et al.*, 2001; Stuhlinger *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2005). Au niveau cellulaire, une étude sur les HUVEC montre qu'une incubation de 72 heures avec 30 µM d'Hcy inhibe l'activité de la eNOS *via* l'augmentation de son inhibiteur, l'ADMA. En effet, l'Hcy agit indirectement sur la eNOS, d'une part, en induisant une hypométhylation des îlots CpG du promoteur du gène *ddah2* conduisant à une augmentation de la transcription de ce gène et, d'autre part, en diminuant l'activité de la DDAH2 (Zhang *et al.*, 2007). Toutefois, dans une étude plus récente, aucune différence n'a été observée entre les concentrations d'ADMA dans des HUVEC traitées avec 10 à 300 µM d'Hcy (Zhang *et al.*, 2012a). De plus, dans des cellules endothéliales murines MS-1 traitées avec 1 mM d'Hcy, une diminution de la production de NO était même observée conjointement à une réduction du niveau d'ADMA sans altération du niveau des ARNm de la DDAH (Dayal *et al.*, 2008b). Ceci montre donc l'implication d'autres facteurs dans le dysfonctionnement de la eNOS et la biodisponibilité du NO. Une étude sur des HUVEC a

montré que l'Hcy pourrait aussi réduire l'expression du transporteur cellulaire de l'arginine (CAT1), conduisant à une diminution de la quantité d'arginine disponible pour la formation de NO, sans affecter ni l'expression, ni l'activité de l'enzyme eNOS (Jin *et al.*, 2007).

La dysfonction endothéliale peut aussi résulter d'une inactivation du NO par les radicaux libres, notamment les anions superoxydes. Ceci se traduit par une diminution de sa biodisponibilité dont une des conséquences est l'altération de la vasodilatation NO-dépendante. L'augmentation des **dommages oxydatifs** superficiels par des radicaux libres néoformés constitue un des mécanismes majeurs de l'impact de l'HHcy sur l'endothélium. Li *et al.* (2002) ont en effet montré qu'un traitement par l'Hcy (40 µM), atténue la production de NO induite par les bradykinines et active la formation d'O_2^- dans des artères rénales isolées de rats, sans toutefois altérer l'activité de la eNOS (Li *et al.*, 2002). Une augmentation de la production d'O_2^- a également été observée dans des CMLV et des HUVEC exposées 6 heures à 100 µM d'Hcy, ainsi que dans des aortes de rats présentant une HHcy à 25,5 µM. L'O_2^- ainsi produit par les cellules vasculaires, proviendrait d'une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase induite par l'HHcy (Edirimanne *et al.*, 2007). L'utilisation de curcumine, d'AF ou d'antioxydants, chez des animaux hyperhomocystéinémiques, atténuerait la production d'O_2^- (Ungvari *et al.*, 2003; Ramaswami *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2011), tout comme la vitamine B12 sur des cellules endothéliales exposées à 150 µM d'Hcy (Moreira *et al.*, 2011). De plus, la dilatation des artérioles cérébrales induite par l'ACh chez les souris $CBS^{+/+}$ et $CBS^{+/-}$ nourries avec un régime riche en méthionine est restaurée par un « piégeur » d'O_2^- (Dayal *et al.*, 2004). Cet anion serait donc un médiateur majeur de la dysfonction endothéliale induite par un excès d'Hcy cellulaire. L'Hcy pourrait aussi induire la formation de $ONOO^-$ qui serait bloqué par la supplémentation en L-arginine qui augmenterait la quantité de NO produit (Jin *et al.*, 2007). Au vu de ces résultats, l'amélioration de la fonction endothéliale pourrait donc passer par des mécanismes antioxydants. Ainsi une étude a montré que la surexpression de la GPx1 protège les souris hyperhomocystéinémiques de dysfonction endothéliale (Weiss *et al.*, 2001). L'effet protecteur de la GPx1 serait relié à la réduction de l'H_2O_2 et du peroxynitrite (Lubos *et al.*, 2007).

Un autre effet de l'augmentation de l'Hcy cellulaire dans le développement de l'athérosclérose est la génération d'**un stress du RE** (Zhou *et al.*, 2009). L'expression des molécules chaperones, hsp70 et 90 et de GRP78/BIP est augmentée dans les lésions athérosclérotiques précoces et tardives chez des souris $apoE^{-/-}$ hyperhomocystéinémique (Zhou *et al.*, 2004). La présence d'un stress du RE *via* l'accumulation de la BiP/GRP78 dans

les lésions athérosclérotiques a aussi été observée dans un modèle de lapins nourris avec un régime enrichi en méthionine (Zulli *et al.*, 2009). Par ailleurs, le stress du RE induit par l'Hcy peut conduire à l'apoptose des cellules endothéliales ainsi qu'à l'activation de voie inflammatoire.

L'HHcy peut-elle réellement induire l'athérosclérose ? L'effet délétère de l'HHcy sur la fonction endothéliale semble bien démontré. Néanmoins, elle ne suffit pas à induire l'athérosclérose. En effet, les modèles animaux d'HHcy ne développent pas spontanément de lésions athérosclérotiques. En revanche, l'HHcy en accélère son développement, notamment dans des modèles de souris $ApoE^{-/-}$ (Hofmann *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2007). Hofmann *et al.* (2001) rapporte chez des souris $apoE^{-/-}$ hyperhomocystéinémique (*vs* souris $apoE^{-/-}$ nourries avec un régime contrôle) que la lésion aortique est plus large et complexe. Ces résultats ont été confirmés par Wilson *et al.* (2007) qui montrent en plus, la présence d'un stress du RE *via* l'accumulation de la protéine PERK au niveau de la lésion aortique (Wilson *et al.*, 2007). Aussi, en utilisant des approches génétiques et nutritionnelles afin d'obtenir des souris hyperhomocystéinémiques et hypercholestérolémiques (souris $LDLr^{-/-}$ et $CBS^{+/-}$ nourries avec un régime déficient en folates et enrichi en méthionine), il a été montré qu'une diminution de l'homocystéinémie restaure la fonction endothéliale sans toutefois inhiber le développement de l'athérosclérose. A l'inverse, la réduction de la cholestérolémie se révèle anti-athérogénique mais sans effet sur la fonction endothéliale (Jacobs *et al.*, 2011). En combinant les deux, il a été observé une amélioration de la fonction endothéliale et une inhibition du développement de l'athérosclérose. Récemment, dans ce même modèle, Zhang *et al.* (2012) ont montré que l'HHcy sévère (275 µM) accélère l'athérosclérose *via* l'augmentation de marqueurs de l'inflammation (TNFα, IL-6) et du stress oxydant (O_2^-) (Zhang *et al.*, 2012b). Les études montrent donc que l'HHcy n'induirait pas directement l'athérosclérose mais accélérerait son développement.

L'impact des PDM sur le fonctionnement endothélial : L'impact de variations du statut en folates sur le fonctionnement endothélial a aussi été rapporté. Une étude sur 82 enfants et leurs mères a montré une altération de la vasodilatation endothéliale des vaisseaux de la peau, chez des enfants nés avec un petit poids corporel et dont les mères présentaient une concentration érythrocytaire en folates significativement inférieure à celle des mères d'enfants nés avec un poids normal (805 *vs* 1109 nM). En revanche, les niveaux de vitamine B12 et

d'Hcy des nouveau-nés et de leurs mères n'étaient pas corrélés au dysfonctionnement endothélial (Martin *et al.*, 2007). Les conclusions de l'étude étaient donc qu'un statut maternel bas en folates pourrait être un facteur de risque cardiovasculaire modulable chez le nouveau-né.

Une étude en double aveugle a montré qu'une supplémentation en AF de 8 semaines améliorait la FMD (« Flow mediated dilatation » *Cf. encadré**) et diminuait l'oxydation des LDL chez des enfants atteints d'insuffisance rénale chronique (Bennett-Richards *et al.*, 2002).

La « **vasodilatation dépendante du flux sanguin** » ou, en anglais « **Flow Mediated Dilation** » **(FMD)** est un paramètre dynamique fréquemment mesuré pour l'évaluation dynamique de la fonction endothéliale. Elle décrit l'augmentation du diamètre d'un vaisseau, généralement l'artère brachiale, qui en réponse à un stress ischémique (occlusion de l'avant-bras avec un brassard pneumatique) provoque une augmentation brusque du flux sanguin. La libération de NO par l'endothélium contribue en grande partie à l'augmentation du diamètre artériel (dilatation) mesurée à l'aide d'une technique d'échographie non invasive, avant et après l'ischémie. La FMD est calculée en divisant le diamètre maximum de dilatation de l'artère par son diamètre de base.

Des effets similaires ont été observés sur la fonction endothéliale de patients atteints de maladies des artères coronaires puisqu'une supplémentation de 5 mg/j d'AF pendant 6 semaines améliore significativement leur FMD. Néanmoins, cette amélioration n'était pas corrélée avec la diminution de l'homocystéinémie due à la supplémentation en AF (Doshi *et al.*, 2001). Plus récemment, des résultats identiques, à savoir une amélioration de la FMD sans corrélation avec l'Hcy, ont été trouvés chez des patients ayant eu un infarctus du myocarde et supplémentés avec 10 mg/j d'AF pendant 6 semaines (Moens *et al.*, 2007). Une supplémentation en AF (400 µg/j et 5 mg/j pendant 7 semaines) améliore également la FMD et diminue la quantité d'O_2^- vasculaire chez des patients atteints de maladies des artères coronaires. Il est important de souligner que la dose d'AF la plus élevée n'induit pas d'amélioration supplémentaire sur ces paramètres. Une supplémentation d'AF de 400 µg/j suffit à améliorer la fonction endothéliale (Shirodaria *et al.*, 2007). Les folates auraient donc la capacité de moduler les mécanismes de vasoconstriction/vasodilatation indépendamment de l'Hcy. Cette hypothèse a été vérifiée dans des études cellulaires. L'exposition de cellules HUVEC à des LDL diminue la production d'endothéline-1, un facteur vasoconstricteur, mais cet effet peut être contrecarré par la présence de 5-mTHF (100 µM). En revanche, le traitement avec 100 µM d'AF ou de vitamine B12 ne restaure pas le niveau de l'endothéline-1 (Ronco *et al.*, 2007). Les stéréo-isomères L et D du 5-mTHF semblent même

pouvoir piéger l'O_2^- produit par la eNOS découplée et activer directement l'enzyme en augmentant la disponibilité de son cofacteur la BH_4 (Stroes *et al.*, 2000). Un autre élément clé du cycle des folates est la DHFR. Sa surexpression dans des cellules endothéliales bovines en culture, restaure la production de NO et diminue celle d'O_2^- (Chalupsky *et al.*, 2005). Cette enzyme régénère la BH_4 à partir de la BH_2 et par voie de conséquence, agit en faveur du couplage de la eNOS (Crabtree *et al.*, 2011). La supplémentation, en folates principalement, semblerait donc améliorer le fonctionnement de l'endothélium *via* leur action sur le NO.

Le dysfonctionnement de l'endothélium peut entraîner une augmentation de sa perméabilité conduisant à un passage accru des LDL dans l'espace sous-endothélial et donc à un risque de développement de la plaque d'athérome.

IV. 5. 1. 2. Développement de la plaque d'athérome

L'athérome implique un remaniement important de l'intima des artères de gros et moyen calibre. L'accumulation de lipides, glucides complexes, sang et produits sanguins, tissus adipeux, dépôts calcaires et autres minéraux à ce niveau entraîne un rétrécissement du lumen. Des concentrations d'Hcy élevées et de folates réduites ont été mesurées dans le plasma de patients présentant des débits sanguins faibles au niveau de leurs artères coronaires, suggérant un épaississement des parois artérielles (évalué par angiographie) (Riza Erbay *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2012). De même, chez des souris $MTHFR^{-/-}$ hyperhomocystéinémiques, il a été observé une accumulation de dépôts lipidiques au niveau de l'aorte (Chen *et al.*, 2001). Dans un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ recevant un régime hyperlipidique (mais pas chez celles recevant un régime normal), la formation de plaques athéromateuses peut être augmentée lorsque ce régime est simultanément dépourvu de folates (McNeil *et al.*, 2011). Cette dernière condition pourrait donc aggraver le développement de la plaque d'athérome mais, seule, serait incapable de l'induire.

L'évolution et l'installation de la plaque d'athérome sont des processus complexes qui se font en plusieurs étapes. Même si la séquence des évènements n'est pas encore complètement élucidée, il semble que la première est la **pénétration de LDL dans l'intima**. A ce niveau, l'Hcy a la capacité de se lier à ces protéines **(Figure 31)**.

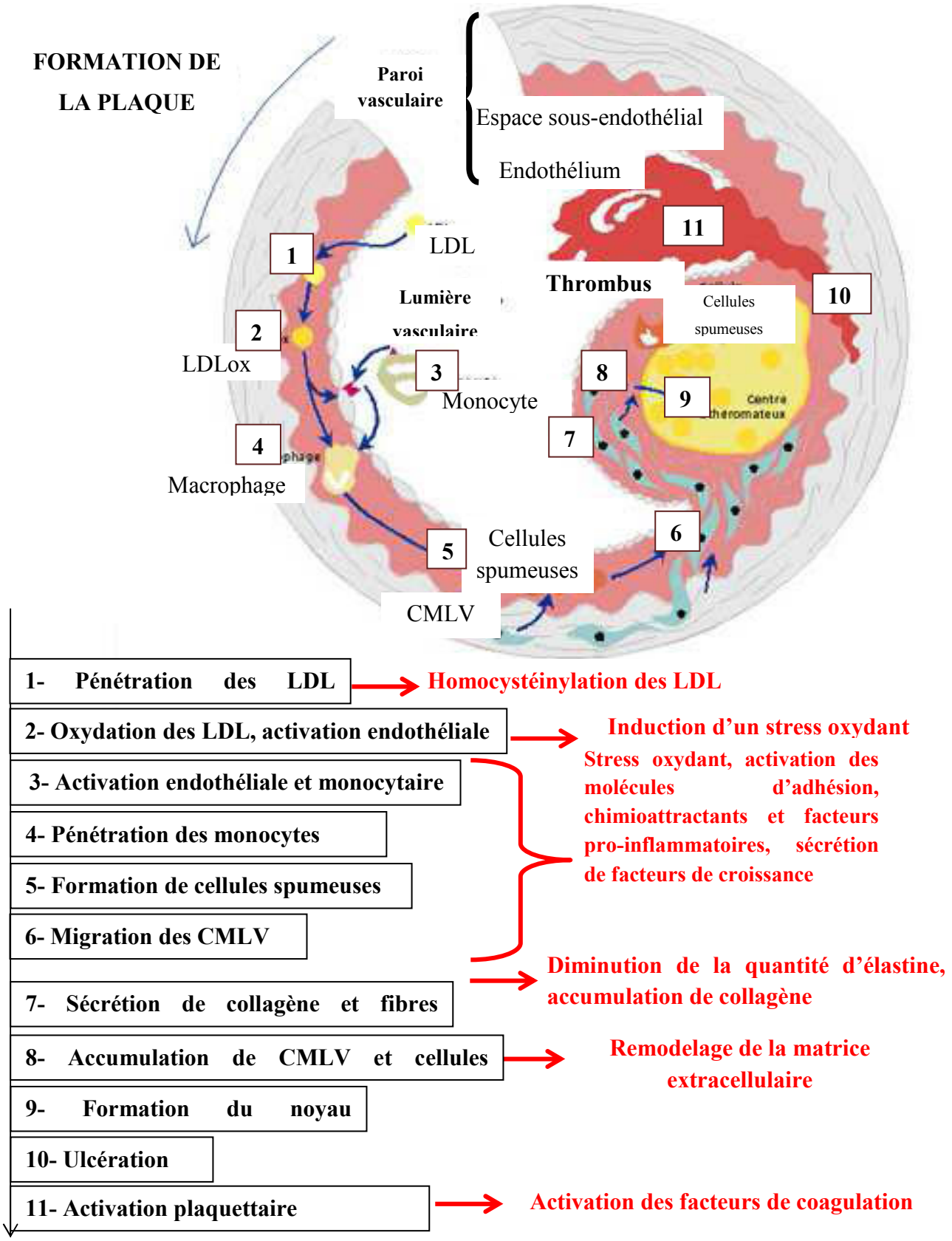


Figure 31 : Implication de l'homocystéine dans les différentes étapes de l'athérothrombose. Son action est précisée en rouge dans la figure. *Adapté du site http://www.123bio.net/cours/*

Une augmentation significative de l'homocystéinylation des apoB a, en effet, été observée parallèlement à une diminution de la liaison glutathion-apoB chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu (Zinellu *et al.*, 2012). L'Hcy se lierait même de manière dose-dépendante aux LDL. Par ailleurs, l'exposition de cellules endothéliales humaines à des LDL-homocystéinylées augmente leur production d'ERO (Zinellu *et al.*, 2009). Au cours du processus de formation de la plaque d'athérome, les LDL internalisés dans l'espace sous-endothélial sont ensuite oxydés (LDLox) par des ERO issus des CEV, macrophages ou CMLV. L'Hcy ainsi libérée des LDL pourrait participer, à ce niveau, à des réactions du stress oxydant.

Les LDLox déclenchent une **réponse inflammatoire** de l'endothélium caractérisée par la production de cytokines (IL-1, TNFα), l'expression de molécules d'adhésion en surface (Sélectine E, ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1, VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1) et la sécrétion de facteurs chiomioattractants (MCP-1). Une HHcy peut induire l'expression de plusieurs de ces molécules. En effet, l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, sélectines-E et -P et VCAM-1 est augmentée dans des cellules endothéliales cultivées en présence de concentrations élevées d'Hcy (Alkhoury *et al.*, 2011). L'augmentation des niveaux d'ARNm et de la protéine VCAM-1 nécessite l'activation de l'expression de son facteur de transcription NF-κB et la phosphorylation de IκB (inhibiteur de NF-κB). Par ailleurs, une augmentation de l'activité NADPH oxydase par l'Hcy induit la formation d'ERO qui contribuerait, en partie, à l'activation de NF-κB (Carluccio *et al.*, 2007). L'implication du stress oxydant a été suggérée car un traitement avec du resvératrol, un polyphénol ayant des propriétés anti-oxydantes, permet de contrecarrer l'induction de l'expression de VCAM-1 par l'HHcy. Malgré l'inefficacité d'un traitement à la vitamine B6 ou aux folates sur l'expression de cette protéine, un régime enrichi en bétaine chez des rats peut aussi diminuer l'induction de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et de VCAM-1 en diminuant l'activation de NF-κB *via* l'atténuation du stress oxydant (Go *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré récemment que l'albumine homocystéinylée pouvait également augmenter la fixation de monocytes sur des cellules endothéliales en culture *via* l'induction de l'expression de ces 2 molécules d'adhésion (Capasso *et al.*, 2012).

La progression de la plaque d'athérome se caractérise ensuite par le « pouvoir chimioattractant » des LDLox vis-à-vis des monocytes, favorisant leur **adhésion à la surface de l'endothélium** ainsi que leur conversion en macrophages dès qu'ils pénètrent dans l'intima. Les macrophages sont alors piégés dans l'espace sous-endothélial. Le processus

inflammatoire pro-athérogène est maintenu par la libération continue des cytokines et des molécules d'adhésion par les LDLox. Par ailleurs, les CMLV vont proliférer et les macrophages piégés dans l'espace sous endothélial vont capter et internaliser une grande quantité de LDLox par l'intermédiaire de récepteurs tels que SR-AI (scavenger receptor AI) ou CD-36 (thrombospondin receptor). Les LDLox internalisés provoquent l'augmentation de l'expression du facteur chimioattractant des monocytes (MCP-1) par les macrophages et les CMLV de la plaque, augmentant ainsi la migration et l'infiltration des monocytes/macrophages dans la paroi artérielle. L'Hcy peut intervenir à cette étape puisqu'à des concentrations comprises entre 0,1 et 1 mM, elle peut augmenter les niveaux d'ARNm, de libération et d'activité de MCP-1 et d'IL-8 dans des monocytes humains en culture (Zeng *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'Hcy semble avoir des effets plus importants lorsqu'elle est liée à des protéines. Par exemple, à une concentration faible (1 µM), l'albumine homocystéinylée peut induire, dans des co-cultures de cellules endothéliales et de monocytes, l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1, et de plusieurs facteurs potentiellement impliqués dans le remodelage vasculaire tels que ADAM17 (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17), MCP-1 et Hsp60 (Capasso *et al.*, 2012). Ces deux études montrent que l'augmentation de l'abondance de ces protéines inflammatoires par l'Hcy passe par l'activation des voies de signalisation p38 MAPK et ERK1/2, ainsi que NF-κB due à une production accrue d'ERO par la NADPH oxydase.

Une augmentation de l'expression génique et protéique de MCP-1 et de VCAM-1 a également été observée dans l'aorte de rats rendus hyperhomocystéinémiques par un régime riche en méthionine. L'apport simultané d'un supplément d'AF permettait d'atténuer ces modifications (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Des effets similaires d'un enrichissement en méthionine ou en AF chez le rat ont été retrouvés dans une autre étude au niveau de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion (MCP-1, VCAM-1 et sélectine-E), à l'exception d'ICAM-1 (Wang *et al.*, 2002). En revanche, un régime enrichi en bétaine ne permettait pas de réduire l'expression de MCP-1 chez des souris ApoE$^{-/-}$ au bout de 14 semaines (Lv *et al.*, 2009).

Les macrophages se surchargent ensuite de cholestérol et se transforment en cellules spumeuses. L'accumulation de ces cellules contribue à la formation de stries lipidiques caractéristiques de la plaque au stade précoce. La plaque lipidique évolue ensuite en une structure fibro-lipidique du fait du **remodelage de la MEC** et de la migration de CMLV de la media vers l'intima sous l'influence de chémokines (ex. MCP-1) produites par les

macrophages. La MEC est la composante principale de l'intima de l'artère normale, représentant jusqu'à 60% de son volume. Elle est constituée en majorité d'élastine (90%) auxquelles s'ajoutent la fibrilline et le collagène. De même que le vieillissement, le développement de la plaque d'athérome est associé à une perte d'élasticité de la MEC et à une augmentation de sa teneur en collagène, inextensible. Son altération a été observée dans des modèles animaux d'HHcy. Ainsi, une augmentation des dépôts de collagène a été rapportée dans la media de l'artère mésentérique de souris $MTHFR^{+/-}$ (présentant une HHcy modérée) (Neves *et al.*, 2004). A l'inverse, la teneur en élastine de cette artère était diminuée dans un autre modèle de souris modérément hyperhomocystéinémiques ($CBS^{+/-}$) comparativement à des souris sauvages (Munjal *et al.*, 2011). Ce remodelage de la MEC implique des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance régulant la production de collagène et d'élastine par les CMLV, mais aussi des MMP sécrétées par les macrophages. Cette altération de la MEC conduit à un changement phénotypique des CMLV dans l'intima : elles y adoptent un phénotype sécrétoire et prolifératif (sécrétion de protéases, de cytokines et de protéines de la MEC) à l'opposé de leur caractéristique différenciée et contractile (riche en α-actine et chaîne légère de la myosine) dans la media. L'Hcy pourrait agir sur l'expression des MMP d'après plusieurs études. L'exposition de cellules HUVEC avec des concentrations d'Hcy supérieures à 50 µM entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité des MMP-9 et MMP-2 (Chaussalet *et al.*, 2004). D'autres études ont également observé dans des CMLV mises en présence de concentrations pathologiques d'Hcy (50 et 100 µM), une augmentation de l'expression et de l'activité de la MMP-2 (Guo *et al.*, 2007; Ke *et al.*, 2010). En revanche, une concentration physiologique de 10 µM de cet acide aminé soufré ou de 100 µM d'autres thiols tels que la méthionine et la cystéine étaient sans effet sur cette protéine. L'impact de l'Hcy sur l'expression de MMP-2 semble être dépendant de la production d'ERO (Ke *et al.*, 2010). L'AF a, quant à lui, la capacité de diminuer la production de MMP-2 induite par l'Hcy dans des cellules CMLV (Guo *et al.*, 2006). Chez des souris hyperhomocystéinémiques, il a été reporté une augmentation de l'expression des MMP-2 et -9, une diminution de celle des inhibiteurs des métalloprotéinases TIMP-3 et une élévation de la production d'O_2^- et de nitrotyrosines; ceci conjointement à la réduction de l'élasticité de l'aorte observée par l'augmentation de collagène au détriment de l'élastine (Steed *et al.*, 2010; Steed *et al.*, 2011). L'équilibre entre les MMP et les TIMP est important dans le renouvellement de la MEC. L'effet inducteur de l'HHcy sur les MMP pourrait être lié à sa capacité de réduire la formation du NO et à la capacité de ce dernier d'inhiber les MMP.

L'Hcy serait également capable d'induire **la prolifération des CMLV**, étape importante du développement de la plaque d'athérome. L'Hcy, à des concentrations supérieures ou égales à 0,1 mM, augmente la synthèse d'ADN dans les CMLV d'aortes de rats, associée à une augmentation des niveaux d'ARNm et des protéines des cyclines D1 et A. Ces protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire seraient activées par les voies ERK et Akt induites par l'Hcy (Tsai *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 2011). Récemment, une étude a montré qu'une quantité élevée de SAH dans les CMLV en culture et chez des souris $ApoE^{-/-}$, pouvait induire leur prolifération et leur migration *via* un mécanisme oxydatif dépendant de la voie ERK1/2 (Luo *et al.*, 2012). L'Hcy pourrait aussi activer la voie p38 MAPK qui induit la NADPH oxydase. Cette dernière conduit ensuite à la libération d'ERO activant la prolifération des CMLV (Zou *et al.*, 2010). L'Hcy participerait donc à la prolifération des CMLV et pourrait même conduire à la nécrose et à l'apoptose de ces cellules. L'addition d'AF, dans le milieu de culture, diminue la concentration d'Hcy et pourrait reverser ces effets (Buemi *et al.*, 2001).

Le rétrécissement (sténose) et le durcissement de la paroi artérielle au cours du développement de l'athérome réduisent, notamment, le flux sanguin. L'instabilité de la plaque peut conduire à sa rupture et ainsi contribuer à la formation d'un caillot (*thrombus*).

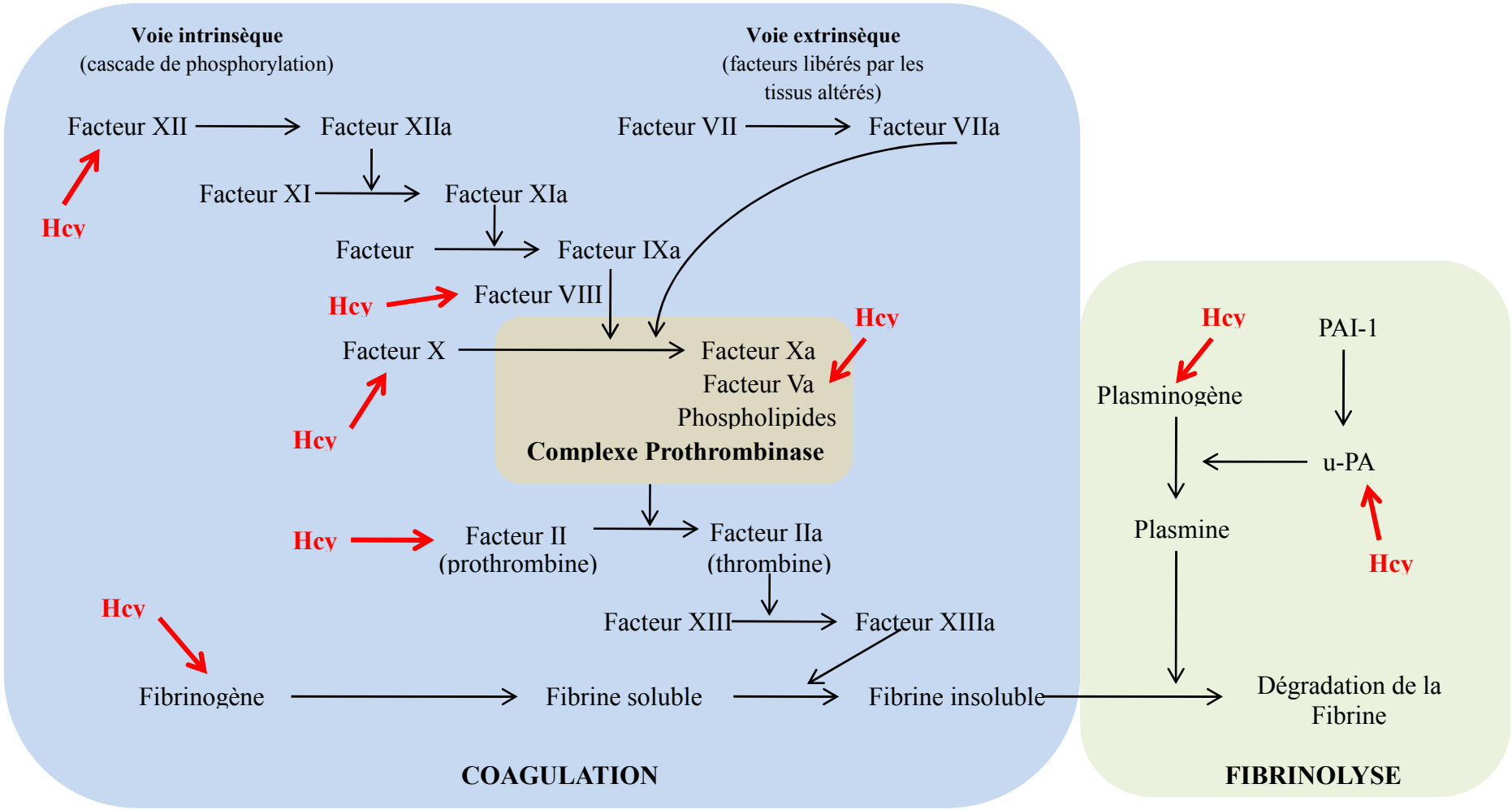
IV. 5. 2. La thrombose

L'HHcy pourrait être impliquée dans la thrombose. Il a été observé que la thrombose est accélérée au niveau de l'artère carotide de souris $CBS^{+/-}$ mais ne l'est pas chez des souris $ApoE^{-/-}$ avec une HHcy modérée sous l'effet d'un régime enrichi en méthionine et pauvre en folates (Wilson *et al.*, 2007). La formation du thrombus est un processus complexe qui dépend de la mise en route de deux systèmes : la coagulation d'une part et l'activation plaquettaire d'autre part. Lorsque la plaque d'athérome rompt, le débit de sang est très ralenti, activant les facteurs de coagulation (Francischetti, 2008). Le facteur XII du plasma est tout d'abord activé au contact de la paroi interne du vaisseau endommagé. Ceci déclenche alors une cascade de réactions conduisant à la stimulation de plusieurs autres protéines de la coagulation (facteur XI, facteur IX, facteur VIII) qui activent à leur tour le facteur X. Ce dernier se lie ensuite au facteur V pour former la prothrombinase qui catalyse la transformation de la prothrombine (facteur II) en thrombine (Jenkins *et al.*, 2012). Cette protéase convertit ensuite le fibrinogène en fibrines insolubles contribuant à former le caillot sanguin. Dans les conditions physiologiques, la dissolution des caillots sanguins (fibrinolyse) sous l'action de la plasmine

clôt le processus de coagulation, permettant la reperméabilisation du vaisseau sanguin réparé et la régression du thrombus. Dans l'athérothrombose, le réseau fibrineux formé dans la paroi peut évoluer du coté de la lumière vasculaire, où le flux sanguin est rapide, du fait de l'agrégation plaquettaire. Le thrombus peut alors atteindre une taille suffisante pour perturber l'écoulement et être à nouveau la cible des systèmes de coagulation. Il peut alors être à l'origine d'une obstruction ou encore d'une embolie.

L'altération du statut en PDM et l'HHcy pourraient contribuer au risque thrombotique. Une récente méta-analyse montre que de faibles concentrations circulantes en vitamine B12, folates mais aussi en vitamine B6 sont des facteurs de risque indépendants de thrombose veineuse (Zhou *et al.*, 2012). Aussi, une étude cas-témoins réalisée sur 1225 patients âgés de plus de 18 ans (comparativement à 1013 contrôles) a montré que de faibles concentrations sériques de vitamine B12 et folates, ainsi qu'une HHcy modérée, sont associées à un risque de thromboembolie veineuse (Oger *et al.*, 2006; Oger *et al.*, 2007). Parmi des patients atteints de cette pathologie, ceux présentant une HHcy modérée avaient une activité fibrinolytique diminuée comparativement à ceux présentant une homocystéinémie normale. Cette variation a été associée à l'activation de TAFI (Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor), un inhibiteur de la fibrinolyse (Colucci *et al.*, 2008). De même, une étude rétrospective sur des patients ayant des antécédents de thromboses veineuses ou artérielles a, de plus, rapporté une association entre l'HHcy et des concentrations élevées du facteur VIII (Lijfering *et al.*, 2007).

Des expérimentations chez l'animal ont vérifié l'hypothèse d'un effet pro-coagulant de l'Hcy. Ainsi dans l'étude de Jacobs *et al.*, (2011) des souris $CBS^{+/-}$ présentaient un état pro-coagulant et un risque thrombotique réduit après l'abaissement de l'homocystéinémie (Jacobs *et al.*, 2011). Cet effet proviendrait de la capacité de l'Hcy en excès, à activer certains facteurs de la coagulation **(Figure 32)**. L'HHcy induite par une déficience nutritionnelle en folates chez le rat, est associée à une augmentation de la vitesse de coagulation, de la taille du caillot sanguin et de l'activité fonctionnelle du facteur VIII. En revanche, l'activité des facteurs XII, X et II est réduite alors que celle du facteur VII reste inchangée. Une supplémentation en folates chez ces animaux a permis de normaliser l'homocystéinémie et de réverser les effets observés sur la coagulation et ses facteurs (Ebbesen *et al.*, 2005). De même, un traitement de 3 mois avec 5 mg/j d'AF annihilait le statut pro-coagulant de patients hyperhomocystéinémiques atteints de maladies des artères périphériques, en diminuant et augmentant, respectivement, leurs concentrations plasmatiques en fibrinogène et en plasminogène (Mayer *et al.*, 2002).



u-PA: Activateur du plasminogène de type urokinase
PAI-1: Inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène

Figure 32 : Implication de l'homocystéine dans la coagulation et la fibrinolyse. *Adapté de Karolczak et al., 2009.*

Des études plus récentes ont montré l'implication, non seulement de l'Hcy mais aussi de l'HTL dans le mécanisme de thrombose. L'HTL comme l'Hcy, inhibe la conversion du plasminogène en plasmine, c'est à dire la fibrinolyse. Le mécanisme de cette inhibition impliquerait une diminution de l'activité de l'urokinase et de la streptokinase toutes deux activatrices du plasminogène (Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2012). L'Hcy et l'HTL participent à l'agrégation plaquettaire. *In vitro*, des concentrations d'Hcy élevées (50-100 µM) et d'HTL beaucoup plus faibles (0,1-1 µM) ne peuvent provoquer à elles seules une agrégation plaquettaire. Cependant, elles augmentent significativement l'adhésion des plaquettes au collagène et au fibrinogène induite par la thrombine. Les faibles concentrations d'Hcy (10 et 25 µM) n'ont pas d'effet sur ce phénomène. L'HTL apparait donc beaucoup plus efficace que l'Hcy sur l'agrégation plaquettaire puisqu'il participe, à de faibles concentrations (0,1-1 µM), aux propriétés d'adhésion des plaquettes (Olas *et al.*, 2008; Malinowska *et al.*, 2012). Une des raisons de son efficacité serait sa liaison aux acides aminés libres et la formation de ponts disulfures inappropriés au niveau de protéines. Ainsi, le fibrinogène est facilement N-homocystéinylé par l'HTL *in vitro* (Jakubowski, 1999, 2000) et est retrouvé *in vivo* chez les personnes dont les gènes de la CBS et de la MTHFR sont mutés (Jakubowski, 2002; Jakubowski *et al.*, 2008). De plus, le fibrinogène N-homocystéinylé pourrait conduire à une résistance anormale des caillots de fibrines à la lyse contribuant à un risque accru de thrombose (Jakubowski, 2008). L'activité de l'antithrombine, le plus important inhibiteur de la coagulation sanguine, pourrait également être inhibée par l'HTL (Gugliucci, 2008). L'HTL participe donc à la malformation voire à l'inactivation de protéines. Les protéines N-homocystéinylées ont la propriété de s'agréger, conduisant à l'induction d'un stress du RE, d'une réponse UPR, d'une inflammation voire à de l'apoptose (Bogdanski *et al.*, 2008; Khodadadi *et al.*, 2012). Un autre mécanisme contribuant à la thrombose serait lié à la biodisponibilité du NO. En effet, ce dernier est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et dans les plaquettes, l'Hcy peut inhiber sa synthèse tout en augmentant celle d'O_2^-.

Quant à une supplémentation en AF de 1 mg/j pendant 3 mois, elle permettrait de diminuer la formation de thrombine (Undas *et al.*, 2007).

L'Hcy augmente l'expression et l'activité de certains facteurs de coagulation et diminuerait la fibrinolyse, expliquant son rôle dans le développement de thrombose. L'HTL serait plus nocif que l'Hcy puisqu'il agirait à des concentrations beaucoup plus faibles.

IV. 5. 3. La défaillance cardiaque

IV. 5. 3. 1. Implication de la déficience en PDM et/ou de l'HHcy

Récemment, une étude a évalué si un statut pauvre en folates et en vitamine B12 pouvait expliquer la relation entre l'Hcy et le risque d'insuffisance cardiaque. Les résultats démontrent que l'HHcy, et non le statut en folates ou en vitamine B12, est corrélée avec la sévérité de l'insuffisance cardiaque (Herrmann *et al.,* 2007a). La déficience en PDM et ses conséquences au niveau du remodelage cardiaque ont été encore très peu étudiées. En 1986, Mohammed et al. observaient que les oreillettes du cœur de moutons carencés pendant 34 semaines en cobalt et en vitamine B12 étaient nécrosées (Mohammed *et al.,* 1986). Néanmoins, dans cette étude l'évaluation des niveaux circulant d'Hcy n'avait pas été réalisée. L'essentiel des études porte donc sur les effets de l'HHcy. Bien qu'une absence d'anomalies cardiovasculaires ait été rapportée dans une étude sur des souris CBS-/- présentant une HHcy sévère (Gupta *et al.,* 2009), les résultats de la majorité des travaux suggèrent l'existence d'un impact de l'HHcy sur le risque d'altération cardiaque. Une étude réalisée chez des patients insuffisants cardiaques a montré qu'une HHcy modérée (18-30 µM) était associée à une augmentation du marqueur d'insuffisance cardiaque, le NT-proBNP (Gueant Rodriguez *et al.,* 2012). En effet, l'augmentation de la pression intra-ventriculaire entraîne un étirement des cardiomyocytes et la synthèse d'une pro-hormone, le pro-BNP. Cette pro-hormone est clivée en deux parties: une partie C-terminale active, le BNP, et une partie N-terminale, le NT-proBNP. Le niveau circulant des peptides natriurétiques représente un indicateur fidèle de la souffrance cardiomyocytaire et reflète donc la fonction ventriculaire. Il augmente notamment avec l'élévation de la pression diastolique gauche (Ghosh *et al.,* 2011). Dans l'étude précédemment décrite, les concentrations élevées de MMA, marqueur de carence en vitamine B12, et de NT-pro-BNP mesurées dans le plasma des patients étaient aussi corrélées (Gueant Rodriguez *et al.,* 2012).

Cliniquement, les modifications liées à la défaillance cardiaque se manifestent par des atteintes modifiant la taille, la forme et le fonctionnement du cœur. Ainsi, une hypertrophie cardiaque a été démontrée chez des souris sauvages ayant développées une HHcy modérée après plusieurs semaines de consommation d'une eau enrichie en Hcy. Ces souris présentaient aussi une augmentation des parois et une diminution du débit aortique (Steed *et al.,* 2010). De même, chez des ratons nés de mères nourries avec un régime déficient en folates, vitamine B12 et choline, une HHcy modérée a été reportée conjointement à une accumulation cardiaque d'Hcy et une hypertrophie du myocarde (augmentation de l'épaisseur des parois du

ventricule gauche) (Garcia *et al.*, 2011). En outre, l'HHcy peut aussi induire une arythmie cardiaque *via* une augmentation de l'intervalle PR de l'électrocardiogramme (marqueur du temps de conduction auriculo-ventriculaire) (Givvimani *et al.*, 2011).

IV. 5. 3. 2. Les mécanismes physiopathologiques de l'HHcy

Parmi les mécanismes physiopathologiques de l'HHcy, le remodelage de la MEC a été proposé. Dans le myocarde sain, les MMP sont latents. En cas d'insuffisance cardiaque et d'HHcy, les MMP sont alors activés (Tyagi *et al.,* 1998). Ainsi, l'expression de la MMP-9, de la connexine 43 et du collagène était augmentée dans le cœur de souris hyperhomocystéinémiques, alors que celle de l'élastine était diminuée, conduisant à une fibrose (Givvimani *et al.,* 2011). La rigidité tissulaire conséquente conduit au dysfonctionnement diastolique. Dans un modèle d'hypertension, une HHcy intermédiaire ou sévère, induite par différents régimes conduisait à une augmentation des dépôts de collagène dans le tissu myocardique et de l'épaisseur des parois des artérioles coronaires, ainsi qu'à un dysfonctionnement diastolique (Joseph *et al.,* 2002). Joseph *et al.* (2003) ont montré qu'une HHcy intermédiaire induite chez le rat par un régime enrichi en Hcy entraîne une hypertrophie du ventricule gauche caractérisée par une augmentation des parois du myocarde détectable par échographie (Joseph *et al.,* 2003). L'analyse histologique montrait également que les cardiomyocytes des rats avaient un diamètre augmenté associé à une accumulation de collagène. L'HHcy serait un stimulus indépendant de l'hypertrophie ventriculaire gauche qui mimerait l'action de médiateurs humoraux comme l'angiotensine II et l'aldostérone qui initient le dépôt de collagène. La fibrose du myocarde induite par l'HHcy modérée produite par une administration prolongée de méthionine chez le rat a été associée à une augmentation de TGF-β1 (Raaf *et al.,* 2011). Or ce dernier a été impliqué dans le développement de fibrose et d'hypertrophie ventriculaire (Sakata *et al.,* 2008). L'HHcy pourrait aussi induire une hypertension via une diminution de la production d'H2S. En effet, l'Hcy inactive par homocystéinylation la cystathionine-γ-lyase, ce qui diminue la production d'H2S qui est un vasorelaxant (Sen *et al.,* 2010b). En outre, elle peut contribuer au recrutement de cellules inflammatoires telles que des mastocytes qui, à leur tour, sécrèteront des médiateurs de l'hypertrophie, de la mort cellulaire et de la formation de fibrose (Joseph et al., 2005). Ces études montrent clairement que l'excès d'Hcy altère le cœur notamment par l'induction d'une rigidité du tissu cardiaque.

Un des effets délétères de l'HHcy est la génération d'un **stress oxydant**. Une homocystéinémie de 100 µM altère la fonction contractile de cardiomyocytes isolées de rats et induit leur apoptose par la diminution de protéines anti-oxydantes (par ex. la thioredoxine) et l'augmentation de la production d'ERO *via* l'activation de p38 MAPK (Wang *et al.*, 2012b). Des rats rendus homocystinuriques par l'injection sous-cutanée d'Hcy présentaient, au niveau cardiaque, une augmentation de la formation d'ERO et de marqueurs de la peroxydation lipidique et une diminution des SOD et catalase, comparativement à leurs témoins. Une administration intra-péritonéale journalière d'AF permettait de contrecarrer l'altération du statut redox induite par l'HHcy (Kolling *et al.*, 2011). Les changements fonctionnels et structurels engendrés par le stress oxydant contribueraient au remodelage myocardique. En effet, une altération de la fonction systolique accompagne une augmentation du collagène et de la production de MDA dans le cœur de rats ayant une HHcy modérée. Ces paramètres reviennent à la normale lorsque ces animaux sont remis sous un régime normal (Devi *et al.*, 2006). De plus, l'incubation de cardiomyocytes avec 100 µM d'Hcy induit une augmentation de l'expression des ARNm de MMP-9 et -2 et une diminution de TIMP-4 en parallèle d'une augmentation de NOX-4. Ces résultats suggèrent que le remodelage des cellules cardiaques est dû au stress oxydant induit par l'Hcy (Mishra *et al.*, 2009).

Un des organites importants pour le fonctionnement cardiaque et sensible au stress oxydant est la **mitochondrie**. L'Hcy peut aussi altérer le potentiel de membrane mitochondrial par l'induction d'un stress oxydant. Dans des cellules endothéliales en culture, issues de la microvascularité du cœur de rat, la production d'ERO est accompagnée de la libération de cytochrome C. Ce dernier active les caspases qui dégradent de nombreuses protéines nucléaires comme les poly(ADP-ribose) polymérases, conduisant au clivage de l'ADN et donc à l'apoptose (Tyagi *et al.*, 2006). L'augmentation de la production de H_2O_2 et d'O_2^- a été associée à une diminution des activités MnSOD et catalase dans les mitochondries de cœur de rats ayant une HHcy sévère (Chang *et al.*, 2004). L'excès d'ERO pourrait également altérer la membrane mitochondriale *via* notamment une production locale de MDA. Chez ces rats, une diminution concomitante de l'activité de la Ca^{2+}-ATPase et du flux de calcium contribuait à une activité réduite de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chang *et al.*, 2004). Cette atteinte de la chaîne respiratoire peut aussi être due à des délétions multiples de l'ADN mitochondrial dans le cœur des animaux hyperhomocystéinémiques. En effet, un régime déficient en folates peut conduire à une délétion de 4834 paires de bases dans l'ADN mitochondrial de différents tissus – cœur inclus - de rats, en relation avec leur vieillissement

(Cassano *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2007). Cette situation peut aussi conduire à une biogenèse mitochondriale compensatoire avec l'activation du facteur de transcription NRF-1 (nuclear respiratory factor) qui se fixe sur les régions promotrices des gènes *tfam* (mitochondrial transcriptional factor A) et *cytochrome c*, induisant ainsi leur expression (Chou *et al.*, 2007). L'hypothèse d'une altération de la mitochondrie par l'Hcy a aussi été vérifiée par l'analyse de l'ultrastructure de cardiomyocytes isolés de rat. Il en a été déduit que l'HHcy induit une augmentation de la perméabilité des mitochondries avec un effet sur leur potentiel électrique *via* notamment l'altération du flux de calcium (Moshal *et al.*, 2008). Ce phénomène a été relié à une activation des MMP-2 et -9 *via* l'activation de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) dans ces organites. L'Hcy semble donc générer un stress oxydant pouvant notamment affecter l'ADN, la structure et le potentiel de membrane des mitochondries, organites indispensables à la production énergétique et au bon fonctionnement cardiaque. Récemment, des auteurs ont montré, sur des cœurs isolés de rats, que des concentrations faibles d'Hcy et d'HTL (10 µM) pouvaient induire une altération de la contraction cardiaque caractérisée notamment par une diminution de la pression systolique du ventricule gauche et du flux sanguin coronarien (Zivkovic *et al.*, 2012). En revanche, dans cette étude, l'Hcy et l'HTL n'ont aucun effet sur les niveaux de production de TBARS, d'H_2O_2 ou de libération de NO. L'HTL diminuerait même la quantité d'O_2^- dans le cœur. Ces résultats sur les marqueurs du stress oxydant sont paradoxaux au vu des observations précédentes. L'HTL et l'Hcy pourraient donc affecter le cœur par d'autres mécanismes que le stress oxydant.

Quelques études ont également suggéré une implication de l'Hcy dans l'**autophagie et la mitophagie**. L'autophagie est un processus physiologique de digestion intracellulaire des organites et des protéines à durée de vie longue. La réponse autophagique peut être stimulée en situation de stress et constituer alors un mécanisme de survie cellulaire et d'adaptation *via* la dégradation des composants cellulaires altérés (Mizushima, 2007). Elle pourrait notamment être impliquée dans les maladies cardiaques. L'autophagie débute par la formation d'une double membrane appelée « vacuole initiale » ou « autophagosome » qui séquestre le matériel cytoplasmique à dégrader. Puis suivent une étape de maturation de l'autophagosome en vacuole, et la dégradation complète du matériel séquestré après fusion avec le lysosome. L'élimination sélective des mitochondries par autophagie, appelée mitophagie, a été récemment décrite. L'activation des MMP, l'augmentation du stress oxydant et l'altération de la perméabilité mitochondriale par l'HHcy sont des processus pouvant conduire à l'autophagie/la mitophagie (Vacek *et al.*, 2012). Une étude a montré que ce phénomène

résulterait plus particulièrement de l'activation de la MMP-9 et du NMDA, et de leurs effets délétères sur la respiration mitochondriale (Tyagi *et al.*, 2010). Cependant, les mécanismes mis en jeu restent encore à élucider.

IV. 5. 3. 3. Les effets des supplémentations en PDM

Une supplémentation en PDM permettrait de réverser certains des effets de l'HHcy sur l'insuffisance cardiaque. Une supplémentation en AF de 4 semaines pourrait diminuer les concentrations déjà élevées de NT-proBNP chez des sujets sains d'en moyenne 57 ans et ayant une HHcy (Witte *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2007b). Pour autant, l'amélioration du statut en PDM n'a pas toujours les effets désirés puisque des concentrations plasmatiques en bétaine les plus fortes (>70 µM) sont significativement associées à celles du NT-proBNP chez des patients ayant un syndrome coronarien aigu (suite à la fissuration d'une plaque d'athérome coronaire) (Lever *et al.*, 2012).

Dans des modèles animaux, la supplémentation en AF semble améliorer certains paramètres cardiaques. Une étude a montré qu'une supplémentation en AF et vitamine B12 pendant 4 semaines permet d'augmenter la concentration de glutathion et de diminuer la formation de MDA, la tachycardie et la nécrose au niveau du cœur de rats (Hagar, 2002). Cependant même si ces paramètres sont significativement améliorés, la supplémentation en PDM ne permet pas un retour complet aux valeurs normales. Une étude a néanmoins montré qu'une supplémentation en AF (2,25 mg/jour) pendant les 4 semaines suivant un infarctus permet, chez la souris, de limiter significativement le dysfonctionnement du cœur en améliorant la pression et les volumes d'éjection systolique et diastolique, en maintenant la contraction myocytaire et en atténuant l'accumulation de collagène *via* la normalisation des niveaux de TIMP et de MMP. La supplémentation en AF permet aussi de restaurer l'expression de la CBS, la cystathonine-γ-lyase et la MTHFR altérée par l'infarctus, et ainsi prévenir l'augmentation d'Hcy (Qipshidze *et al.*, 2010).

La supplémentation en PDM semble donc améliorer certains paramètres cardiovasculaires clés. Néanmoins de nombreuses études restent à réaliser pour mieux comprendre leurs effets.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) chiffre à environ 1/3 les décès causés par les maladies cardiovasculaires dans le monde. Avec le vieillissement de la population, une hausse de 50% du nombre de cas d'insuffisance cardiaque et d'infarctus est présagée au cours des 25 prochaines années. Il parait donc indispensable d'étudier et de prendre en compte tous les facteurs de risque et de les étudier. Parmi ceux-ci, l'hyperhomocystéinémie a suscité un intérêt croissant puisque le risque associé à une concentration circulante élevée d'Hcy a été jugé comparable à celui associé à d'autres facteurs de risque bien reconnus comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle ou encore le tabagisme. L'Hcy est un acide aminé soufré dont le métabolisme est contrôlé par les précurseurs de méthyles (PDM) telles que les vitamines B12 (ou cobalamine) et B9 (ou folates), ainsi que la choline, apportés en grande partie par l'alimentation. Leur consommation insuffisante ou leur malabsorption peut générer une déficience en ces nutriments avec pour conséquence une élévation des niveaux d'homocystéinémie. Des études ont montré qu'une HHcy modérée était associée à un risque accru de crise cardiaque, d'accident vasculaire cérébral (AVC) et de thrombose. Indépendamment de l'HHcy, une déficience en PDM pourrait, en tant que telle, contribuer également au risque de pathologies cardiaques. Depuis plus de 20 ans, de nombreux travaux expérimentaux et cliniques ont tenté de caractériser ces associations. Toutefois les mécanismes pathogènes restent encore mal connus. De ce fait, dans le cadre de ce projet de recherche, mon objectif a été de **mieux comprendre les effets d'une déficience en folates ou en plusieurs PDM et de l'HHcy pouvant en résulter, sur le protéome cardiaque**.

Dans un premier temps, nous avons recherché des modifications du profil protéique du myocarde chez des ratons de 21 jours nés de mères déplétées en PDM (modèle animal de déficience nutritionnelle élaboré à l'U954 de l'INSERM) comparativement à des ratons témoins du même âge nés de mères normalement nourries. Les ratons expérimentaux présentaient une HHcy et une hypertrophie cardiaque. Pour comparer les profils d'expression protéique, nous avons réalisé une analyse protéomique basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse. Le but de cette étude était de déterminer les voies métaboliques altérées au niveau cardiaque par la déficience en PDM puis d'étudier plus particulièrement et précisément certaines protéines d'intérêt parmi celles identifiées.

Dans un second temps, sur la base des données de la littérature sur les effets d'une déficience en PDM ou d'une HHcy, nous avons recherché si cette condition induisait un stress oxydant au niveau du myocarde des ratons de notre modèle. Une augmentation des concentrations

tissulaires d'Hcy favorise son oxydation en homocystine avec formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les protéines constituent l'une des cibles des radicaux libres ainsi produits en subissant différents types de modifications post-traductionnelles (MPT) oxydatives dont la principale est la carbonylation. Nous avons recherché si ce type de MPT pouvait affecter les protéines du myocarde des rats déficients en PDM et être un des processus à l'origine de l'altération du protéome.

Nous avons alors entrepris une approche cellulaire *in vitro* afin de mieux comprendre les mécanismes responsables des variations d'abondance de plusieurs protéines cibles identifiées *in vivo* par l'analyse protéomique. A notre connaissance, aucun modèle cellulaire cardiaque de déficience en PDM n'avait encore été réalisé. Dans un troisième temps, nous avons donc développé un modèle de déficience en folates, vitamine B12 et choline, induisant une augmentation significative de la production d'Hcy extracellulaire. Cette augmentation peut être considérée comme un reflet de l'HHcy observée *in vivo*. Du fait du rôle majeur des folates dans le métabolisme des unités carbonées, un second modèle cellulaire a été réalisé en parallèle, déficient uniquement en folates et ne générant pas d'augmentation d'Hcy. Des différences ont été recherchées entre les effets cellulaires des deux types de déficiences, déficience complète en PDM d'une part et uniquement en folates d'autre part. Nous avons fait le choix d'utiliser la lignée de cardiomyoblastes de rat H9c2, régulièrement utilisée comme modèle cellulaire d'ischémie ou d'hypertrophie cardiaque. Plusieurs milieux de culture, basé sur le milieu MCDB 131, avec différentes teneurs en PDM ont été réalisés dans le cadre de cette étude.

La quatrième et dernière partie de mon travail de thèse a consisté à analyser si les effets de la déficience en PDM sur le protéome cardiaque des ratons étaient retrouvés *in vitro* sur le profil protéique des cellules H9c2 et plus spécifiquement sur l'abondance de protéines cibles, identifiées dans l'étude *in vivo*. Ceci a pu être vérifié dans le cas de protéines chaperones ou intervenant dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique. Ces dernières participent à la réparation de protéines malformées ou susceptibles d'être dégradées, du fait par exemple de MPT oxydatives par carbonylation comme nous avons pu l'observer *in vivo* sur la globalité des protéines myocardiques. L'impact de cette condition nutritionnelle sur les mécanismes de réparation et de dégradation des protéines a été encore peu étudié. Nous avons donc entrepris de le faire au niveau de l'expression de plusieurs gènes connus pour être impliqués dans ces processus.

MATERIELS ET METHODES

La section « Matériels et Méthodes » présentée ci-dessous décrit les modèles d'études, animal et cellulaire, et les différentes techniques utilisées. Ces données complètent celles apportées dans les publications scientifiques qui sont présentées dans la partie « Résultats ».

La **première étude** avait pour but (i) de déterminer des changements induits par une déficience maternelle en PDM (folates, vitamine B12 et choline) au niveau du protéome cardiaque de ratons, (ii) d'évaluer l'implication du stress oxydant dans ce modèle et (iii) de développer un modèle cellulaire (lignée de cardiomyoblastes H9c2) de déficience en PDM afin d'étudier plus spécifiquement la régulation de l'expression de certaines des protéines identifiées *in vivo*. Dans une **seconde étude**, nous nous sommes également intéressés à l'impact d'une simple déficience en folates sur le protéome des mêmes cardiomyoblastes, comparativement à celui d'une exposition similaire des cellules à un milieu complet ou déficient en 3 PDM. Notre intérêt s'est porté en particulier sur les modifications d'expression de gènes/protéines impliqués dans le stress du RE et la protéolyse. Enfin, ce chapitre inclut également une partie décrivant les méthodes utilisées dans le cadre d'**« Expérimentations supplémentaires** », c'est à dire la mesure du stress oxydant cellulaire par une méthode de cytométrie en flux et celle des concentrations cardiomyoblastiques de SAM et SAH par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), récemment mise au point au laboratoire.

I. Première étude

I. 1. Modèles utilisés

I. 1. 1. Modèle animal : des ratons de 21 jours déficients en PDM après une carence nutritionnelle chez la mère.

Nous avons utilisé les cœurs de ratons du modèle de déficience en 3 PDM développé par l'Unité INSERM U954 (Faculté de médecine de Nancy). Dans celui-ci, des rates Wistar (Charles River, l'Arbresle, France) ont été nourries *ad libitum* soit avec un régime standard complet contenant de la vitamine B12 (0,04 mg/kg), de l'AF (0,9 mg/kg) et de la choline (2100 mg/kg), soit avec le même régime déplété en ces 3 donneurs de méthyles (Blaise *et al.*, 2007). Comme montré dans la **Figure 33**, les 2 groupes de rates témoins et carencées ont été ainsi alimentés sans interruption durant un mois avant accouplement, puis pendant leur gestation et enfin durant la période d'allaitement de leurs nouveau-nés. Les ratons ont été sacrifiés au 21ème jour et différents organes ont été prélevés, congelés rapidement dans l'azote et stockés à -80°C.

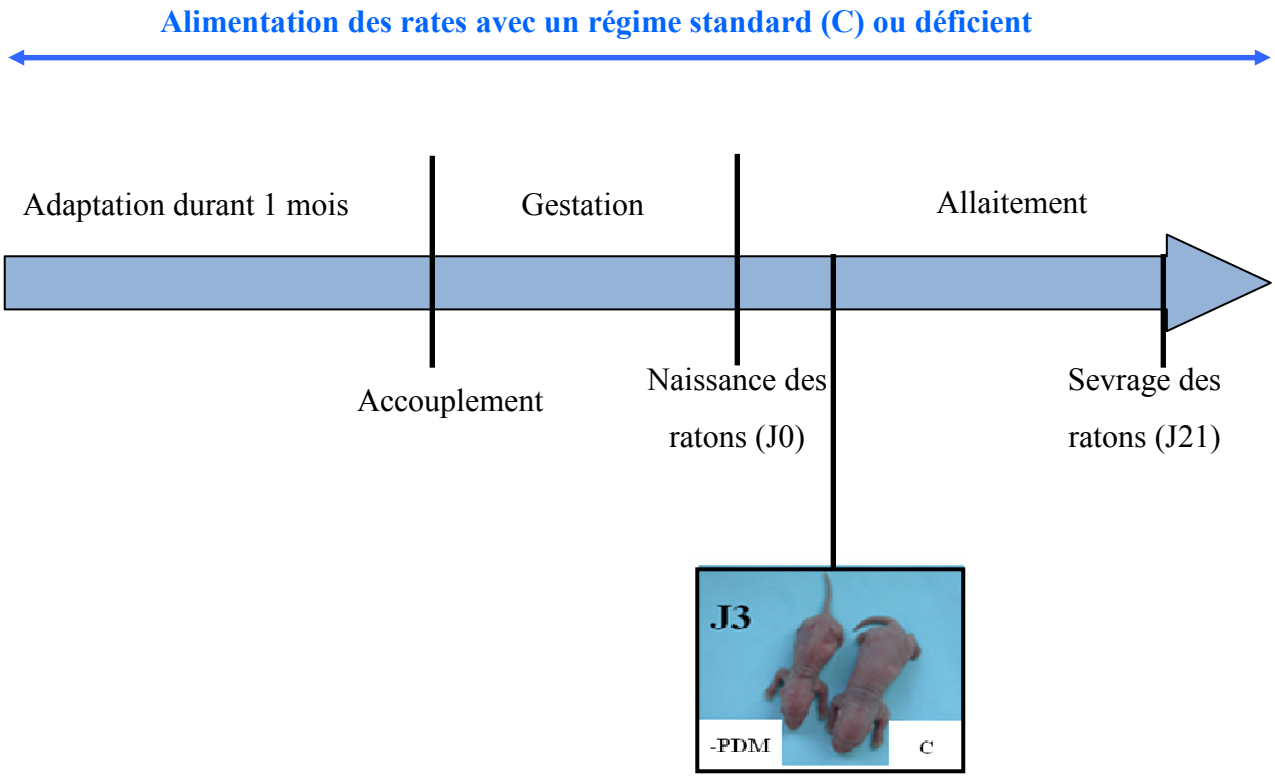


Figure 33 : Protocole suivi par l'INSERM U954 pour l'obtention de ratons déficients en précurseurs de méthyle. *D'après Blaise et al., 2007*

Un tel protocole permet l'obtention de ratons multi-carencés en folates, choline et vitamine B12, une déficience en cette dernière étant notamment difficile à installer chez un rat adulte du fait de l'importance de ses réserves tissulaires relativement à ses besoins. Blaise *et al.* (2007) ont montré que les ratons rendus ainsi déficients en PDM (-PDM) présentaient des concentrations plasmatiques en vitamine B12 et folates significativement diminuées et une homocystéinémie significativement augmentée, comparativement à leurs témoins (C). Garcia *et al.* (2011) ont de plus rapporté l'existence d'un lien entre la déficience en PDM et le développement d'une hypertrophie cardiaque dans le même modèle. Ils ont ainsi démontré chez ces ratons (i) une accumulation anormale d'Hcy dans le myocarde (uniquement détectable dans l'épicarde chez les ratons C), (ii) un épaississement des parois du myocarde, (iii) des niveaux plasmatiques du BNP très supérieurs à 0,1 ng/ml, une valeur seuil associée au risque d'insuffisance cardiaque, à relier à (iv) un défaut de la β-oxydation mitochondriale et une baisse significative des concentrations cardiaques en carnitine libre et totale, un acteur majeur du métabolisme lipidique également important dans la protection cardiaque.

I. 1. 2. Développement d'un modèle de cellules cardiaques carencées en PDM

Ce modèle a été réalisé avec la lignée H9c2, dérivée de cardiomyoblastes embryonnaires de rats (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) (Hescheler *et al.*, 1991). Cette lignée a été régulièrement utilisée dans des travaux sur l'hypertrophie cardiaque ou l'ischémie/reperfusion (Villeneuve *et al.*, 2009; Chou *et al.*, 2010). Les cellules H9c2 ont la capacité de se différencier en cardiomyocytes. Cependant, dans notre étude, nous les avons maintenues sous la forme de cardiomyoblastes en les repiquant systématiquement à environ 70% de la confluence.

Afin de déterminer le moment à partir duquel les cellules devenaient déficientes en folates et vitamine B12 et celui où elles commençaient à libérer des quantités d'Hcy supérieures à leurs contrôles, nous avons tout d'abord réalisé une étude cinétique. Des cellules H9c2 ont été cultivées jusqu'à 14 jours dans un milieu -PDM comparativement à un milieu C. Ces différents milieux de culture ont été préparés au laboratoire sur la base de la composition du milieu MCDB 131. L'Hcy a été quantifiée dans le milieu extracellulaire par HPLC/fluorimétrie et les niveaux intracellulaires des folates et de la vitamine B12 ont été mesurés par dosage radioimmunologique durant les 14 jours de l'étude. Nos mesures (voir partie « Résultats ») nous ont conduit à exposer les cellules pendant 4 jours au milieu –PDM, définissant ainsi notre modèle cellulaire de déficience en folates et vitamine B12 avec une production anormale d'Hcy par les cardiomyoblastes, mimant une HHcy modérée **(Figure 34)**.

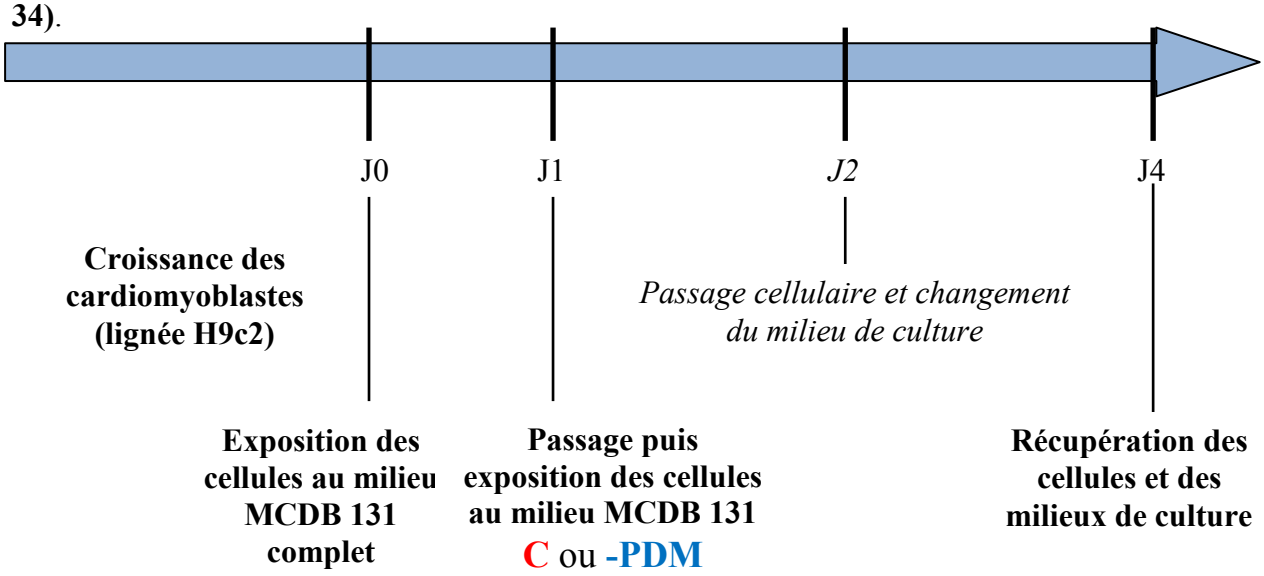


Figure 34 : Protocole de culture des cellules cardiomyoblastiques H9c2 dans le milieu synthétique MCDB 131 déficient en PDM (-PDM) ou contrôle (C) (Etude n°1). Toutes les

cellules H9c2 sont exposées à J0 au milieu complet. A J1, elles sont ensuite réparties en 2 groupes : (1) l'un cultivé dans le milieu **-PDM** et (2) l'autre cultivé dans le milieu **C**. Pour maintenir ces cellules sous forme de cardiomyoblastes, un passage est effectué à J2 dans le même milieu. Enfin à J4, les cellules et les milieux extracellulaires sont collectés.

I. 2. Préparation d'extraits protéiques

I. 2. 1. Extraction des protéines myocardiques

Chaque échantillon de myocarde a été homogénéisé dans un tampon d'extraction urée/thiourée [urée 5M, thiourée 2M, acide 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS) 4 %, Tris 40 mM, Biolyte (pH 3-10) 0,2 %, dithiothréitol (DTT) 50 mM] (BioRad Sigma) et broyé à l'aide d'un mini-potter. L'homogénat a été ensuite centrifugé à 18000 g durant 15 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires; le surnageant contenant les protéines a été récupéré et aliquoté en fractions de 100 µl conservées à -80°C.

I. 2. 2. Extraction des protéines cellulaires

Après 4j de déficience en PDM ou d'exposition au milieu C, les cellules ont été trypsinées, centrifugées puis reprises dans le tampon d'extraction urée 5M, thiourée 2M, CHAPS 4 %, 50 mM DTT, biolyte (pH 3-10) 0,2 % et conservées à -80°C.

I. 2. 3. Dosage des protéines

Principe : Ce dosage a été effectué par colorimétrie avec le kit Reducing agent Compatible Detergent Compatible (RCDC) (Biorad). La densité optique à 750 nm (DO_{750nm}) du produit réactionnel est proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon, déterminée par rapport à une gamme d'albumine bovine (BSA) réalisée avec des concentrations comprises entre 0 et 1,5 µg/ml.

Protocole : 25 µl de chaque concentration de BSA ou d'extrait protéique dilué ont été traités avec 125 µl de réactif I durant 1 min avant addition de 125 µl de réactif II. Les milieux réactionnels contenant les extraits ont été centrifugés à 15000 g durant 5 min à 15°C. Le culot a été conservé et resuspendu dans 125 µl de réactif I avant ajout de 40 µl de réactif II. Après une nouvelle centrifugation de 15 min à 15000 g et à 15°C, le culot protéique a été resolubilisé dans 127 µl de solution A durant 25 min sous agitation. Un ml de réactif B a ensuite été ajouté à la suspension et 200 µl de chaque mélange ont été déposés dans 2 puits d'une plaque 96 puits (Biorad). La concentration en protéines des échantillons a été

déterminée à partir de la droite de régression DO_{750nm}= f[Protéines] obtenue avec la gamme de BSA.

I. 3. Mesure du niveau totale de carbonylation des protéines

I. 3. 1. Marquage des carbonyles

La plupart des méthodes utilisées pour la détection des groupements carbonyles protéiques nécessitent une dérivation par le 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH) (Sigma) qui conduit à la formation de dinitrophénylhydrazone stable (DNP) détectable par spectrophotométrie ou immunorévélation.

I. 3. 1. 1. Dosage spectrophotométrique

Principe et but : Ce dosage est basé sur la différence de densité optique (DO) à 375 nm entre un échantillon traité par le DNPH et son témoin traité par l'HCl (solvant du DNPH). Cette méthode est consommatrice de grosses quantités d'extraits protéiques, ce qui la rend inutilisable dans le cas de nos échantillons de myocardes de ratons de 21j. En revanche, elle a pu être appliquée à la mesure de la carbonylation totale de protéines myocardiques de rats adultes (rats élevés à l'animalerie de l'UNH et nourris avec un régime standard) afin de réaliser un extrait étalon de teneur connue en carbonyles par unité de quantité de protéines.

Protocole : Une quantité connue (1 mg) de protéines myocardiques solubilisées dans 200 µl de tampon d'extraction urée/thiourée a été mélangée à 800 µl de DNPH (20 mM dissous dans HCl 2N) ou d'HCl 2N (témoin). Après une incubation d'1 h à l'obscurité avec une agitation au vortex toutes les 15 min, les protéines du mélange ont été précipitées par l'acide trichloracétique (TCA) 20 %, puis centrifugées 10 min à 10000 g et 4°C. Après élimination du surnageant, les culots ont été repris dans le TCA 10 % et la suspension re-centrifugée comme précédemment. Le culot récupéré a été lavé avec 1 ml d'un mélange acétate d'éthyle/éthanol (1:1; v/v) afin d'éliminer le DNPH en excès. Après centrifugation, le culot a été resuspendu dans 500 µl de guanidine hydrochloride 6M (Sigma) et 200 µl de chaque échantillon ont été déposés sur une plaque de 96 puits afin d'en déterminer la DO à 375 nm.

La méthode décrite ci-dessus entraîne toutefois des pertes protéiques au cours des précipitations successives. De ce fait, il est nécessaire de re-doser les protéines dans un tampon de guanidine hydrochloride au moyen du kit RCDC. La concentration totale en carbonyles des protéines myocardiques de rats adultes a été calculée en utilisant la valeur de 22.000 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ pour le coefficient d'extinction molaire de la DNP et exprimée en nmol de carbonyles par mg de protéines.

I. 3. 1. 2. Dot blot

Principe et but : Le Dot blot est une technique d'immunodétection semi-quantitative basée sur le dépôt de quantités croissantes d'échantillons protéiques sur une membrane sans séparation électrophorétique. Ceci nous a permis de faire une estimation de la quantité totale de carbonyles dans les protéines myocardiques et de comparer leurs niveaux chez les ratons carencés en PDM et chez les ratons C. Cette estimation (nmoles de carbonyles par mg de protéines) a été possible grâce une gamme réalisée en parallèle avec l'extrait protéique étalon de myocarde de rats adultes préalablement dosé par spectrophotométrie.

Protocole : Des quantités croissantes de protéines ont été déposées sur une membrane PVDF placée sous vide dans un appareil pour Dot-blot muni de 96 puits (Bio-Dot SF®, Biorad). Après filtration complète des extraits, la membrane a été incubée pendant 25 min à température ambiante dans 5 ml d'une solution de DNPH 10 mM afin de dériver les groupements carbonyles. Des essais préliminaires réalisés au laboratoire avaient en effet montré que les dot-blots, contrairement aux Western blots d'électrophorèse monodimensionnelle (EMD), étaient de moins bonne qualité lorsque les échantillons étaient traités par le DNPH préalablement à leur dépôt sur la membrane. Enfin, après lavage par HCl 2N (2 x 5 min), puis l'éthanol 100 % (4 x 5 min), la membrane a été traitée comme une membrane de Western blot.

I. 4. Analyse protéomique

Principe et but : L'analyse protéomique permet la caractérisation du profil protéique global d'un échantillon. Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule ou un tissu à un moment et dans des conditions données. Nous avons utilisé cette approche pour comparer les protéomes des myocardes des ratons déficients en PDM et de leurs contrôles C.

Protocole : L'analyse protéomique associe une technique séparative (électrophorèse bidimensionelle, EBD) à une technique d'identification (spectrométrie de masse) **(Figure 35)**. La première dimension de l'EBD a été réalisée au moyen du système Protean IEF cell (Biorad). 500 µg d'extrait protéique été mélangé au tampon de réhydratation (urée 9M, CHAPS 4 %, DTT 100 mM, biolyte 0,5 %, bleu de bromophénol 1 mg/ml). Pour l'électrofocalisation, le mélange a été chargé sur des bandelettes (« strips ») de polyacrylamide de 17 cm avec un gradient de pH immobilisé allant de 3 à 10 et non linéaire. Deux types de réhydratation ont ensuite été réalisés : la première, passive (voltage nul) durant 12h et la seconde, active durant 10h à 50V. Les gels ont ensuite été soumis à un voltage

augmentant graduellement de 200 à 4000V sur un total de 16h. Préalablement à la seconde dimension, une étape « d'équilibration des bandelettes » a été réalisée afin de charger négativement les protéines. Les bandelettes ont ainsi été incubées 15 min dans un tampon urée 6M, glycérol 30 %, SDS 2 %, Tris 0,05M et DTT 1 %, puis 20 min dans un tampon urée 6M, glycérol 30 %, SDS 2 %, Tris 0,05 M et iodoacétamide 2,5 %. Elles ont ensuite été positionnées en haut d'un gel de polyacrylamide à 12 % dans une mini-cuve Mini Protean II pour la réalisation de la seconde dimension (SDS-PAGE en présence du tampon Tris 25 mM/Glycine 39 mM/SDS 0,1 % à pH 8,3). La migration des protéines le long du gel permet leur séparation sous la forme de spots.

L'identification de protéines différemment exprimées entre les différentes conditions étudiées a été réalisée par la Plateforme d'Exploration du Métabolisme au moyen d'une technique de spectrométrie de masse (i) couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (ToF) ou (ii) combinée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS).

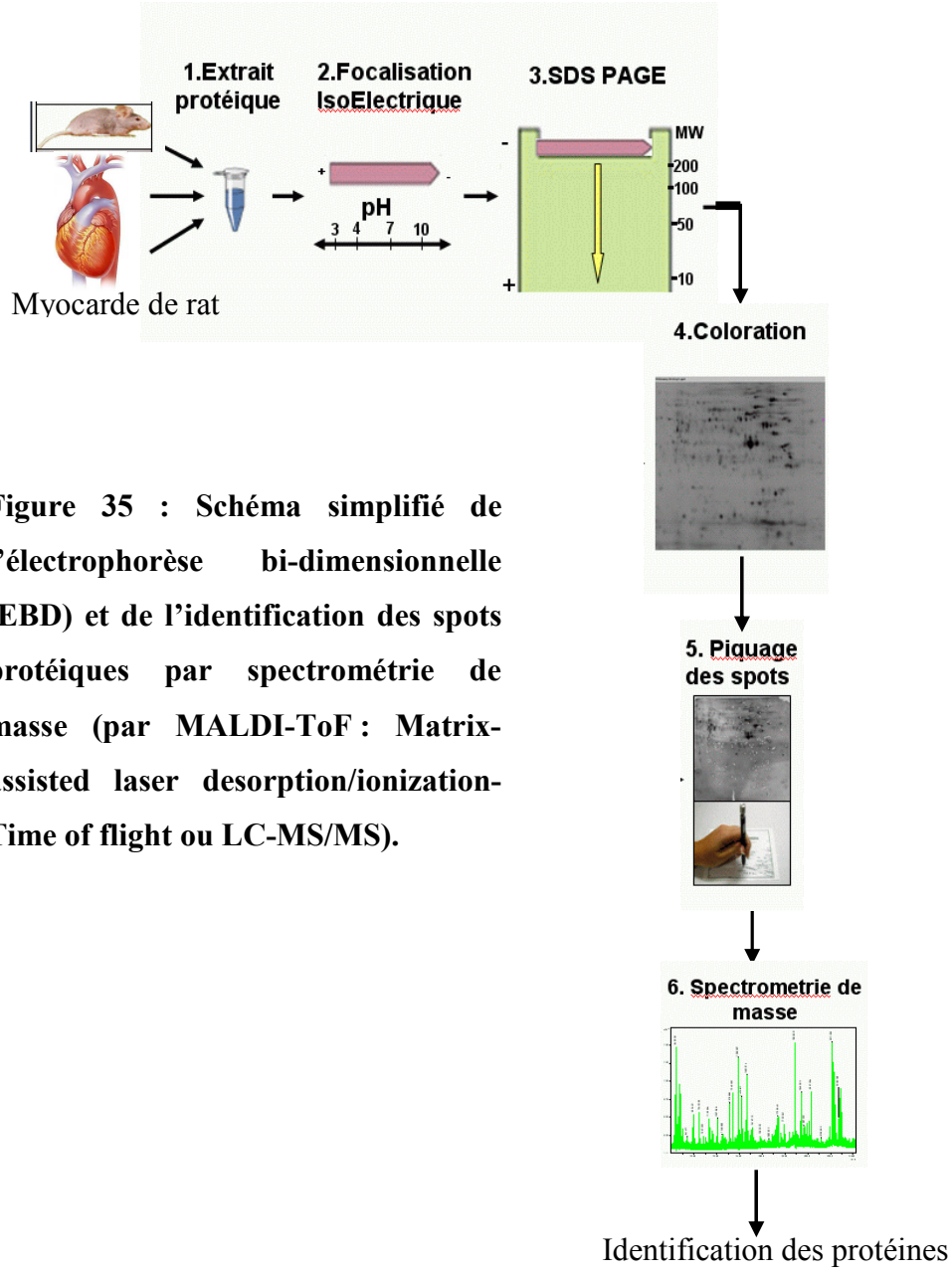


Figure 35 : Schéma simplifié de l'électrophorèse bi-dimensionnelle (EBD) et de l'identification des spots protéiques par spectrométrie de masse (par MALDI-ToF : Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight ou LC-MS/MS).

I. 5. Dosage de l'Hcy par CLHP

Principe et but : La concentration d'Hcy extracellulaire a été déterminée par une technique de CLHP couplée à une détection fluorimétrique (Pfeiffer *et al.*, 1999). Le but était de comparer les quantités d'Hcy produites et exportées dans le milieu de culture par les cardiomyocytes H9c2 déficients en PDM et leurs contrôles C.

Protocole : Les milieux de culture des cellules ont été prélevés après différents temps d'exposition et stockés à -80°C. Un mélange contenant 50µl du milieu extracellulaire et 50 µl de PBS (pH 7,4) a été incubé avec 10 µl de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) (Fluka) à 100 g/L pendant 30 min à température ambiante afin de réduire et libérer l'Hcy liée aux protéines ou à la cystéine, ou bien sous forme d'homocystine. L'échantillon a ensuite été déprotéinisé par l'addition de 90 µl de TCA à 100 g/L contenant 1 mM d'EDTA. Après centrifugation à 13000 g pendant 10 min, 50 µl de surnageant ont été prélevés et mélangés à 10 µl de NaOH 1,55 M, 125 µl de tampon borate de sodium 0,125M contenant 4 mM d'EDTA et 50 µl d'acide-7-fluorobenzofurane-4-sulfonique (SBD-F, Fluka) à 1 g/L préparé dans le tampon borate. Ce mélange a ensuite été incubé 60 min à 60°C pour former le produit fluorescent de la réaction du SBD-F avec l'Hcy. Après refroidissement à 4°C, le mélange a été filtré au moyen d'une seringue sur une membrane de porosité 0,45 µm.

La séparation par CLHP a été réalisée au moyen d'une colonne C18 nucléosyl (3 mm x 125 mm; granulométrie 5 µM, Macherey-Nagel) et dans des conditions isocratiques d'élution avec un tampon acétate de sodium (0,1 M, pH 5,5) circulant à un débit de 0,7 ml/min. Le volume d'injection de chacun des échantillons préparés à partir des milieux extracellulaires était de 10 µl.

L'Hcy a été quantifiée à partir d'une gamme étalon réalisée avec différentes dilutions d'une solution mère de D,L-Hcy 10 mM, traitées similairement aux milieux extracellulaires.

I. 6. Dosage des vitamines B9 et B12

Les dosages ont été effectués par *Philippe Gérard* à l'INSERM U954 (Nancy) sur des échantillons cellulaires que j'ai préalablement préparés au laboratoire. Après 4 jours de carence, les cellules sont trypsinées puis centrifugées. Le culot est ensuite repris dans un tampon PBS 0,1%. Les échantillons sont conservés à -80°C.

Les dosages reposent sur une technique radio-isotopique nécessitant l'utilisation du coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals). La vitamine B12 et les folates non marqués présents dans l'échantillon sont mis en compétition avec leurs homologues

moléculaires marqués (vitamine B12 [^{57}Co] et folates [^{125}I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. De ce fait, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de chacune de ces vitamines dans l'échantillon.

I. 7. Western blot

Principe et but : Cette technique nous a permis de comparer les niveaux d'expression relatifs des protéines myocardiques chez les ratons -PDM et leurs témoins C.

Protocole : Les protéines séparées par SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) (Amersham) dans une cuve d'électrotransfert (BioRad) en condition liquide (tampon Tris base 48 mM/Glycine 192 mM à pH 9,2,) pendant 30 min à 100 V. Les sites d'interactions non spécifiques ont été bloqués en incubant la membrane 1 h à température ambiante dans un tampon contenant un détergent, le Tris Buffer Saline-Tween® (TBS-T) à pH 7,6, et 5 % de lait écrémé ou de BSA. La membrane a ensuite été incubée une nuit à 4°C avec un anticorps primaire spécifique d'une protéine d'intérêt, puis rincée 2 fois pendant 15 min avec du TBS-T afin d'éliminer les molécules d'anticorps non liées avant incubation 1 h avec l'anticorps secondaire. Après 2 nouveaux rinçages de la membrane pendant 15 min, les protéines ont été révélées par chimioluminescence à l'aide du kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham). L'exposition de la membrane à un film photographique (Kodak, France) a permis la révélation de la (des) bande(s) protéique(s) reconnue(s) par l'anticorps primaire. L'intensité des bandes a été mesurée sur chaque piste au moyen du logiciel *Image J*®.

II. Seconde étude

Certaines méthodes/techniques utilisées dans cette étude étaient similaires à celles décrites dans la première. Leurs adaptations au modèle cellulaire, ainsi que les approches méthodologiques utilisées spécifiquement dans ce dernier, sont reportées dans cette partie.

II. 1. Développement d'un modèle de cellules cardiaques carencées en folates

La lignée de cardiomyoblastes H9c2 a cette fois-ci été exposée au milieu MCDB 131 déplété uniquement en acide folique, le milieu contrôle (C) restant identique à celui utilisé dans la première étude. L'étude cinétique également réalisée sur 14j a montré qu'une carence de 4j permettait d'obtenir des cellules déficientes en folates qui ne produisaient pas des quantités anormalement élevées d'Hcy comparativement aux contrôles **(Figure 36)**.

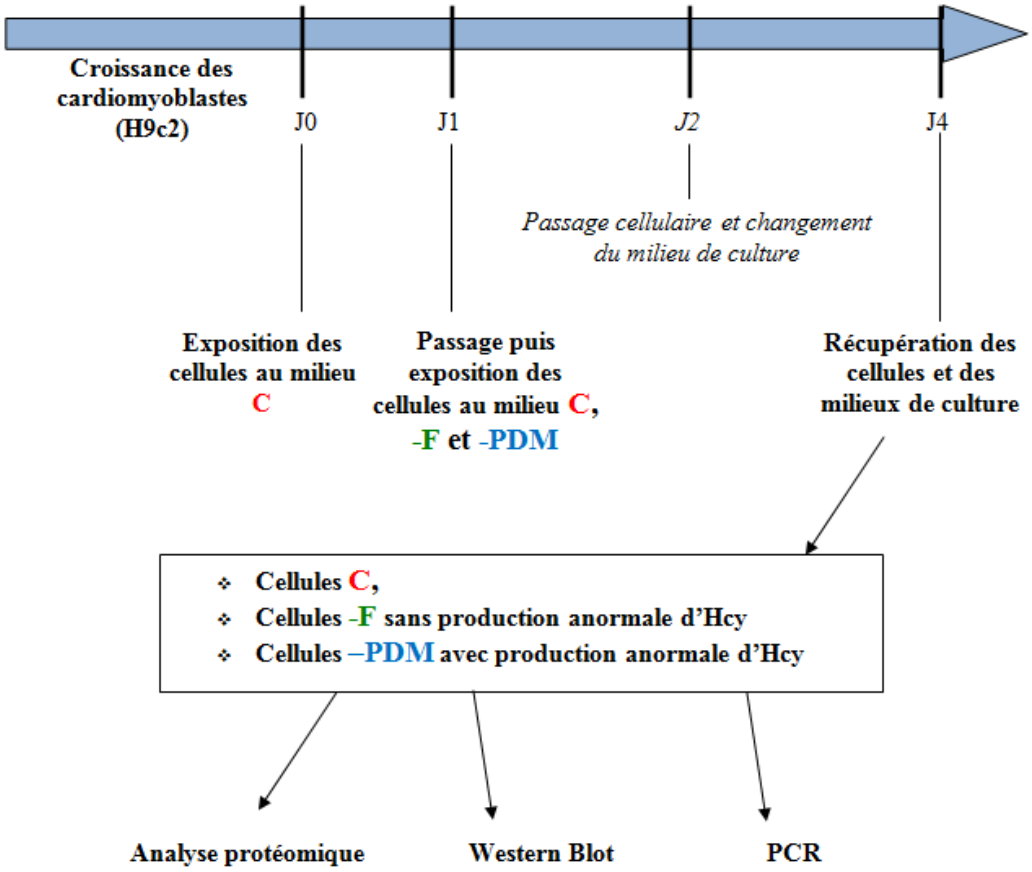


Figure 36 : Protocole de culture des cellules cardiomyoblastiques H9c2 dans le milieu synthétique MCDB 131 -F, -PDM ou C (Etude n°2).

II. 2. Matériels et méthodes

II. 2. 1. L'analyse protéomique

Elle a permis de comparer les protéomes des cellules exposées durant 4j au milieu -F, -PDM ou C. Les protéines cellulaires ont été extraites comme décrit dans le § 2.2 de la première étude. L'électrofocalisation a été réalisée avec des bandelettes de 7 cm. Des quantités de protéines beaucoup plus faibles ont pu être extraites à partir des cultures cellulaires comparativement aux myocardes des ratons. Ceci a conduit à la réalisation de gels de plus petite taille.

II. 2. 2. Extraction des ARNm

Les cellules ont été rincées avec du PBS avant extraction des ARN par le kit "RNeasy Mini Kit » (Qiagen, Hilden, Germany). La quantité et la qualité des préparations d'ARN ont été évaluées sur un gel d'agarose et par la détermination du rapport de leurs absorbances à 260 et

280 nm au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

II. 2. 3. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative (qRT-PCR)

Principe et but : La qRT-PCR permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle est réalisée en 2 étapes qui sont successivement, une transcription inverse et une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Notre but a été de comparer ainsi l'expression de gènes d'intérêt dans les cellules exposées à la condition -F ou -PDM et à la condition C.

Protocole : Un µg d'ARN a été traité avec une DNAse I pendant 15 min afin d'éliminer le DNA. Cette réaction a été stoppée par un traitement avec de l'EDTA 25 mM pendant 10 min. La réaction de transcription inverse a été réalisée en utilisant le kit « Superscript reverse transcription kit » (Invitrogen). La RT-PCR a été réalisée avec le kit « SYBR Green Supermix Kit » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) et à l'aide du thermocycleur CFX96 (Biorad).

III. Expérimentations supplémentaires

III. 1. Evaluation de la taille des cellules et du stress oxydant par cytométrie en flux

Principe et but : La cytométrie en flux est une technique permettant de caractériser des cellules en les faisant défiler à grande vitesse à travers le faisceau d'un laser. Nous l'avons utilisée pour évaluer la taille des cardiomyoblastes en culture et leur état de stress oxydant. Les informations sur la morphologie et la structure cellulaires ont été tirées de la lumière diffusée. Le stress oxydant a été évalué en utilisant un agent fluorescent, le MitoSOX, spécifique de la mitochondrie (Mukhopadhyay *et al.*, 2007). Le MitoSOX peut y être oxydé par l'ion superoxyde et émettre alors une fluorescence rouge (Excitation à 510 nm/Emission à 580 nm).

Protocole : Après 4j de condition -F, -PDM ou C, les milieux ont été prélevés et les cellules rincées avec du PBS avant d'être incubées pendant 20 min avec du milieu neuf en présence de MitoSOX 0,5 µM. Des cellules servant de contrôles positifs du stress oxydant ont été incubées pendant 45 min avec du tert-butyle (50 µM) préalablement au traitement par le MitoSOX. Toutes les cellules traitées ont été trypsinées et resuspendues dans un tampon PBS/EDTA 2 mM avant d'être analysées au cytomètre de flux.

III. 2. Dosages de la S-adénosyl-méthionine (SAM) et S-adénosyl-homocystéine (SAH) intracellulaires

But : La mesure des concentrations intracellulaires de SAM et SAH visait à évaluer la capacité de méthylation des cellules H9c2 dans la condition de déficience en folates ou en 3 PDM, relativement à la condition contrôle. Pour cela, une méthode de CLHP a été développée au laboratoire par *Mathieu Rambeau* et *Emilie Roche*.

Protocole : Des cellules à J4 ont été trypsinées puis centrifugées. Le culot cellulaire a été suspendu au vortex dans 250 µl de PCA 5% (v/v). Le mélange a été ensuite centrifugé à 13000 g durant 20 min à 4°C. Le surnageant a ensuite été prélevé et conservé à -80°C jusqu'au jour du dosage. Le culot résiduel a été repris dans une solution de SDS 1% et NaOH 0,1% dans le but de doser ultérieurement les protéines.

La chromatographie a été réalisée durant 45 min, sur une colonne Lichrospher 100 RP-18ec (dimensions : 250 x 4 mm, granulométrie 5 µm, Macherey Nagel) précédée d'une pré-colonne contenant la même phase (maintenues à 30 ± 5°C). Le débit de la phase mobile était de 0,75 ml/min et le gradient d'élution suivant était appliqué :

Temps (min)	Phase A	Phase B
0	100 %	0 %
30	40 %	60 %
31	0 %	100 %
35	0 %	100 %
36	100 %	0 %
45	100 %	0 %

avec :

- A = NaH_2PO_4 [50 mM, pH 3,2] + Heptanesulfonic Acid [10 mM] / Acétonitrile (95 / 5 v/v)
- B = NaH_2PO_4 [50 mM, pH 3,2] + Heptanesulfonic Acid [10 mM] / Acétonitrile (50 / 50 v/v)

Le volume d'injection de chaque extrait cellulaire était de 50 µl. Les pics de SAM et SAH ont été détectés et identifiés (par comparaison avec le spectre UV de solutions étalons) à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes balayant le spectre de longueur d'onde 210-400 nm. Les 2 molécules ont été quantifiées dans les échantillons après intégration des pics extraits à 258 nm et étalonnage externe avec une gamme réalisée avec différentes concentrations de SAH et SAM pures.

RESULTATS

I. Première étude (publication n°1)

I. 1. Introduction

La revue bibliographique qui précède a rappelé le risque élevé de déficience en PDM (Institut de Veille Sanitaire, 2006) et d'HHcy (Hornberger, 1998) dans certaines populations, telles que les femmes enceintes, les personnes âgées et les individus en situation de pauvreté et d'insécurité socio-économique (Roman Vinas *et al.*, 2011), ainsi que leur association avec diverses pathologies telles que les AFTN et les maladies chroniques liées au vieillissement (Blom *et al.*, 2006; Lazarou *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2011). L'HHcy résultant de la déficience en PDM pourrait jouer un rôle important dans le développement des MCV, voire en constituer un facteur de risque indépendant selon certains auteurs. L'existence d'une relation causale entre un statut déficient en PDM et la survenue de pathologies cardiovasculaires n'est toutefois pas encore établie. Les mécanismes proposés pour expliquer les effets délétères de la déficience en folates, vitamine B12 et/ou choline et de l'HHcy associée incluent le stress oxydant, ainsi que l'altération des acides nucléiques et l'expression des gènes (Sharma *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007; Duthie *et al.*, 2010). Néanmoins, des investigations sont encore nécessaires pour caractériser plus précisément ces mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du cœur qui, à ce jour, a été l'objet d'un nombre limité d'études *in vivo* chez l'animal déficient en PDM alimentaire.

I. 2. Objectifs

Ces données montrent la nécessité d'entreprendre de nouvelles études pour caractériser les mécanismes des effets de la déficience en PDM et l'HHcy sur le métabolisme cardiaque. Nous nous sommes particulièrement intéressés à leur impact sur le protéome de ce tissu afin d'identifier les voies métaboliques affectées. Tout d'abord, un stress oxydant étant régulièrement identifié en cas d'augmentation de l'homocystéinémie (Suematsu *et al.,* 2007; Tyagi *et al.,* 2011) et pouvant générer des MPT oxydatives sur des résidus protéiques, nous avons comparé les niveaux totaux de carbonylation des protéines myocardiques chez des ratons de 21 jours carencés en PDM (folates, vitamine B12 et choline) et leurs contrôles nourris normalement. Les myocardes ont été fournis par l'U954 de l'INSERM à Nancy. Les ratons carencés étaient issus de mères nourries avec un régime déficient en PDM avant le début et durant toute la gestation tandis que les animaux contrôles provenaient de mères alimentées normalement. Puis, nous avons

réalisé une analyse protéomique comparative entre les myocardes des 2 groupes de ratons. Les protéines présentant des différences d'abondance ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse et des réseaux métaboliques impliquant ces protéines ont été recherchés par une approche bioinformatique. Enfin, afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des modifications d'abondance protéique observées *in vivo*, nous avons développé un modèle de cellules cardiaques (lignée H9c2) en culture, carencées en PDM *(Cf. Matériels et Méthodes)* et produisant de ce fait des quantités accrues d'Hcy. A notre connaissance, aucun modèle de ce type n'avait encore été utilisé pour cette étude.

I. 3. Publication n°1 intitulée "Myocardium proteome remodelling after nutritional deprivation of methyl donors"

MYOCARDIUM PROTEOME REMODELLING AFTER NUTRITIONAL DEPRIVATION OF METHYL DONORS☆

Emilie Martinez[a], Nicolas Gérard[a], Maria M. Garcia[b], Andrzej Mazur[a], Rosa-Maria Guéant-Rodriguez[b], Jean-Louis Guéant[b], Blandine Comte[a], Patrick Brachet[a,*]

[a]INRA-Theix, UMR1019, Unité de nutrition humaine, CRNH Auvergne, Université d'Auvergne Clermont-Ferrand, France

[b]Inserm U954, Faculté de Médecine/CHU, Université Henri Poincaré, Nancy, France

Abbreviations: CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonic acid; CVD, Cardiovascular diseases; C, Control; 2-D, two-dimension; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; DTT, dithiothreitol; ERR-α, estrogen-related receptor-α; FBS, fetal bovine serum; FC, Fold change; HHcy, hyperhomocysteinemia; Hcy, homocysteine; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; p*I*, isoelectric point; MD, methyl donor; MDD, MD-deficient; MS, mass spectrometry; MW, molecular weight; PGC-1α, PPAR-γ co-activator-1 α; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PC, protein carbonyl; PTM, post-translational modification; sHSP, small heat shock protein

☆ Supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR PNRA Grant Nutrivigene 2007-2011). E.M. was sponsored by a doctoral fellowship from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (France).

* Corresponding author at: Unité Nutrition Humaine, Unité Mixte de Recherche 1019 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)/Université d'Auvergne, Centre INRA Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France. Tel.: +33 4 73 62 45 63; fax: +33 4 73 62 46 38. *E-mail address:* patrick.brachet@clermont.inra.fr

Abstract

Methyl donor (MD: folate, vitamin B12 and choline) deficiency causes hyperhomocysteinemia, a risk factor for cardiovascular diseases. However, the mechanisms of the association between MD deficiency, hyperhomocysteinemia, and cardiomyopathy remain unclear. Therefore, we performed a proteomic analysis of myocardium of pups from rat dams fed a MD-depleted diet to understand the impact of MD deficiency on heart at the protein level. Two-dimension gel electrophoresis and mass spectrometry-based analyses allowed us to identify 39 proteins with significantly altered abundance in MD-deficient myocardium. Ingenuity Pathway Analysis showed that 87% of them fitted to a single protein network associated with developmental disorder, cellular compromise and lipid metabolism. Concurrently increased protein carbonylation, the major oxidative post-translational protein modification, could contribute to the decreased abundance of many myocardial proteins after MD deficiency. To decipher the effect of MD deficiency on the abundance of specific proteins identified *in vivo*, we developed an *in vitro* model using the cardiomyoblast cell line H9c2. After a 4 day-exposure to a MD-deprived (*vs.* complete) medium, cells were deficient of folate and vitamin B12, and released abnormal amounts of homocysteine. Western blot analyses of pup myocardium and H9c2 cells yielded similar findings for several proteins. Of specific interest is the result showing increased and decreased abundances of prohibitin and α-crystallin B, respectively, which underlines mitochondrial injury and endoplasmic reticulum stress within MD deficiency. The *in vitro* findings validate the MD-deficient H9c2 cells as a relevant model for studying mechanisms of the early metabolic changes occurring in cardiac cells after MD deprivation.

Keywords: Methyl donor deficiency; Hyperhomocysteinemia; Myocardium; H9c2 cells; Proteomics

1. Introduction

Hyperhomocysteinemia (HHcy) has been invoked in addition to other major recognized risk factors (i.e. age, sex, diabetes…) for cardiovascular diseases (CVD), the chief cause of death in the world [1, 2]. HHcy is clinically defined by plasma homocysteine (Hcy) levels higher than 15 µM. Hcy is a sulfur amino acid produced through the one-carbon cycle from transmethylation of different compounds like hormones, neurotransmitters, nucleic acids, and phospholipids. S-adenosylmethionine is a critical substrate for these reactions, especially those related to epigenetic regulation [3]. Hcy requires methyl donors (MDs) such as folate (vitamin B9), vitamin B12 (cobalamin) or choline to be intracellularly remethylated into methionine [4]. One major consequence of MD deficiency is a mild or moderate HHcy characterized by circulating total Hcy concentrations in the 15-30 or 31-100 µM range, respectively. This condition has long been associated with an elevated risk of chronic pathologies like atherosclerosis, ischemic heart disease and stroke in humans [5]. MD deficiency and subsequent HHcy can occur in individuals with increased requirement and/or inadequate intake of either MD, e.g. during pregnancy or aging [6]. Supplementation with folic acid and/or other vitamins B reduces the concentration of circulating total Hcy in patients prior CVD, but has no beneficial effects on the development or onset of cardiovascular events [7]. The mechanisms of the association between cardiomyopathy and MD deficiency are not yet fully understood. Atherogenic effects of HHcy include a variety of cellular changes including endothelial dysfunction, inflammation, oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress [8]. MD deficiency has been shown to affect tissue structure, function or metabolism in rodents especially when occurring during pre- or perinatal periods [9-11]. However, data are currently limited on the impact of MD deficiency on the heart. Garcia *et al.* reported recently myocardial hypertrophy with cardiomyocyte enlargement, mitochondrial disorganization and dysfunction, and altered fatty acid oxidation and energy metabolism in weaning rats from dams fed a diet deprived of vitamin B12, folate and choline during gestation

and lactation [12]. This was concomitant with abnormal myocardial accumulation of Hcy and lipids, and impaired expression of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) α and γ, PPAR-γ coactivator-1α (PGC-1α) and estrogen-related receptor-α (ERR-α). Altered expression of these important functional proteins prompted us to investigate further the impact of maternal MD deprivation on the myocardial proteome of rat pups. Deficiency of one or several MDs, as well as intracellular Hcy accumulation, has been shown to cause imbalanced redox state in rat tissues, a condition favoring the development of CVD [13, 14]. Thus, we first evaluated changes in protein carbonylation, a major oxidative post-translational modification (PTM) of proteins, in myocardium of rat pups after maternal MD-deprivation. Then, we used a large-scale proteomic approach to bring new information on the effect of this deficient condition on the protein pattern of the myocardium of the offspring. Finally, aiming to develop a cell study model of MD deficiency, we used the H9c2 cardiomyoblast cell line to evaluate the impact of this condition on the abundance of specific proteins identified *in vivo* by the proteomic analysis. This cell line deriving from embryonic rat heart, has been shown to retain many characteristics of rat cardiomyocytes and is used as a model of cardiac hypertrophy [15, 16], one major feature of MD deficiency in rat pups [12].

2. Materials and methods

2.1. Rat dietary model

Dietary experiments on rats were performed at INSERM U954 (Nancy, France) according to local internal guidelines for animal care and housing and the National Institute of Health Guide for the care and use of laboratory animals. As previously described [12], adult female Wistar rats (Charles River, Les Oncins, France) were constantly maintained under standard laboratory conditions, with food and water available *ad libitum*. One month before mating, they were fed either standard food containing vitamins B12 (0.04 mg/kg), folate (0.9 mg/kg), and choline (2.1 g/kg) (control diet: C diet) according to the supplier (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or a MD-deficient (MDD) diet deprived of vitamins B12, folate, and choline (Special Diet Service, Saint-Gratien, France) [12]. The content of all other ingredients as well as the protein sources were identical in both diets. MDD and C diets were respectively maintained in both groups of dams until weaning of their offspring, i.e. at 21 days after birth, as described previously [12]. The 21 day-old pups were killed by decapitation after exposure to halothane and their heart was rapidly collected, washed in Ringer's buffer solution, freeze-clamped in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.2. Myocardium protein carbonylation

Protein carbonyls (PC) levels were determined using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay as described in [17]. A standard curve of carbonylation was performed with protein samples from adult rat myocardium using a spectrophotometry method. The PC content of these samples was calculated using the molar extinction coefficient of 22,000 $M^{-1}.cm^{-1}$ and expressed as nmol/mg protein. A dot-blot immunoassay was performed on PVDF membrane to quantify the total carbonylation of myocardial proteins in MDD *vs* C rats. Adducts of 2,4-dinitrophenyl hydrazone with PCs were probed with a specific primary rabbit antibody and a secondary goat

HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody provided with the OxyBlot oxidized protein detection kit (Chemicon International, Temecula, CA). Densitometry analyses of the dots were done using the ImageJ® 1.37v - software (Wayne Rasband, NIH, USA).

2.3.Myocardium proteomics analysis

Proteomic analysis was carried out as previously described, with a few changes [18]. Freeze-clamped whole myocardium was homogenized (using a mini-potter) in an extraction buffer made of 5 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonic acid (CHAPS), 40 mM Tris, 0.2% (v/v) biolytes pH 3-10, and 50 mM dithiothreitol (DTT). After homogenate centrifugation (18,000 x g for 15 min) and measurement of the supernatant protein concentration (RC DC™ protein assay kit, Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France), supernatant proteins were separated by two-dimension (2-D), 12% polyacrylamide gel electrophoresis. For the first dimension of analytical and preparative gels, 500 µg of proteins were loaded onto 17 cm, pH 3 – 10 non-linear, Bio-Rad ReadyStrips by inclusion of an adequate volume of extract in rehydration buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 0.2 % biolytes pH 3-10, 0.0002% (w/v) Bromophenol blue) (BioRad, Sigma). Following the second dimension, separate protein spots were visualised on gels by 0.02% (w/v) colloidal Coomassie Blue staining and images were captured on an image scanner (Amersham ImageScanner, GE Healthcare, Orsay, France). Quantification of protein changes across triplicates of each protein sample from MDD or C pups (n = 6 per condition) was captured via image alignment and analysis, and integrated analysis of expression profiles using the Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne UK). Results were expressed as means ± SD. Tailored multivariate statistical analysis facilities incorporated into the Progenesis SameSpots software were used for image analysis with $p < 0.05$ considered significant. Spots showing a significant change in abundance between the two conditions were

subsequently analysed by mass spectrometry (MS) (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time-of-Flight, MALDI-ToF) and when necessary for validation of the identification, LC-MS/MS) at the Metabolism Exploration Platform (http://www5.clermont.inra.fr/plateforme_exploration_metabolisme/).

2.4. Generation of functional networks

MS-identified proteins were evaluated by Ingenuity Pathway Analysis, IPA (Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA), a software application that notably enables to recognize *in silico* networks of hypothetically interacting proteins based on a regularly updated "Ingenuity Pathways Knowledge Base". Highly connected networks generated by IPA contain protein relationships with evidenced direct physical contact and/or indirect interactions explicitly described in scientific sources. IPA networks are ranked by scores representing the log probability that they were found by random chance alone. Scores ≥ 2 have at least a 99% confidence of not being generated from the Global Molecular Network by random chance alone and are therefore usually attributed to a valid network. Furthermore, we manually inspected all protein interactions generated by IPA to eliminate any possible spurious results.

2.5. Model of MD-deficient cardiac cells

H9c2 cells from the clonal myoblastic cell line derived from embryonic rat heart (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) were cultured between passages 13 and 23 at 37°C under a 5:95 CO_2:air atmosphere, in a DMEM medium containing 4.5 g/l glucose, 3.7 g/l $NaHCO_3$, stabilized glutamine and sodium pyruvate (Dutscher, Brumath, France), and supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 1% nonessential amino acids (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml

streptomycin). The culture medium was refreshed 24h after seeding, then every 2 days. Cells were grown in this culture medium until 70% of confluence to maintain them as cardiomyoblasts.

For MD depletion experiments, a MCDB-131 medium lacking folic acid, vitamin B12 and choline was synthesized in the lab and designed as the MDD medium. Complete (C) MCDB-131 medium was synthesized concurrently by supplementing the MDD medium with amounts of the lacking MDs similar to those in commercial MCDB-131 [19]. Both C and MDD MCDB-131 media were supplemented with stabilized glutamine, nonessential amino acids, antibiotics and 10% (v/v) dialysed FBS. Subsequently, there was no folic acid, vitamin B12 and choline in the MDD culture medium *vs* 1.2 µM, 10 nM and 100 µM in the C culture medium, respectively. After growth to about 50% confluence in DMEM, cells were adapted overnight in the C MCDB-131 medium and then exposed either to the latter or to the MDD MCDB-131 medium for 4 days. In order to maintain the culture below 70% confluence during the depletion time, cells were sub-cultured after two days in fresh C or MDD MCDB-131 medium, respectively. At each passage or medium renewal, the culture medium was sampled and kept at -80°C for further measurement of extracellular Hcy concentrations (see below).

2.6. Assays of extracellular Hcy and intracellular folate and vitamin B12

Measurement of extracellular Hcy concentration was performed by reverse phase-HPLC coupled with fluorescence detection, after Hcy reduction by Tris(2-carboxyethyl phosphine hydrochloride) and derivatization with 7-fluorobenzofurane-4-sulfonic acid [20]. Intracellular concentrations of both vitamins were determined by using a radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals).

2.7. Western blot analysis

Following the 4-day exposure to C or MDD MCDB-131 medium, cells were washed twice with PBS and scraped in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.2 % biolytes pH 3-10 and 0.05% (v/v) protease inhibitor cocktail). Lysates were sonicated twice and cell protein concentration was determined by the RC DC™ protein assay. Cell (as well as myocardium) protein extracts were subjected to electrophoresis in 12% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. The latter was blocked with 5% (w/v) BSA in TBST buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl and 0.05% (v/v) Tween 20) and subsequently incubated overnight with a primary antibody, namely rabbit anti-prohibitin or anti-α-crystallin B polyclonal antibody (GeneTex, Paris, France) or rabbit anti-β-actin polyclonal antibody (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) diluted 1/2000, 1/5000 and 1/2500, respectively, in TBST with 5% BSA. Membranes were then washed and incubated for 1 h with secondary goat anti-rabbit IgG antibody diluted 1/2000 (Millipore SAS, Molsheim, France). Antigen-antibody immunocomplexes were revealed by chemiluminescence and visualized by exposure to X-ray films. Bands were scanned and their intensities (expressed as arbitrary units) evaluated by a semiquantitative densitometry analysis performed with ImageJ®.

2.8. Statistics

Results were presented as means ± SD. Statistical differences were determined using either Student's *t* test or ANOVAs followed by Mann Whitney or Bonferroni post-tests as specified (p value < 0.05 being considered significant).

3 Results

3.1. Increased total carbonylation of myocardial proteins after MD deficiency

The total carbonyl content of proteins extracted from myocardium of adult rats was found to be equal to 1.92 ± 0.11 nmol/mg proteins, as measured by spectrophotometry (not illustrated). This value was used as reference for dot blot assays of the total PC level in myocardium of MDD and C rat pups. Loading protein amounts of 0.5, 1 or 2 µg on PVDF membranes allowed observing a marked difference between the two groups (Fig. 1A). Measurement of the spot intensities showed that the total level of myocardial PCs was increased by 1.9 fold after MD deficiency. Comparison of the intensity of these spots with that of spots obtained with increasing amounts of the reference protein extract allowed to estimate the total PC levels in MDD and C myocardium to 0.78 ± 0.23 and 1.44 ± 0.39 nmol/mg proteins, respectively ($p < 0.05$; Fig. 1B).

3.2. Maternal MD deficiency caused alterations of the myocardium proteome of rat pups

The cardiac proteome of 6 MDD rat pups was compared to that of 6 C counterparts. For each myocardial protein extract, 2-D gels were realized in triplicate. A representative Coomassie blue-stained 2-D gel is presented in Fig. 2A. Under our experimental conditions, about 900 protein spots were detected per gel. Comparative analysis of the protein patterns using the Progenesis SameSpots software revealed 73 spots with a statistically different volume between both groups of rats. The position and index number of the spots are indicated in Fig. 2A. Of these, 39 proteins were identified by mass spectrometry, 22 being upregulated with fold changes (FC) in abundance ranging from 1.1 to 1.7 and 17 being down-regulated with FC in abundance ranging from 1.1 to 2.3 after MD deficiency. One example of each of these variations is magnified in Fig 2B. The identified proteins, as well as their FC in abundance and MS characteristics, are given in Table 1. Globally, the molecular weight (MW) and isoelectric point (p*I*) estimated for most spots of interest on 2-D gels (data not shown) matched the theoretical MW and p*I* of the corresponding

identified protein. Some proteins were identified from multiple spots showing markedly similar differences in volume between both conditions. Those were serotransferrin (TF: 3 spots with decreased FC of 1.85, 1.75 and 1.41), troponin T (TNNT2: 2 spots with decreased FC of 2.44 and 2.17), aconitase 2 (ACO2: 4 spots with decreased FC of 1.75, 1.69, 1.41 and 1.37), protein disulfide isomerase 3 (PDIA3: 2 spots with decreased FC of 1.37 and 1.33), fatty acid binding protein 3 (FABP3: 3 spots with increased FC of 1.43, 1.38 and 1.29), ATP synthase-coupling factor 6 (ATP5J: 2 spots with increased FC of 1.29 and 1.40) and apolipoprotein A-I precursor (APOA1: 2 spots with increased FC of 1.37 and 1.22).

The identified proteins were assigned according to their main biological function (Fig. 3A) and cell localization, as provided by GO annotations (Fig. 3B). They play a major role in energy production (21%), lipid and lipoprotein metabolism (18%), response to ER (15%) or oxidative (10%) stress, and cell structure (15%). Their cell locations are principally the cytosol (47%), the mitochondria (33%), and the extracellular compartment (15%). The main biological processes and cell locations of the different proteins identified (focus proteins), as well as their names, are listed in the supplemental data associated with this article.

3.3. IPA generation of functional networks from the proteomic data set

Uploading of the gene IDs of the 39 identified proteins into IPA allowed to determine functional networks/pathways underlying a wider pattern of proteins with possible altered abundance after MD deficiency. Each focus protein was uniquely and accurately recognised by the software. Considering only mammalian species and heart tissue into analysis, IPA showed that all focus proteins, except albumin (ALB), biliverdin reductase B (BLVRB), fibrinogen gamma chain (FGG), histone cluster 2 (HIST2H2BE) and TF, fitted to a putative network associated with the biological function “Developmental Disorder, Cellular Compromise, Lipid Metabolism” (IPA score = 59; Focus proteins = 34). The list of the 207 proteins involved in this

network is provided as supplemental data. Figs. 4A and 4B show the 220 direct interactions (i.e. with physical contact or induction of chemical modifications), and 163 indirect interactions (i.e. without any physical contact) between 95 and 68 proteins of the network, respectively. Each group of interactions matches the biological function associated with the network. Interestingly, 64% of direct interactions pertain to protein acting on the expression of another protein. As shown in Table 2, the network can be split into 3 sub-networks related to more specific functions, namely (i) cell structure and function, (ii) cardiovascular development and function, and (iii) lipid metabolism and transport. Only the focus protein destrin (DSTN) is present in both sub-networks 1 and 2. Among all focus proteins, IPA reported nuclear localization only for prohibitin (PHB) (sub-network 1) and α-crystallin B (CRYAB) (sub-network 3).

3.4. In vitro model of MD deficient cardiac cells

To better understand the cellular mechanisms of the impact of MD deficiency on the myocardium, we designed a cardiac cell model made deficient in MDs. For that purpose, we used rat embryonic, heart derived cardiomyoblast cells, H9c2, a common model system for studying many aspects of cardiac biology *in vitro* including notably cardiac hypertrophy, one important feature of MD deficiency in rat pups [12]. First, aiming to evaluate the time needed for depleting cells of MDs and subsequent increase in extracellular Hcy, H9c2 cells were exposed to synthetic MDD or C MCDB-131 medium from 1 to 14 days. Intracellular folate and vitamin B12 concentrations decreased rapidly after 1 day, reaching minimum levels at D4 and remaining low until D14 (data not shown). Fig. 5 presents the dramatic decrease in folate concentration in H9c2 cells exposed for 4 days to the MDD condition compared to the C one. It also shows that the intracellular concentration of vitamin B12 was concomitantly lowered by 60%. Compared to the C condition, MD deficiency induced an increased release of Hcy into the medium throughout the

14 days (not illustrated). At day 4, where folate and vitamin B12 deficiencies were the highest, extracellular export of Hcy was significantly augmented by 1.6 fold (Fig. 5).

3.5. Responses of focus proteins to MD deficiency in rat pup myocardium and in H9c2 cells

Many proteomic results presented herein, namely decreased abundances of trifunctional enzyme subunit alpha (HADHA), acyl CoA dehydrogenase (ACADS), NADH dehydrogenase flavoprotein 2 (NDUFV2) and NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 10 (NDUFA10), and increased abundance of FABP3 in MDD pups hearts, are in agreement with data from previous Western blot analysis of heart protein extracts from similarly treated animals [12]. As shown in Fig. 6A, the proteomic result (see Table 1) for the small heat shock protein (sHSP) CRYAB was confirmed by a Western blot assay, i.e. a decrease (FC = 1.4) in the abundance of CRYAB in rat pup myocardium after MD deficiency. When comparing CRYAB abundances in H9c2 cardiomyoblasts exposed for 4 days to the MDD MCDB-131 medium and in cells similarly exposed to the C MCDB-131 medium, a decrease (FC = 1.15) was observed, but the difference was not significant (Fig. 6B). Western blot assays with antibodies specific to other focus proteins of the proteomic analysis allowed highlighting the strong induction of PHB in MDD H9c2 cardiomyoblasts. Fig. 6B shows that PHB abundance was increased by 3.5 times after 4 days of cell exposure to the MDD medium compared with the C medium. Although being much higher, this increase in PHB abundance fully corroborates the variation observed in the rat pup myocardium (Table 1).

4. Discussion

The major finding of the present proteomic study is that a variety of heart proteins is markedly altered in abundance in the myocardium of MDD rat pups. These changes that occurred concurrently with increased total protein carbonylation reveal (i) tissue oxidative stress and consecutive antioxidant responses, (ii) altered cell structure and organization with ER stress induction, and (iii) important metabolic changes, especially at the lipid and energy levels.

4.1. Hyperhomocysteinemia, protein carbonylation and oxidative stress

MDD rat pups presented HHcy and abnormally increased Hcy concentration in myocardium, a condition associated with heart fibrosis and dysfunction [12]. Hcy-dependent toxicity in cardiac cells has been ascribed to overproduction of reactive oxygen species, altered NO availability and mitochondrial perturbation [21]. The present data show an occurrence of oxidative stress in MDD evidenced by the increase in total protein carbonylation, the main oxidative PTM. Formation of carbonyl groups into proteins can lead to the loss of their structural and/or catalytic function and exacerbate mitochondrial injury. Elevated carbonylation of plasma proteins has been reported in CVD patients [22]. Increased PC might account for the decreased abundance of AKR1B1 and PDIA3 in MDD myocardium [23]. Cardiovascular protection by AKR1B1 activity has been suggested in various pathophysiological conditions [24]. Decreased abundance of PDIA3, a protein involved in protein quality control, might alter the adaptive response of cardiac cells to oxidative insult caused by MD deficiency [25]. It is also plausible that the latter condition contributed to the reduced abundance of myocardial NDUFV2 and CRYAB which, like ACO2 (see below), were reported to be sensitive to oxidative stress [26, 27]. Moreover, increased abundances of both cytoplasmic Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1) and mitochondrial peroxiredoxin 3 (PRDX3) suggest that antioxidant enzyme mechanisms were induced to compensate for the onset of unbalanced redox state in MDD myocardium [28].

4.2. Effects on cell structure and ER stress proteins

Remodelling of subcellular organelles like sarcolemma, sarcoplasmic reticulum, mitochondria or myofibrils is key element in the development of cardiac hypertrophy and heart failure [29]. Decreased abundances of myosin light chain-2 and -4 (MYL2 and MYL4), α-tropomyosin (TPM1), TNNT2, and CRYAB on one hand, and increased abundances of heat shock protein beta 2 (HSPB2), DSTN, and troponin C (TNNC1) on the other hand, indicate alterations by MD deficiency in the structures of cytoskeleton and sarcomere, the contractile unit of the heart muscle. This is consistent with the fact that DSTN is an actin-depolymerizing factor, whereas TPM1 links competitively actin filaments in a protective manner [30]. In association with the troponin complex, TPM1 plays a central role in the calcium-dependent regulation of striated muscle contraction. Moreover, CRYAB, the most abundant sHSP, can interact directly with actin in cardiomyocytes and particularly in H9c2 cells during heat or ER stress, thus stabilizing the cytoskeleton and contractile myofilaments [31]. CRYAB could suppress cardiac hypertrophic responses and *Cryab* mutation was linked to a desmin-related myopathy in humans and mice with aberrant amyloid-positive aggregates, contractile dysfunction and progress to heart failure [32, 33]. HSPB2, also known as myotonic dystrophy protein kinase binding protein (MKBP), is essential for normal cardiac function, but its cellular functions and induction characteristics differ from those of other sHSP [34]. Such differences might account for the opposite responses of myocardial HSPB2 and CRYAB to MD deficiency. Increased abundance of HSPB2, and possibly HSPD1 and HSPA9, could also thwart caspase activation, thus contributing to the previously reported absence of cell apoptosis in MDD myocardium [12, 35]. Likewise, the augmented abundance of multifunctional phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (PEBP1) was coherent with impaired activation of the ERK signaling pathway and myocardial dysfunction [12, 36]. Interestingly, induction of certain sHSPs could be involved in the concurrently increased abundance of atrial natriuretic factor precursor (NPPA) [37]. The

latter change agrees with previous reports of increased concentration of plasma brain natriuretic peptide (BNP) in MDD rat pups [12] and other models of cardiac lipid accumulation or hypertrophy, or hyperhomocysteinemia [38, 39]. Both NPPA and BNP are considered as predictors of cardiovascular events and death in at-risk subjects or patients [40]. Finally, PSMD13, the regulatory subunit of the 26S proteasome involved in the ATP-dependent degradation of ubiquitinated proteins, also showed an increased myocardial abundance. This suggests that, in addition to protein repair and folding by HSPs, clearance of damaged proteins could be activated during MD deficiency to prevent their aggregation [41].

4.3. Effects on lipid and energy metabolism

Among all the myocardial proteins modified by MD deficiency, 39% play a role in energy production and lipid metabolism, in agreement with previous reports in this model [12]. Decreased abundance of NDUFV2, NDUFA10, ACADS and HADHA was consistent with the concomitantly decreased expression of ERRα and PPARα, and/or imbalanced methylation/acetylation of PGC-1α associated with cardiac hypertrophy [42, 43]. The dissimilar results obtained for FABP3 and acyl-coenzyme A thioesterase 2 (ACOT2), i.e. increased myocardial abundances, is likely related to the *in vivo* complexity of tissue-selective metabolic regulation by co-expressed cofactors other than ERRα and PPARα [44]. Moreover, FABP3 like adipocyte FABP4 could contribute to the development of metabolic and cardiovascular complications during obesity, and increased FABP3 concentrations were measured in plasma of patients with acute myocardial infarction [45, 46]. In addition to decreased fatty acid oxidation, increased glucose utilization has been associated with heart failure [47]. In agreement with the latter, the abundance of the β-isozyme subunit of enolase (ENO3) was increased in the myocardium of MDD rat pups. This suggests an elevated glycolytic flux as a response to higher energy needs in the MDD myocardium [48]. Likewise, isocitrate dehydrogenase 3 (IDH3) which

catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate in the Krebs cycle, showed an augmented abundance. Contrastingly, decreased abundance of ACO2, the enzyme of the preceding step of the cycle, was likely related with its high sensitivity to oxidative stress induced by the MD deficiency [49]. Although not associated with variations of complex IV and V activities, respectively [12], increased abundances of cytochrome c oxidase subunit 5A (COX5A) and ATP5j, agree with their reported involvement in several cardiac phenotypes [50, 51]. Moreover, mitochondrial elongation factor Tu (TUFM) and 60S acidic ribosomal protein P2 (RPLP2), two proteins related to protein biosynthesis, also exhibited increased abundances in MDD myocardium. Expression of TUFM is increased in ischemic rat heart [52].

An intriguing finding is the increased abundance of APOA1 and APOE proteins in the myocardium of MDD rat pups. Such a change constitutes a cardiovascular protective response [53]. However, plasma levels of APOA1 were decreased in genetic mouse model of severe HHcy and in males with coronary artery disease [54]. It has been shown that (i) both *apoE* and *apoA1* promoters are activated by binding of the transcription factor Sp1 to a consensus nucleotide sequence close to the transcriptional start site and (ii) in such cases, low CpG methylation at this sequence facilitates recruitment and binding of Sp1 to it [55-57]. It suggests that increased abundances of APOE and APOA1 in MDD myocardium might result from such gene up-regulation since methylation capacity of the tissue was reduced, as shown by decreased S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio [12]. Besides, the concurrently increased expression of PPARγ and decreased expression of ERRα might also account for *apoE* and *apoA1* up-regulation, respectively [12, 58, 59].

4.4. Cellular model of MD deficiency

To decipher the mechanisms of the effect of MD deficiency on myocardial protein expression, we developed an *in vitro* model of deficiency using the H9c2 cells made deficient in folate, vitamin B12 and choline. This cell line is used for *in vitro* investigation of various conditions of cardiac biology like cardiac hypertrophy [16], one major feature of MD deficiency in rat pups [12]. Our work shows that this condition induced a moderate but significant increase in the release of Hcy by such cells. No cell necrosis was observed in the myocardium of these animals, as well as in MDD H9c2 cells (data not shown), in accord with the concentration-dependent effect of Hcy on viability of these cells [60]. Western blot assays of H9c2 cells and rat pup myocardium confirmed the proteomic data showing decreased CRYAB and increased PHB abundances after MD deprivation. PHB up-regulation could be related to the best-characterized role of this chaperone protein in the stabilization of mitochondrial proteins, consistent with the finding that mitochondrial structure and function are major targets of MD deficiency [12, 61]. PHB has also been implicated in other cellular processes such as proliferation/apoptosis, gene transcription and cell protection against oxidative stress [62, 63]. Particularly abundant in many tissues including the heart, PHB is located mainly in the mitochondrion inner membrane as a complex of 2 components (PHB1 and PHB2), but also in the cytoplasm or the nucleus depending on the cell type and situation. Notably, overexpression of PHB1 in cultured cardiomyocytes or H9c2 cells protected mitochondria from H_2O_2-induced injury and apoptosis, respectively [64, 65]. Whether increased abundance of PHB in MDD myocardium is indicative of a cell survival and/or an antioxidant response deserves further investigation.

In conclusion, our study points out that MD deficiency in rat cardiac cells altered various components of cell function and morphology, particularly at the mitochondrial level. As shown by increased carbonylation of tissue proteins, it brings evidence for oxidative stress in the myocardium of MDD rat pups. Such PTMs might account for the decrease in abundance of several identified proteins, especially among those involved in energy metabolism and fatty acid β-oxidation. Our proteomic analysis also indicates that the myocardium triggers different compensatory mechanisms as a protective response to the alterations induced by MD deficiency. Increased expression of ER stress proteins as antioxidant and proteolysis enzymes could be part of this response by precluding oxidative PTMs, activating the repair and clearance of oxidized proteins or preventing the formation of unfolded protein aggregates. The *in vitro* cell culture model we developed shows features of MD deficiency and moderate increase in cellular production and extracellular release of Hcy. Our results suggest that this condition gives rise to many changes in tissue or cell proteome that differ from those caused by severe HHcy or high extracellular Hcy concentrations. The H9c2 cell model thus should be useful in dissecting the molecular mechanisms of the early metabolic and structural changes that occur in cardiac cells after the onset of MD deficiency.

Acknowledgments

The authors wish to thank Didier Viala and Christophe Chambon (Metabolism Exploration Platform, UMR 1019, INRA, Theix) for the MS identification of proteins, Philippe Gérard (Inserm U954, Nancy) for the vitamin assays, Emilie Roche and Mathieu Rambeau (MicroCard team, UNH-UMR 1019, INRA, Theix) for the Hcy assay, and Christiane Deval (Proteolysis team, UNH-UMR 1019, INRA, Theix) for her valuable technical advice on this work.

The authors have declared no conflict of interest.

5. References

[1] Organization WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2011; http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241564373_eng.pdf

[2] Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. Mayo Clin Proc. 2008;83:1203-12.

[3] Burdge GC, Lillycrop KA. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. Annu Rev Nutr. 2010;30:315-39.

[4] Bailey LB, Gregory JF, 3rd. Folate metabolism and requirements. J Nutr. 1999;129:779-82.

[5] Sen S, Reddy PL, Grewal RP, Busby M, Chang P, Hinderliter A. Hyperhomocysteinemia is Associated with Aortic Atheroma Progression in Stroke/TIA Patients. Front Neurol. 2010;1:131-8.

[6] Varela-Moreiras G, Murphy MM, Scott JM. Cobalamin, folic acid, and homocysteine. Nutr Rev. 2009;67 Suppl 1:S69-72.

[7] Clarke R, Halsey J, Bennett D, Lewington S. Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials. J Inherit Metab Dis. 2011;34:83-91.

[8] Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. Cell Death Differ. 2004;11 Suppl 1:S56-64.

[9] McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid M, Duncan G, Maloney CA, et al. Disruption of lipid metabolism in the liver of the pregnant rat fed folate-deficient and methyl donor-deficient diets. Br J Nutr. 2008;99:262-71.

[10] Bossenmeyer-Pourie C, Blaise S, Pourie G, Tomasetto C, Audonnet S, Ortiou S, et al. Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. Am J Pathol. 2010;176:270-7.

[11] Chan J, Deng L, Mikael LG, Yan J, Pickell L, Wu Q, et al. Low dietary choline and low dietary riboflavin during pregnancy influence reproductive outcomes and heart development in mice. Am J Clin Nutr. 2010;91:1035-43.

[12] Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. J Pathol. 2011; 225(3):324-35.

[13] Chanson A, Rock E, Martin JF, Liotard A, Brachet P. Preferential response of glutathione-related enzymes to folate-dependent changes in the redox state of rat liver. Eur J Nutr. 2007;46:204-12.

[14] Koz ST, Gouwy NT, Demir N, Nedzvetsky VS, Etem E, Baydas G. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. Int J Dev Neurosci. 2010; 28:325-9.

[15] Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. Circ Res. 1991;69:1476-86.

[16] Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. In vitro Cell Dev Biol Anim. 2011;47:125-31.

[17] Andrus PK, Fleck TJ, Gurney ME, Hall ED. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem. 1998;71:2041-8.

[18] Chanson A, Sayd T, Rock E, Chambon C, Sante-Lhoutellier V, Potier de Courcy G, et al. Proteomic analysis reveals changes in the liver protein pattern of rats exposed to dietary folate deficiency. J Nutr. 2005;135:2524-9.

[19] Knedler A, Ham RG. Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. In Vitro Cell Dev Biol. 1987;23:481-91.

[20] Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. Clin Chem. 1999;45:290-2.

[21] Suematsu N, Ojaimi C, Kinugawa S, Wang Z, Xu X, Koller A, et al. Hyperhomocysteinemia alters cardiac substrate metabolism by impairing nitric oxide bioavailability through oxidative stress. Circulation. 2007;115:255-62.

[22] Bagatini MD, Martins CC, Battisti V, Gasparetto D, da Rosa CS, Spanevello RM, et al. Oxidative stress versus antioxidant defenses in patients with acute myocardial infarction. Heart Vessels. 2011;26:55-63.

[23] Lii CK, Lin AH, Lee SL, Chen HW, Wang TS. Oxidative modifications of proteins by sodium arsenite in human umbilical vein endothelial cells. Environ Toxicol. 2011;26:459-71.

[24] Baba SP, Barski OA, Ahmed Y, O'Toole TE, Conklin DJ, Bhatnagar A, et al. Reductive metabolism of AGE precursors: a metabolic route for preventing AGE accumulation in cardiovascular tissue. Diabetes. 2009;58:2486-97.

[25] Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. Trends Biochem Sci. 1994;19:331-6.

[26] Liu HY, Liao PC, Chuang KT, Kao MC. Mitochondrial targeting of human NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) and its association with early-onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. J Biomed Sci. 2011;18:29.

[27] Cullingford TE, Wait R, Clerk A, Sugden PH. Effects of oxidative stress on the cardiac myocyte proteome: modifications to peroxiredoxins and small heat shock proteins. J Mol Cell Cardiol. 2006;40:157-72.

[28] Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antiox Redox Signal. 2011;15:1583-606.

[29] Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, Elimban V, Dent MR, Tappia PS. Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. Cardiovasc Res. 2009;81:429-38.

[30] Nishida E, Muneyuki E, Maekawa S, Ohta Y, Sakai H. An actin-depolymerizing protein (destrin) from porcine kidney. Its action on F-actin containing or lacking tropomyosin. Biochemistry. 1985;24:6624-30.

[31] Singh BN, Rao KS, Ramakrishna T, Rangaraj N, Rao Ch M. Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. J Mol Biol. 2007;366:756-67.

[32] Kumarapeli AR, Su H, Huang W, Tang M, Zheng H, Horak KM, et al. Alpha B-crystallin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy. Circ Res. 2008;103:1473-82.

[33] Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, et al. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. Nature genetics. 1998;20:92-5.

[34] den Engelsman J, Boros S, Dankers PY, Kamps B, Vree Egberts WT, Bode CS, et al. The small heat-shock proteins HSPB2 and HSPB3 form well-defined heterooligomers in a unique 3 to 1 subunit ratio. J Mol Biol. 2009;393:1022-32.

[35] Oshita SE, Chen F, Kwan T, Yehiely F, Cryns VL. The small heat shock protein HspB2 is a novel anti-apoptotic protein that inhibits apical caspase activation in the extrinsic apoptotic pathway. Breast Cancer Res Treat. 2010;124:307-15.

[36] Lorenz K, Lohse MJ, Quitterer U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. Nature. 2003;426:574-9.

[37] Depre C, Hase M, Gaussin V, Zajac A, Wang L, Hittinger L, et al. H11 kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo. Circ Res. 2002;91:1007-14.

[38] Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, Aliot E, et al. Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. J Thromb Haemost. 2007;5:1209-16.

[39] Washio T, Nomoto K, Watanabe I, Tani S, Nagao K, Hirayama A. Relationship between plasma homocysteine levels and congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. Homocysteine and congestive heart failure. Int Heart J. 2011;52:224-8.

[40] Nishikimi T, Mori Y, Ishimura K, Tadokoro K, Yagi H, Yabe A, et al. Association of plasma atrial natriuretic peptide, N-terminal proatrial natriuretic peptide, and brain natriuretic peptide levels with coronary artery stenosis in patients with normal left ventricular systolic function. Am J Med. 2004;116:517-23.

[41] Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61:310-8.

[42] Meng C, Jin X, Xia L, Shen SM, Wang XL, Cai J, et al. Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. J Proteome Res. 2009;8:2463-75.

[43] Benit P, Beugnot R, Chretien D, Giurgea I, De Lonlay-Debeney P, Issartel JP, et al. Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. Hum Mutat. 2003;21:582-6.

[44] Kawabe K, Saegusa H, Seto K, Urabe H, Motojima K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and its response element are required but not sufficient for transcriptional activation of the mouse heart-type fatty acid binding protein gene. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37:1534-46.

[45] Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck WH, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. Circ Res. 2009;105:326-34.

[46] Knowlton AA, Burrier RE, Brecher P. Rabbit heart fatty acid-binding protein. Isolation, characterization, and application of a monoclonal antibody. Circ Res. 1989;65:981-8.

[47] Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. J Clin Invest. 2005;115:547-55.

[48] Merkulova T, Lucas M, Jabet C, Lamande N, Rouzeau JD, Gros F, et al. Biochemical characterization of the mouse muscle-specific enolase: developmental changes in electrophoretic variants and selective binding to other proteins. Biochem J. 1997;323 (Pt 3):791-800.

[49] Gardner PR, Nguyen DD, White CW. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:12248-52.

[50] Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, et al. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 A. Science. 1996;272:1136-44.

[51] Grover GJ, Marone PA, Koetzner L, Seto-Young D. Energetic signalling in the control of mitochondrial F1F0 ATP synthase activity in health and disease. Inter J Biochem Cell Biol. 2008;40:2698-701.

[52] Sakai J, Ishikawa H, Kojima S, Satoh H, Yamamoto S, Kanaoka M. Proteomic analysis of rat heart in ischemia and ischemia-reperfusion using fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis. Proteomics. 2003;3:1318-24.

[53] Yancey PG, Yu H, Linton MF, Fazio S. A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:1123-31.

[54] Mikael LG, Genest J, Jr., Rozen R. Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. Circ Res. 2006;98:564-71.

[55] Lam JK, Matsubara S, Mihara K, Zheng XL, Mooradian AD, Wong NC. Insulin induction of apolipoprotein AI, role of Sp1. Biochemistry. 2003;42:2680-90.

[56] Chang DJ, Paik YK, Leren TP, Walker DW, Howlett GJ, Taylor JM. Characterization of a human apolipoprotein E gene enhancer element and its associated protein factors. J Biol Chem. 1990;265:9496-504.

[57] Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression. Free Radic Biol Med. 2010;48:895-904.

[58] Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. Mol Cell Biol. 2002;22:2607-19.

[59] Staels B, Auwerx J, Chan L, van Tol A, Rosseneu M, Verhoeven G. Influence of development, estrogens, and food intake on apolipoprotein A-I, A-II, and E mRNA in rat liver and intestine. J Lipid Res. 1989;30:1137-45.

[60] Sipkens JA, Krijnen PA, Meischl C, Cillessen SA, Smulders YM, Smith DE, Giroth CP, Spreeuwenberg MD, Musters RJ, Muller A, Jakobs C, Roos D, Stehouwer CD, Rauwerda JA, van Hinsbergh VW, Niessen HW. Homocysteine affects cardiomyocyte viability: concentration-dependent effects on reversible flip-flop, apoptosis and necrosis. Apoptosis. 2007;12(8):1407-18.

[61] Bourges I, Ramus C, Mousson de Camaret B, Beugnot R, Remacle C, Cardol P, et al. Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. Biochem J. 2004;383:491-9.

[62] Schleicher M, Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, et al. Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. J Cell Biol. 2008;180:101-12.

[63] Theiss AL, Sitaraman SV. The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. Biochim Biophys Acta. 2011;1813:1137-43.

[64] Liu X, Ren Z, Zhan R, Wang X, Zhang Z, Leng X, et al. Prohibitin protects against oxidative stress-induced cell injury in cultured neonatal cardiomyocyte. Cell Stress Chaperones. 2009;14:311-9.

[65] Muraguchi T, Kawawa A, Kubota S. Prohibitin protects against hypoxia-induced H9c2 cardiomyocyte cell death. Biomed Res. 2010;31:113-22.

Figure legends

Fig. 1. Changes in total protein carbonyl (PC) levels in myocardium of rat pups after maternal MD deficiency. (A) Representative dot-blot performed with 3 increasing loads of proteins; (B) Quantitation of total myocardial PC. Data were analyzed using Student's *t*-test. Values are means (± SD), n = 4 rats per group. *: $p<0.05$ for MDD *vs.* C.

Fig. 2. (A) Densitometry scanning of typical Coomassie blue-stained 2-D gels carried out with total protein extracts from rat pup myocardium. X-axis: p*I*, Y-axis: MW. The circled areas and allocated numbers mark all the protein spots exhibiting significantly different volumes when comparing the MDD and C conditions ($p<0.05$ using ANOVA integrated to the Samespots software). (B) Highlight of two spots exhibiting increased and decreased volumes between C and MDD myocardium.

Fig. 3. Distribution of identified proteins differentially expressed in MDD myocardium among biological processes (A) and cell location (B) (GO analysis of the data). The values shown in the pies are the percent and number of these focus proteins ascribed to the indicated cell process or location (detailed information in the additional Word file).

Fig. 4. Relationships between all proteins of the network generated by IPA from proteomic analysis of MDD myocardium (Path Designer graphics). Nodes represent proteins linked by either a solid or a dotted line for direct (A) or indirect (B) interaction, respectively. Arrows signify different actions from one molecule to another: expression/transcription control; activation for signalling pathways, conversion for metabolic pathways or binding for ligand/receptors. Red or green-filled nodes symbolize focus proteins displaying increased or decreased abundance, respectively, while other interacting proteins with no background colour

are those inserted by IPA. Shapes of nodes: cytokine/growth factor, enzyme, G-protein coupled receptor, kinase, ligand-dependent nuclear receptor, peptidase, phosphatase, transcription regulator, translation regulator, transmembrane receptor, transporter, other (detailed information on all the network proteins in the additional Word file).

Fig. 5. Variations in intracellular concentrations of folate (A) and vitamin B12 (B), and extracellular concentrations of Hcy (C) in H9c2 cardiomyoblasts exposed for 4 days to a MDD synthetic MCDB-131 medium. Differences between MDD and C were analyzed using Mann Whitney test (A: *: $p<0.05$ and B: $p=0.114$) and Student's *t*-test (C: **: $p<0.01$). Values are means (± SD) of 4 experiments with independent cell cultures.

Fig. 6. Western blot analysis of changes in abundance of CRYAB and PHB in rat pup myocardium (A, B) and H9c2 cardiomyoblasts (C, D) after MDD. A and C: Representative Western blots; B and D: Quantification of band intensity by densitometry analysis. Normalization for loading differences was achieved by dividing the densitometry values for individual bands by those for β-actin in the same lane. Differences between MDD and C were analyzed using Student's *t*-test. Values are means (± SD) of 4 assays with protein extracts from different rat myocardium or H9c2 cell cultures. **: $p<0.01$.

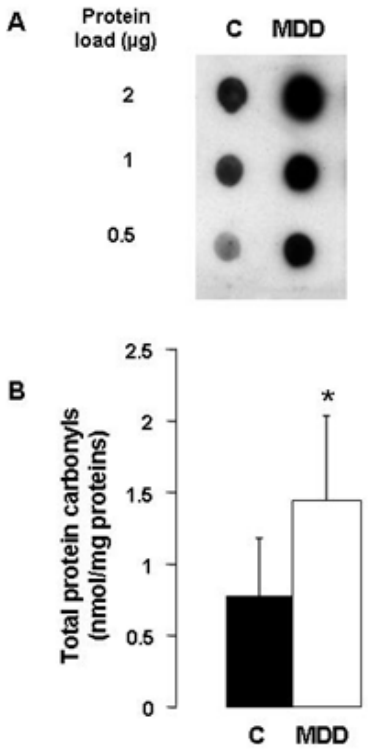

A
Protein load (µg)
C
MDD
2
1
0.5
B
Total protein carbonyls (nmol/mg proteins)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
C
MDD

Fig. 1

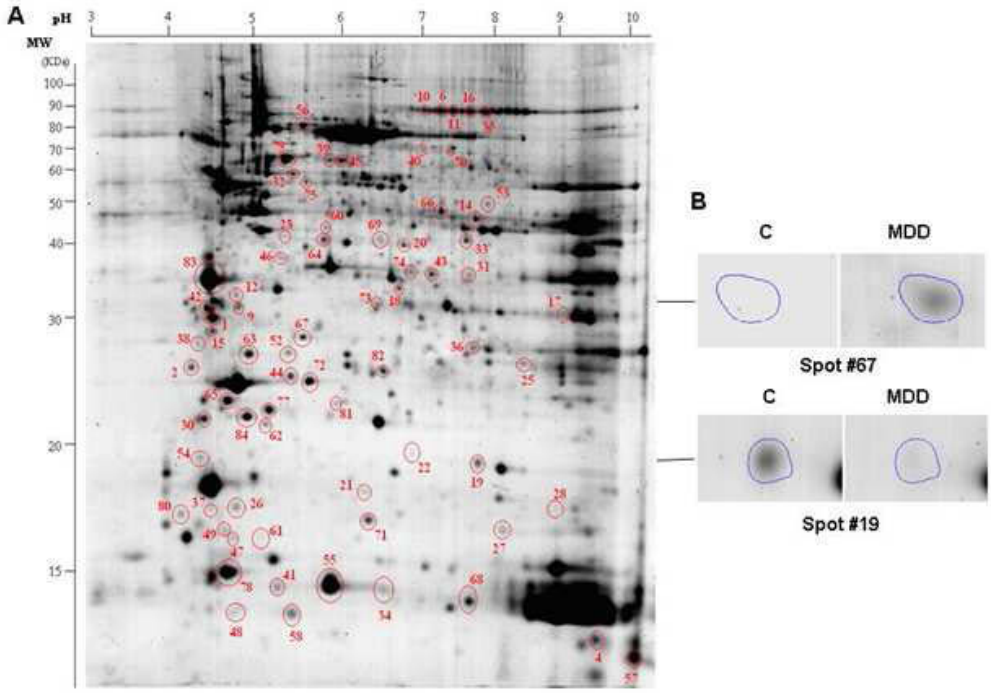


Fig. 2

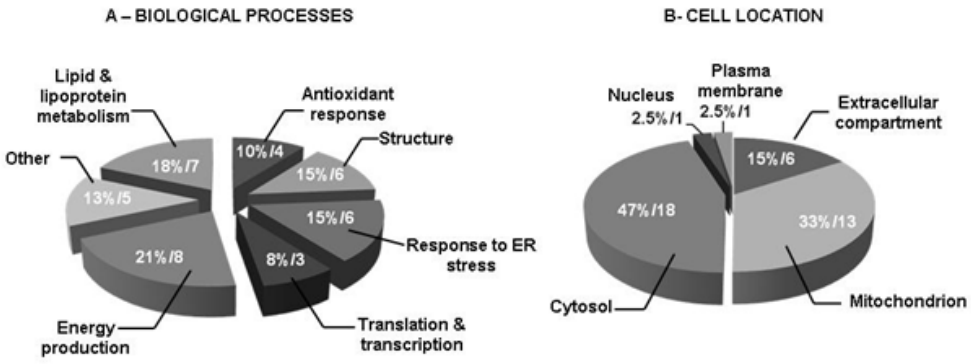

A – BIOLOGICAL PROCESSES
Lipid & lipoprotein metabolism
18%/7
Other
13%/5
21%/8
Energy production
Antioxidant response
10%/4
Structure
15%/6
15%/6
Response to ER stress
8%/3
Translation & transcription
B- CELL LOCATION
Nucleus 2.5%/1
Plasma membrane 2.5%/1
Extracellular compartment
15%/6
47%/18
33%/13
Cytosol
Mitochondrion

Fig. 3

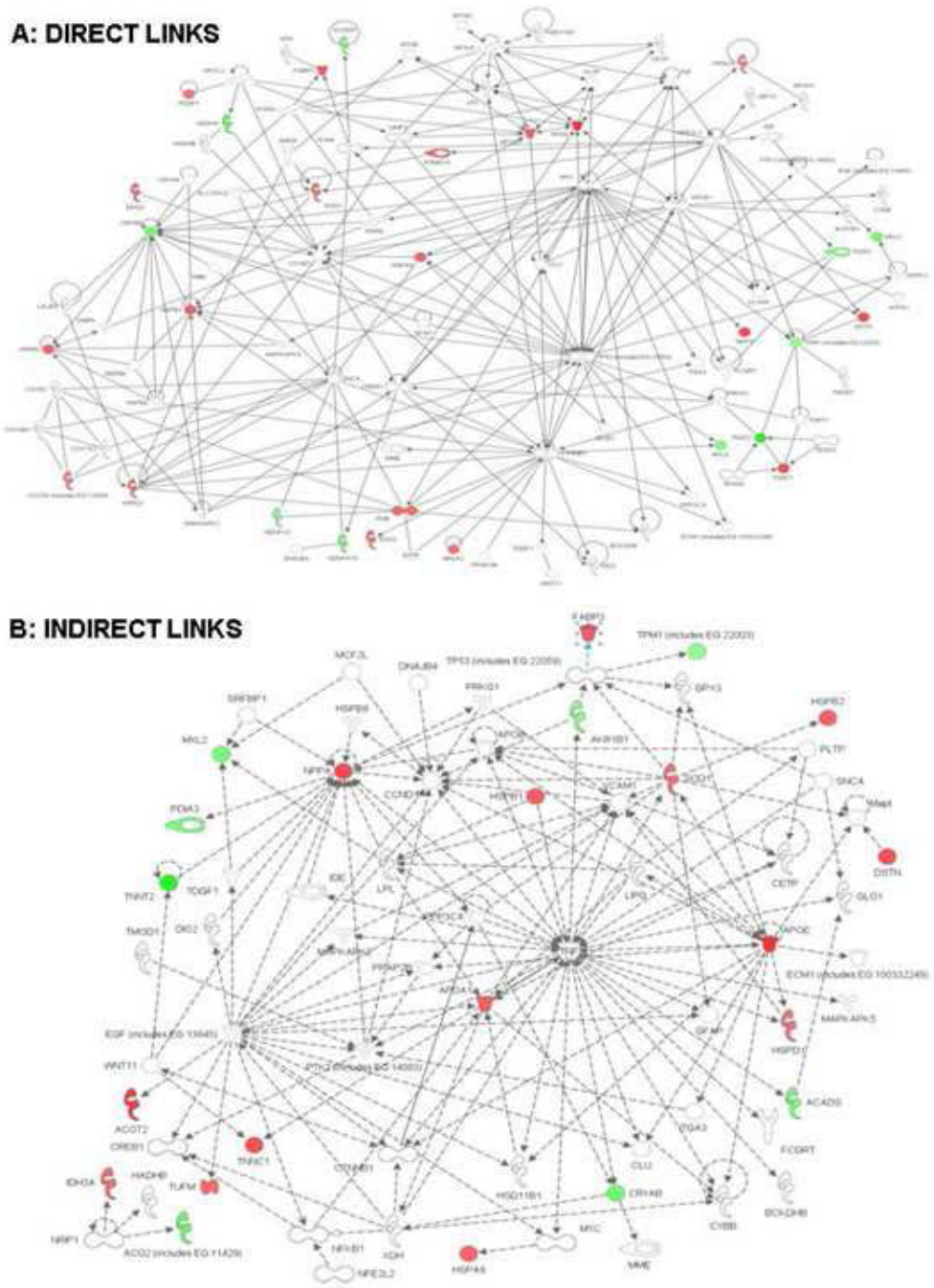
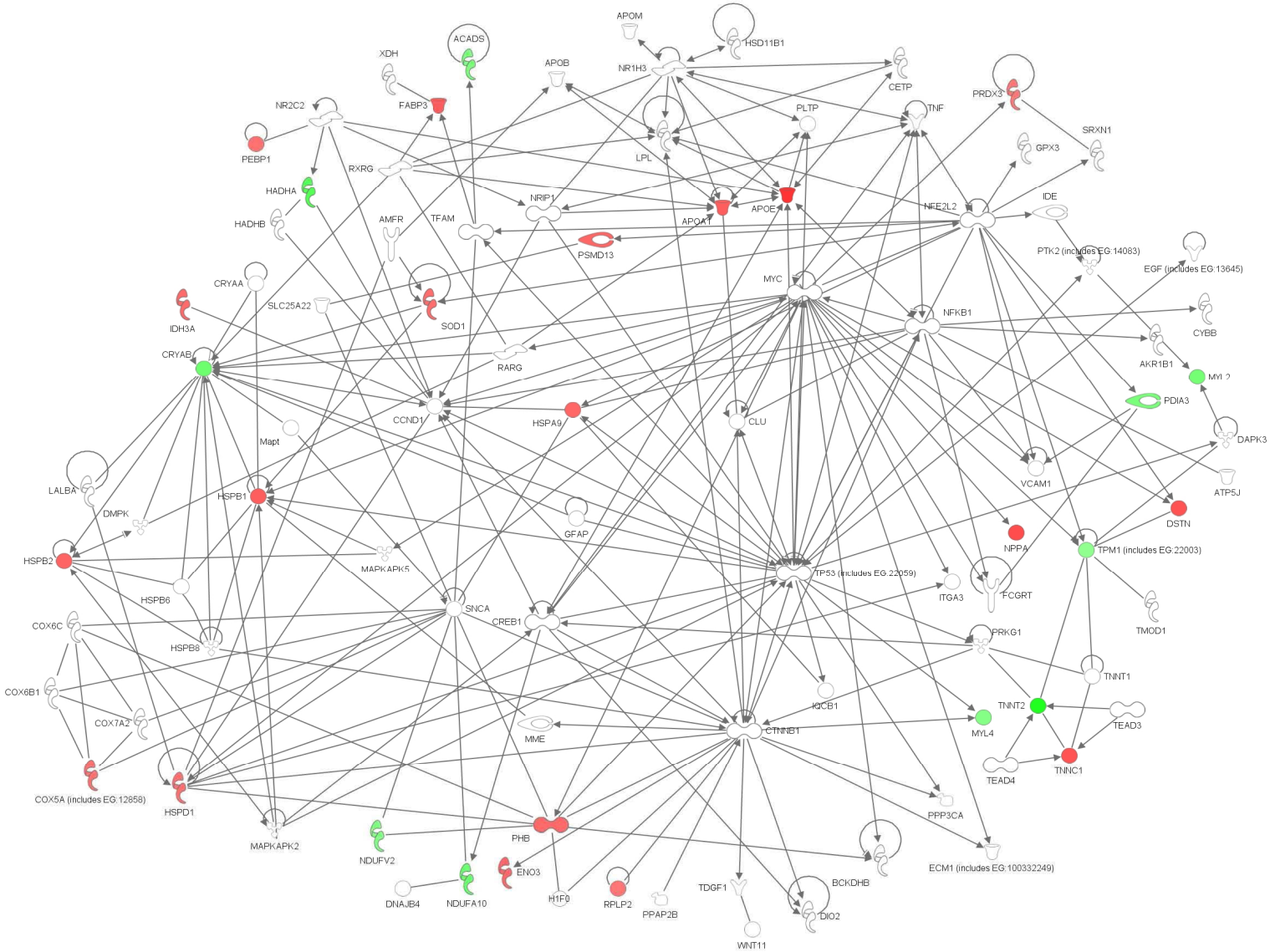


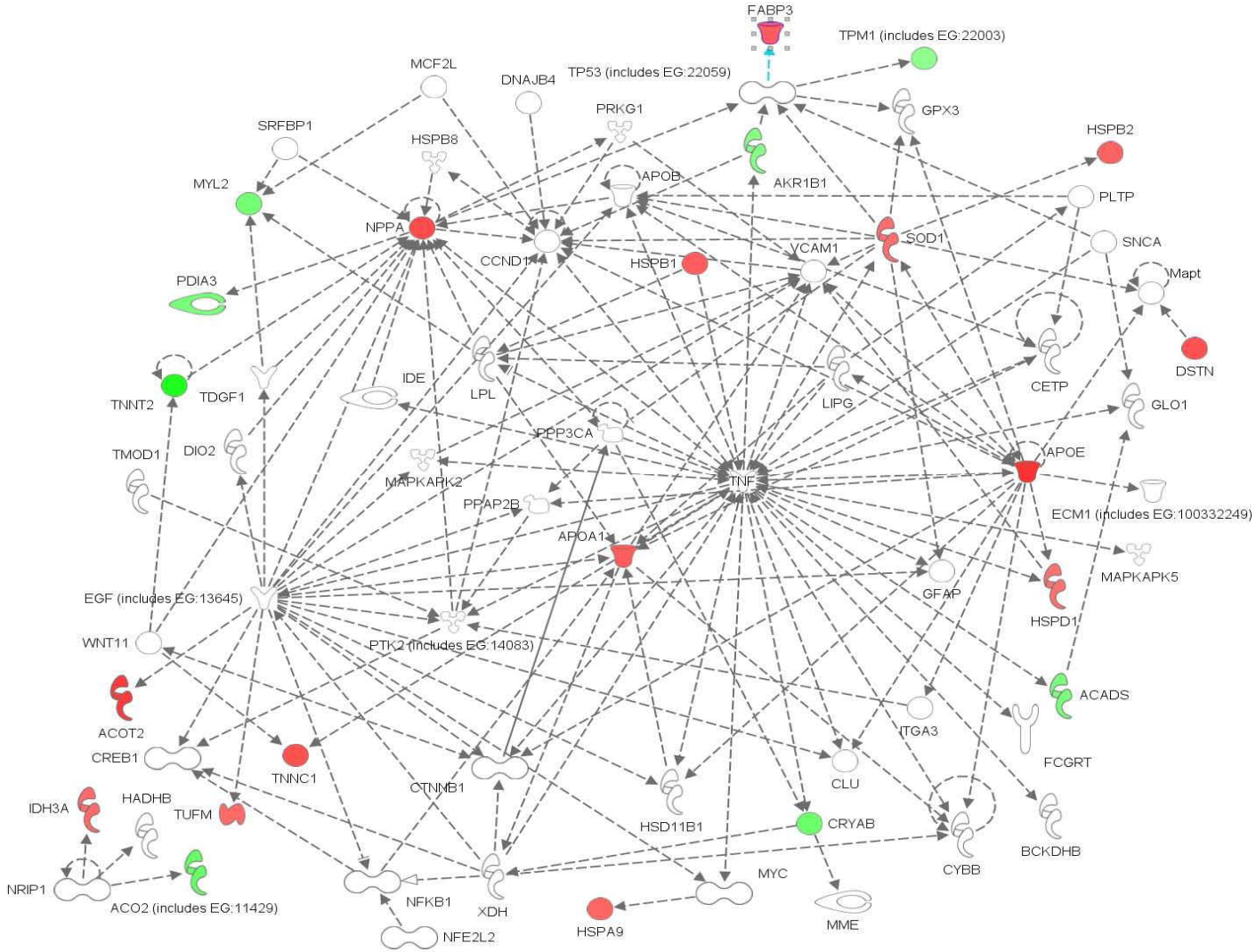
Fig. 4

Cf. agrandissement réseaux page suivante

A. DIRECT LINKS



B. INDIRECT LINKS



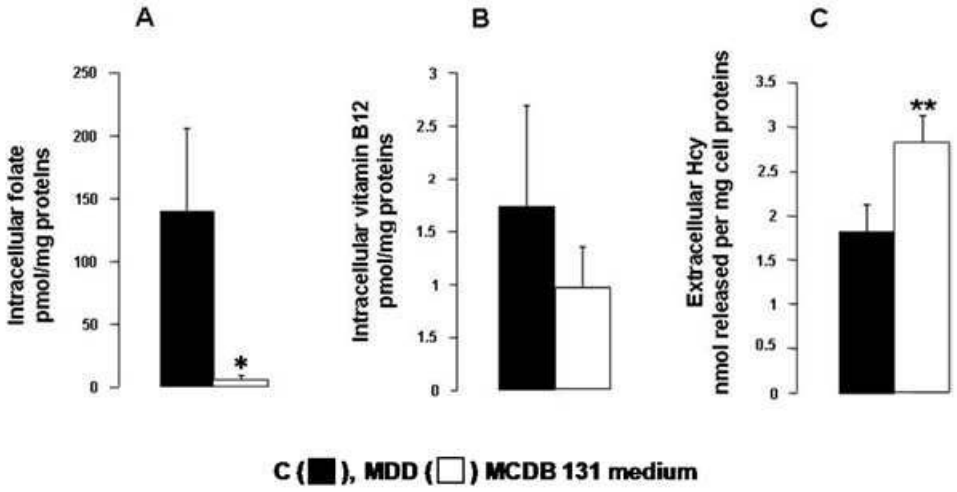

A
B
C
Intracellular folate
pmol/mg proteins
250
200
150
100
50
0
*
Intracellular vitamin B12
pmol/mg proteins
3
2.5
2
1.5
1
1.5
0
Extracellular Hcy
nmol released per mg cell proteins
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
C (■), MDD (□) MCDB 131 medium

Fig. 5

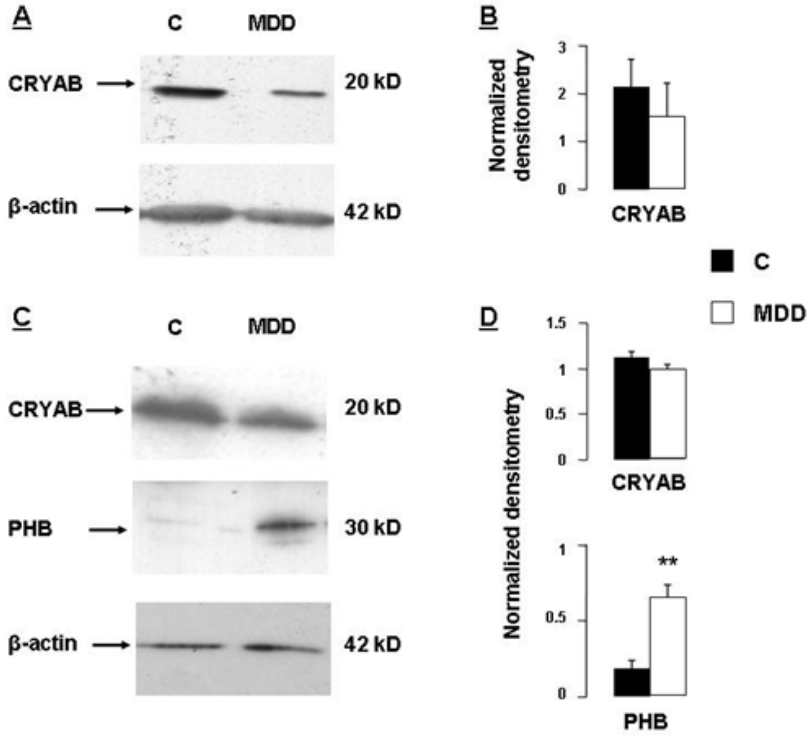

A
C
MDD
CRYAB
20 kD
β-actin
42 kD
B
Normalized densitometry
3
2
1
0
CRYAB
C
MDD
C
C
MDD
CRYAB
20 kD
PHB
30 kD
β-actin
42 kD
D
1.5
1
0.5
0
CRYAB
Normalized densitometry
1
0.5
0
**
PHB

Fig. 6

Table 1: Summary of differentially abundant myocardial proteins of rat pups in response to MD deprivation of dams identified by proteomics.

A: Identified proteins with decreased spot volume	**Index number of spots**	**UniProt accession number**	**ANOVA (P value)**	**Mean FC**	**Score Mascot**	**% Coverage of matched peptides**	**Number of matched peptides**	**Theoretical MW (kDa)/pI**
Troponin T**	1, 2	P50753	0.007	2.3	150	40%	16	35/4.9
Serotransferrin**	6, 10, 40	P12346	0.003	1.9	175	32%	23	76/7.1
Aconitase 2, mitochondrial**	11, 16, 35, 43	Q9ER34	0.000	1.8	178	36%	22	85/7.9
αB-crystallin**	19	P23928	0.007	1.6	80	41%	8	19/6.3
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10**	20	Q561S0	0.001	1.6	202	67%	19	40/7.6
Trifunctional enzyme subunit alpha	18	Q64428	0.028	1.6	72	12%	8	82/9.2
Myosin light chain-2 isoform	30	P08733	0.002	1.4	80	61%	8	18/4.5
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	33	Q6IMX3	0.036	1.4	89	27%	9	45/8.5
Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))	36	B5DF65	0.011	1.4	105	73%	9	22/6.3
Protein disulfide-isomerase A3 precursor**	39, 45	P11598	0.010	1.4	153	42%	19	56/5.9
Albumin-like**	54	P02770	0.005	1.3	94	24%	12	52/5.6

NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2**	63	P19234	0.004	1.3	91	53%	11	27/6.2
Histone H2B.1	57	Q161778	0.042	1.3	90	78%	9	11/10.1
Myosin light chain 4 isoform	65	P17209	0.045	1,2	144	70%	13	21/5.0
Aldose reductase	74	P07943	0.037	1.2	75	33%	9	35/6.2
Fibrinogen gamma chain precursor	75	P02680	0.009	1.2	60	20%	8	50/5.6
α-Tropomyosin	83	P58772	0.040	1.1	150	42%	17	32/4.7

**: $p<0.05$ using ANOVA followed by Bonferroni post-tests

B: Identified proteins with increased spot volume	Index number of spots	UniProt accession number	ANOVA (P value)	Mean FC	Score Mascot	% Coverage of matched peptides	Number of matched peptides	Theoretical MW (kDa)/pI
Apolipoprotein E precursor**	12	P08226	0.044	1.7	70	18%	6	35/5.6
Acyl-coenzyme A thioesterase 2**	14	O55171	0.012	1.7	111	30%	14	49/7.7
Atrial natriuretic factor precursor**	26	P01161	0.041	1.5	87	33%	6	17/6.7
Fatty acid binding protein 3**	34, 41, 55	P07483	0.014	1.4	73	40%	5	14/5.9
Destrin	28	Q730E3	0.033	1.4	160	16%	2	18/8.2
Troponin C	37	P19123	0.048	1.4	64	35%	5	18/4.0
Heat shock protein 27**	52	P42930	0.016	1.3	83	48%	9	22/6.1
Proteasome (prosome, macropain) non-ATPase 26S subunit 13**	60	B0BN93	0.040	1.3	96	30%	7	42/5.5
Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD^+) alpha**	64	Q9D6R2	0.003	1.3	83	35%	8	34/5.9
ATP synthase-coupling factor 6,mitochondrial precursor	48, 58	P21571	0.015	1.3	62	37%	5	12/9.4
β-enolase	53	P15429	0.019	1.3	80	21%	9	47/7.1
GRP 75 Mortalin	56	P38646	0.015	1.3	87	23%	15	73/5.9
Heat shock protein beta 2	62	O35878	0.040	1.3	67	59%	7	20/5.3
Elongation factor Tu**	66	Q8BFR5	0.033	1.2	189	46%	20	49/7.2
Prohibitin**	67	P67779	0.049	1.2	131	67%	13	29/5.6
Phosphatidylethanolamine binding protein**	77	P31044	0.031	1.2	134	67%	12	20/5.5

Superoxide dismutase [Cu-Zn]	71	P07632	0.021	1.2	64	38%	6	15/5.9
Apolipoprotein A-I precursor	44, 72	P04639	0.018	1.2	86	38%	11	30/5.5
Cytochrome C Oxidase	78	P00426	0.041	1.2	112	85%	9	12/5
Hspd1 protein	79	P63038	0.014	1.2	262	50%	22	59/8
60S acidic ribosomal protein P2	80	P02401	0.012	1.2	91	70%	6	11/4.4
Peroxiredoxin 3	82	Q9Z0V6	0.032	1.1	78	28%	7	28/7.1

Table 2

Sub-networks evidenced by IPA when uploading the identified proteins displaying differential abundance in the myocardium of rat pups after maternal methyl donor deficiency

Sub-networks and biological functions identified	Score	Focus Proteins involved in the networks	Other proteins
1:		(n=14)	
Cellular Compromise, Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance	24	↑ **ATP5J, COX5A, DSTN, ENO3, FABP3, HSPA9, PHB, PRDX3, PSMD13, RPLP2** ↓ **ACADS, AKR1B1, MYL4, NDUFV2**	BCKDHB, COX6B1, COX6C, COX7A2, CTNNB1, ECM1, FCGRT, GLO1, GPX3, H1F0, IQCB1, MAPKAPK5, MYC, NFE2L2, NFKB1, SLC25A22, SNCA, SRXN1, TFAM, TNF, TP53
2:		(n=14)	
Cardiovascular Disease, Tissue Development, Cardiovascular System Development and Function	24	↑ **ACOT2, DSTN, IDH3A, NPPA, PEBP1, TNNC1, TUFM** ↓ **ACO2, HADHA, MYL2, NDUFA10, PDIA3, TNNT2, TPM1**	CCND1, CREB1, DAPK3, DIO2, DNAJB4, EGF, HADHB, IDE, MCF2L, NR2C2, NRIP1, PPAP2B, PRKG1, PTK2, SRFBP1, TDGF1, TEAD3, TEAD4, TMOD1, TNNT1, WNT11
3:		(n=7)	
Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry	10	↑ **APOA1, APOE, HSPB1, HSPB2, HSPD1, SOD1,** ↓ **CRYAB**	AMFR, APOB, APOM, CETP, CLU, CRYAA, CYBB, DMPK, GFAP, GPX3, HSD11B1, HSPB6, HSPB8, ITGA3, LALBA, LIPG, LPL, MAPKAPK2, MAPKAPK5, Mapt, MME, NR1H3, PLTP, PPP3CA, RARG, RXRG, VCAM1, XDH

↑: Increased abundance; ↓: Decreased abundance

I. 4. Résultats majeurs

I. 4. 1. Génération d'un stress oxydant dans le myocarde des ratons carencés en PDM

Le stress oxydant a été évalué en mesurant la carbonylation totale des protéines au moyen d'une technique de Dot-Blot. Nos résultats montrent que celle-ci est augmentée de 1,9 fois dans le myocarde des ratons déficients en PDM relativement aux contrôles.

Notre étude démontre qu'une déficience maternelle en PDM d'origine alimentaire engendre un stress oxydant qui se traduit par une élévation du niveau total de MPT oxydatives des protéines du myocarde de leur progéniture.

I. 4. 2. Altération du protéome myocardique chez les ratons carencés en PDM

Notre analyse protéomique a permis de montrer d'une part, une différence d'abondance pour 39 protéines du myocarde entre les ratons déficients en PDM et leurs témoins. L'abondance de 22 d'entre elles était augmentée, alors qu'elle était diminuée pour 17 autres. Une grande partie de ces protéines est localisée dans le cytoplasme (47%) et les mitochondries (33%); elles interviennent principalement dans la production d'énergie cellulaire (21%) et le métabolisme lipidique (18%) mais aussi dans le stress du RE (15%), la structure cellulaire et la réponse antioxydante (10%).

Notre étude protéomique montre également que l'abondance d'une variété de protéines est altérée par la déficience en PDM dans le myocarde des ratons. Enfin, l'analyse bioinformatique nous a permis de démontrer que ces changements affectent notamment la β-oxydation des acides gras et le métabolisme énergétique.

I. 4. 3. Développement d'un modèle in vitro carencé en PDM

Afin de déterminer le temps nécessaire pour dépléter les cellules en folates et vitamine B12 et observer une augmentation des concentrations d'Hcy extracellulaire, une cinétique de déplétion a été réalisée sur 14j. La concentration extracellulaire d'Hcy est fortement augmentée dès le 1er jour de carence en PDM (+125%) **(Tableau 6)**. A 4 jours, l'augmentation d'Hcy est maintenue autour de 102% dans les cellules carencées en PDM. Parallèlement, les niveaux de folates des cardiomyoblastes sont fortement réduits (par 74%) dès le 1er jour de déplétion. Après carence en PDM, ces cellules sont aussi déficientes en

vitamine B12 comparativement à leurs témoins. Néanmoins la plus forte déficience en folates et vitamine B12 est retrouvée à 4 jours. Pour ces raisons, nous avons déplétés les cellules H9c2 pendant 4 jours.

Tableau 6 : Taux d'augmentation et de diminution, respectivement, des concentrations d'homocystéine extracellulaire, et de vitamine B12 et folates intracellulaires après exposition des cellules H9c2 à un milieu déficient en PDM *vs* le milieu C.

	% des variations (PDM *vs* C)			
Temps d'exposition (en jours)	1	4	8	14
Homocystéine	+ 125	+ 102	+ 67	+ 57
Folates	- 71	- 93	- 91	- 52
Vitamine B12	- 34	- 84	- 50	- 87

Les conditions de déficience (4 jours dans un milieu carencé en folates, vitamine B12 et choline) induisent donc une HHcy modérée dans les cardiomyoblastes et définissent notre modèle cellulaire.

I. 4. 4. Reproduction, *in vitro*, dans un modèle cellulaire de carence en PDM des variations d'expression de protéines identifiées *in vivo*

Cette étude a été réalisée dans le but de déterminer au moyen d'une technique de Western blot si des protéines identifiées par l'approche protéomique *in vivo* présentaient également des abondances altérées dans des cardiomyoblastes carencés en PDM *in vitro*. Notre intérêt s'est porté sur les protéines suivantes : l'α-crystalline B (CRYAB) qui est la plus importante des chaperones des cardiomyocytes (Singh *et al.,* 2007) et la prohibitine (PHB) qui aurait également une activité de chaperone, ainsi qu'un rôle protecteur contre le stress oxydant dans les cellules H9c2 (Liu *et al.,* 2009). Nos résultats montrent que ces deux protéines ont leur abondance respectivement diminuée et augmentée après 4 jours d'exposition à un milieu carencé en PDM. Ces variations sont en accord avec celles observées *in vivo* dans le myocarde des ratons de 21 jours déficients en PDM.

Deux protéines chaperones, CRYAB et PHB, ont leur abondance altérée dans notre modèle de cardiomyoblastes déficients en PDM et générant des quantités excessives d'Hcy comparativement à des mêmes cellules exposées à un milieu complet.

I. 5. Conclusion

Nous avons montré à travers cette étude qu'une déficience nutritionnelle en 3 PDM (folates, vitamine B12 et choline) chez la rate induit des changements au niveau du protéome cardiaque de sa progéniture à l'âge de 21 jours, affectant différentes voies métaboliques essentielles à la fonction tissulaire (le métabolisme énergétique par ex.). L'augmentation du niveau total des MPT oxydatives des protéines suggère l'induction d'un stress oxydant dans ces conditions. Ces modifications pourraient contribuer à la diminution d'abondance observée pour diverses protéines de notre analyse protéomique.

Le modèle cellulaire de déficience en PDM et d'HHcy que nous avons développé ouvre de nouvelles perspectives d'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires précoces induits par cette condition. Ceci est particulièrement vrai pour les 2 protéines chaperones, PHB et CRYAB, dont l'abondance est modifiée par la déficience en PDM similairement *in vivo*, dans le myocarde des ratons et *in vitro*, dans des cardiomyoblastes. Notre modèle cellulaire pourrait donc être utilisé pour mieux comprendre le rôle des processus de remodelage des protéines cardiaques au cours d'une déficience en PDM. Les dysfonctionnements métaboliques générés par cette dernière dans le myocarde des ratons pourraient participer au développement de l'hypertrophie cardiaque qui a été rapportée chez ces animaux (Garcia *et al.*, 2011).

II. Seconde étude (publication n°2)

II. 1. Introduction

Dans la première publication, nous avons montré une modification du protéome cardiaque chez des ratons déficients en PDM, puis développé un modèle de cardiomyoblastes déficients en 3 PDM (folates, vitamine B12 et choline). Dans cette seconde étude, nous avons comparé ce dernier à un modèle cellulaire similaire ne mimant cette fois-ci que la déficience en folates. Celle-ci, comparativement à celle de la vitamine B12 ou de la choline, est fréquente dans différentes fractions de la population générale.

Quinze pour cent des protéines myocardiques que nous avons identifiées comme affectées par la déficience maternelle en PDM chez le raton, interviennent dans la réponse au stress du RE. Il s'agit notamment de plusieurs Hsps (Hsp27, Hsp70, Hsp60). De plus, l'abondance d'au moins 2 de ces protéines, les molécules chaperones CRYAB et PHB, variait de la même manière *in vitro* dans des cardiomyoblastes en culture et *in vivo* dans le myocarde des ratons consécutivement à la déficience en PDM. Les chaperones contribuent au bon repliement des protéines dans le RE. L'accumulation dans ce compartiment de protéines de conformation anormale engendre un stress qui se traduit par la réponse UPR. De nouvelles chaperones sont notamment synthétisées pour réparer ces anomalies et participer à l'élimination des protéines irrémédiablement malformées. Nous avons précédemment montré que le niveau total de la carbonylation des protéines myocardiques était augmenté chez les ratons déficients en PDM. Or, la carbonylation est un mécanisme de MPT irréversible qui conduit les protéines à leur dégradation (Jung *et al.*, 2006). Comme nous l'avons relaté dans la revue bibliographique, des études ont montré l'induction d'un stress du RE dans des conditions de déficience nutritionnelle en PDM et d'HHcy (Kokame *et al.,* 1996; Alessio *et al.,* 2010). Cependant, peu de ces études ont porté sur le tissu cardiaque.

II. 2. Objectifs

L'étude *in vivo* chez le raton a apporté de nouvelles informations sur l'impact de la déficience en PDM et l'HHcy associée sur le protéome du tissu cardiaque. Toutefois, nous ne disposions pour comparaison d'aucune donnée sur l'impact de la seule déficience en un PDM majeur comme les folates. La possibilité de manipuler la composition du milieu de culture synthétique que nous avons développé pour notre étude *in vitro* nous a donc conduit à mettre en place un modèle similaire de cardiomyoblastes (lignée H9c2) spécifiquement carencées en folates. Les impacts des 2 conditions de déficience, l'une en folates, l'autre en folates, vitamine B12 et choline, ont

ainsi pu être comparés au niveau du protéome de ces cellules. On pouvait théoriquement s'attendre à un effet plus modéré de la déficience en un seul PDM. Cette seconde étude visait également à déterminer l'impact des 2 conditions de carence sur la réponse au stress du RE et l'expression de gènes impliqués dans le système de dégradation des protéines protéasome-dépendant.

II. 3. Publication n°2 intitulée « Folate and methyl donor deficiency modify proteome of cardiomyoblasts and induce an ER stress"

FOLATE AND METHYL DONOR DEFICIENCIES MODIFY PROTEOME OF CARDIOMYOBLAST AND INDUCE AN ER STRESS

Emilie Martinez, Christiane Deval, Céline Jousse, André Mazur, Blandine Comte[#], Patrick Brachet[*#]

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, CRNH d'Auvergne, Centre INRA de Theix, Saint-Genès Champanelle, France

[#]: These authors contributed equally to the study

Abbreviations: CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonic acid; C, Control; 2-D, two-dimensional; DTT, dithiothreitol; ER, endoplasmic reticulum; FBS, fetal bovine serum; FC, Fold change; FD, Folate deficiency; HHcy, hyperhomocysteinemia; Hcy, homocysteine; p*I*, isoelectric point; MD, methyl donor; MDD, MD-deficient; MS, mass spectrometry; MW, molecular weight; UPR, Unfolded protein response; UPS, Ubiquitin-proteasome system

☆ E.M. was sponsored by a doctoral fellowship from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (France).

* Corresponding author: Patrick Brachet: patrick.brachet@clermont.inra.fr; Unité Nutrition Humaine, Unité Mixte de Recherche 1019 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université d'Auvergne, Centre INRA de Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France.

Abstract

Folate, vitamin B12 and choline, namely methyl donor (MD) involved in the remethylation of homocysteine (Hcy) to methionine. A MD deficiency is linked with an increase in plasma Hcy level, a condition considered as a risk factor for cardiovascular disease. We previously showed that MD deficient diet altered cardiac proteome of pup rats and induced an increase of protein oxidative modification. Moreover, MD deficient (MDD) medium in cardiomyoblast cells induced an alteration of the chaperon's proteins α-crystalline β (CRYAB) and prohibitin (PHB). However, the mechanisms in these cardiac proteome changes remain still unclear. We used the *in vitro* H9c2 cell model, lacking either folate (FD) only or several MD. Our results showed that a 4-day MD deficiency, but not FD was associated with a significant increase in extracellular concentration of Hcy compared to control. The proteome analyses of FD and MDD cells compared to that of the control revealed that both conditions modulated the expression of thirteen proteins. They notably modified gene and protein expression of CRYAB, protein disulfide isomerase-4 and prohibitin Because of the location and role of chaperones in the endoplasmic reticulum, we studied mRNA expression of ER stress actors, namely CHOP, ATF6, and BIP and the observed significant increase at D1 of deficiencies suggest an augmentation protein of misfolding. Furthermore, mRNA of E3 ubiquitin ligases, namely Hrd1 and Mafbx, key enzymes of protein degradation by proteasome increased at D4. In conclusion, folate and MD deficiencies led to accumulation of aberrant proteins that induce ER stress and degradation of proteins by proteasome.

Keywords: Methyl donor deficiency; H9c2 cells; ER stress; homocysteine; Myocardium; Proteomics

Introduction

Numerous studies have highlighted the relationships between diet and health. Imbalanced diets lead to deficiencies in micronutrients including vitamins. A particular interest has focused on specific vitamins which are considered as methyl donor (MD): folate, vitamin B12 and choline. These MD are involved in the remethylation of homocysteine (Hcy) to methionine. MD deficiency conduces to hyperhomocysteinemia (HHcy), a risk factor for cardiovascular diseases. Garcia *et al.* showed that MD deficiency is related to ventricular hypertrophy in pup rats associated with lipid and energy metabolism modifications, impairment of mitochondrial fatty acid ß-oxidation, and alteration of gene and protein expression of PPAR (Garcia *et al.*, 2011).

The mechanisms underlying the MD deficiency associated with HHcy have been largely investigated. *In vivo* and *in vitro* studies indicated that it can increase oxidative stress (Chang *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2007; Tyagi *et al.*, 2011). Moreover, it has been shown that MD deficiency and HHcy can induce mis-incorporation of uracile in DNA and alter its methylation and repair that can lead to gene modifications and thus aberrant proteins (Niculescu *et al.*, 2006; Duthie *et al.*, 2010). In a previous study, we showed in MDD pup rats increased formation of carbonyl groups into proteins (Martinez *et al.,* in press). Protein carbonylation is an irreversible oxidative post-translational modification leading to non functional conformation and subsequent degradation by the proteolysis apparatus (Jung *et al.*, 2006). Carbonylated actin has been shown as degraded by the proteasome in ischemic heart (Divald *et al.*, 2006) and cytoskeletal protein carbonylation can conduct to aggregate formation (Castro *et al.*, 2012) which is prevented by chaperone proteins. Our earlier results demonstrated changes in the abundance of several proteins involved in the protein folding, notably heat shock proteins (Hsp) Hsp27, Hsp70, prohibin (PHB), and α-crystallin B (CRYAB) (Martinez *et al.,* in press). Hsp have been implicated in cardioprotection. Indeed, the expression level of Hsp70 protein and the activity of the heat shock transcription factor-1 were elevated in rat heart hypertrophy induced by exercise

(Sakamoto *et al.*, 2006). Moreover, overexpression of Hsp20 in mice improved cardiac function and prolonged survival after chronic administration of doxorubicin, a drug with cardiotoxic effects, and attenuated cardiac injury by notably limited cardiomyocyte death and apoptosis (Fan *et al.*, 2008).

Several chaperones are located in endoplasmic reticulum (ER), site for protein translation and folding. It has been shown that accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen results in an ER stress and the onset of an Unfolded protein response (UPR) (Jager *et al.*, 2012). This is taking place from the activation of three transmembrane proteins of the ER: the protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), the activating transcription factor 6 (ATF6), and the inositol requiring enzyme 1 (IRE-1), aiming together to increase the capacity of folding, maturation, or degradation of the ER. Some studies showed that a high level of Hcy can induce an ER stress. *In vitro*, Hcy alters the expression of genes sensitive to ER stress like GADD153, GADD45, AFT4, and ATF6 (Outinen *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2012). Exposure of osteoblast cells for 24 h with high levels of Hcy (2.5 and 5 mM) induced an increased expression of proteins GRP78, IRE-1, C/EBP-homologous protein (CHOP) and ATF4 (Park *et al.*, 2012). Moreover, in ApoE$^{-/-}$ mice fed a diet enriched in methionine with low folate, vitamins B12 and B6, a moderate HHcy was observed with an increased expression of binding immunoglobulin protein (BiP also named 78 kDa glucose-regulated protein homolog, GRP78) and GRP94 (Alessio *et al.*, 2011).

However, the mechanisms by which the MD deficiency can alter the cardiac proteome remain still unclear and the relations between MD and ER stress are not yet fully investigated. The aim of the present study performed in H9c2 cells was then to bring further information on the impact of folate deficiency and folate/vitamin B12/choline deficiencies on the cardiomyoblast proteome, and to compare the differential protein expression induced by both deficiencies in order to better indentify reticulum endoplasmic actors in those deficient cells.

Materials and methods

Model of FD and MD deficient cardiac cells and conditions of deficiency: H9c2 cells from the clonal myoblastic cell line, derived from embryonic rat heart (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France) were cultured as previously described (Martinez *et al.,* in press). Folate deficient (FD) and MDD media were made in-house from synthetic and lacking folic acid- or folic acid, vitamin B12 and choline-depleted MCDB 131 media, respectively. Complete medium (C) was obtained by complementing the FD or MDD medium with the lacking nutrient(s) up to its (their) concentration in MCDB 131 (Knedler *et al.*, 1987). Control, FD and MDD MCDB 131 media were supplemented with 2 mM glutamine, 1% nonessential amino acids, 100 IU/mL penicillin/streptomycin (100 IU/mL) and 10% (v/v) dialysed FBS. After growing to 50-60% confluence in DMEM culture medium, cells were adapted overnight in the C MCDB 131 and then exposed either to the C, FD or MDD MCDB 131 medium for 4 days. Cells were grown to 70% of confluence to maintain as cardiomyoblasts. At each passage or medium renewal, the used culture medium was sampled and kept at -80°C until further analyses.

Extracellular Hcy and intracellular folate and vitamin B12 quantitations: Measurement of extracellular Hcy concentration was performed by reverse phase-HPLC coupled with fluorescence detection, after Hcy reduction by Tris(2-carboxyethyl phosphine hydrochloride) and derivatization with 7-fluorobenzofurane-4-sulfonic acid (Pfeiffer, 1999). Intracellular concentrations of both vitamins were determined by using a radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals).

Lactate dehydrogenase release: LDH activity in the medium was monitored as an index of cell viability. After exposure of cells to C, FD or MDD medium for 4 days, the supernatants were

separated by centrifugation (500 x g, 3 min) and LDH concentrations were measured using a commercially available kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 490 nm.

Evaluation of cell size: After 4 days of treatment in C, FD and MDD media (n=3/condition), cells were trypsinized, suspended in PBS/EDTA 2mM, and directly passed through the flow cytometer. For each sample, 5,000 cells were recorded and analyzed through the forward scatter light (FSC) which is proportional to the cell size. The data were quantitatively analyzed using the CellQuest software®.

Proteomics analyses: Following exposure to the different media, cells were washed twice with PBS and scraped in lysis buffer: 7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) 3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonic acid (CHAPS), 0.2% (v/v) biolytes pH 3-10, 50 mM dithiothreitol (DTT), and 0.05% (v/v) protease inhibitor cocktail. Lysates were sonicated twice and cell protein concentration was determined by the RC DC™ protein assay kit. Extracted proteins were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE). For the first dimension of both analytical and preparative gels, 150 µg of proteins were loaded onto 7 cm, pH 3-10 non-linear, Bio-Rad ReadyStrips by inclusion of an adequate volume of extract in rehydration buffer [7M urea, 2M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (w/v) DTT, 0.2 % biolytes pH 3-10, 0.0002% (w/v) Bromophenol blue] (BioRad, Sigma). The second dimension consists in separating protein spots. Spots were visualised on gels by 0.02% (w/v) colloidal Coomassie Blue and images were captured on an image scanner (Amersham ImageScanner, GE Healthcare, Orsay, France). Quantification of protein changes across triplicates of each protein sample from C, FD or MDD H9c2 cells (n=15/condition) was captured via image alignment and analysis, and integrated analysis of expression profiles using the Progenesis SameSpots software

(Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK). Results were expressed as means ± SD. Tailored multivariate statistical analysis facilities incorporated into the Progenesis SameSpots software were used for image analysis with $p < 0.05$ considered significant. Spots showing a significant change in abundance between two conditions were subsequently analysed by LC-MS-MS: nano HPLC Ultimate 3000 RSL (Dionex, Courtaboeuf, France) and LTQ VELOS (ThermoScientific, Courtaboeuf, France).

Western blot analysis: After 1, 2 and 4-days exposure to either C, FD or MDD MCDB 131 medium, cell protein extracts were subjected to electrophoresis in 12% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. Membrane was blocked with 5% (w/v) BSA in TBST buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl and 0.05% (v/v) Tween 20) and subsequently incubated overnight with a primary antibody, namely rabbit anti-PHB (dilution: 1/2000), anti-CRYAB (1/5000), or rabbit anti-β-actin polyclonal antibody (1/2500) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Membranes were then washed and incubated for 1 h with secondary goat anti-rabbit IgG antibodys diluted 1/2000 (Millipore SAS, Molsheim, France). Antigen-antibody immunocomplexes were revealed by chemiluminescence and visualized by exposure to X-ray films. Bands were scanned and their intensities (expressed as arbitrary units) evaluated by a semiquantitative densitometry analysis performed with the ImageJ® 1.37v software (Wayne Rasband, NIH, USA).

Gene expression analysis using real-time RT-PCR. One µg of RNA was treated with DNase I, Amp grade (Invitrogen), prior to cDNA Synthesis. Half of one µg of treated RNA was reverse transcribed using random primers and superscript II reverse transcription kit (Invitrogen).

Real time PCR was carried out using the CFX96 Real-time PCR detection system (Biorad). For PCR reactions a master mix of the following reaction components was prepared: 6 µl of water, 1

µl of each forward and reverse primer (10 µM), 10 µl of Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystems, country) and 2 µl of a 50 fold dilution of the reverse transcribed total cDNA. The reaction mixture was initially denatured at 95°C for 10 min then cycled 40 times. In each cycle, the mixture was kept at 95°C for 10 sec, then at 60°C for 45 sec. The PCR reaction was supplemented by a melting curve analysis process in a temperature range from 55°C to 95°C with 0.5°C increments at each step. A negative control without cDNA template was run with every assay to assess the overall specificity

Primers for rat sequences were used and yielded PCR products 100 bp in size. To normalize for mRNA content, 18S was also amplified. The comparative threshold cycle method with 18S as reference gene was used to compare the relative mRNA expression between FD, MDD and C groups, where the relative mRNA abundance was arbitrarily set to 1.

Statistics

Statistical differences between the C, FD and MDD conditions were determined by using ANOVA followed by *post hoc* comparisons. Results were presented as means ± SD. For all presented statistics, p value < 0.05 was considered significant.

Results

In vitro model of FD and MDD cardiomyoblast cells

To better understand the cellular mechanisms of the impact of folate and MD deficiencies on myocardium, we developed an *in vitro* heart cell culture model using H9c2 cardiomyoblasts, lacking either folate (FD) or several MD (folate, vitamin B12 and choline). Extracellular and intracellular concentrations of Hcy and vitamins (folate and vitamin B12) in C and MDD conditions were previously analysed in Martinez *et al., (in press, 2012)*.

FD and MDD conditions resulted in a dramatic decrease in folate concentrations (67% and 95%, respectively) in H9c2 cells exposed for 4 days (Fig. 1A). After this time, absence of folate did not provoke vitamin B12 deficiency whereas absence of MD induced an important, but not significant, decrease in intracellular level of vitamin B12 in H9c2 cells (Fig. 1B). Finally, only MD deficiency was associated with an increase of extracellular Hcy levels (Fig. 1C).

We assessed cytotoxic effects of FD and MDD media on H9c2 cells using the quantitation of LDH release. Cardiomyoblasts exposed to these conditions for 4 days released the same amount of LDH than those exposed to control medium (Fig. 2A), indicating no significant increase in cell death in the depleted media.

MD deficiency and HHcy were associated with ventricular hypertrophy. Using flow cytometry, we thus evaluated the cell size after 4 days of exposure to the different conditions. Neither, folate or MD deficiencies did significantly change this parameter (Fig. 2B).

FD and MDD media induced changes in the H9c2 proteome

To analyse the impact of FD and MDD conditions on cardiomyoblast cells, the proteomes of FD and MDD cells were compared to that of the C cells. Five biological replicates of the control and depletion experiments were realized. For each biological replicate, 2-D gels were realized in triplicate. A representative Coomassie blue-stained 2-D gel is presented in Fig. 3. Under our

experimental conditions, about 500 protein spots were detected per gel. Comparative analysis of the protein patterns using the Progenesis SameSpots software revealed 22 spots with a statistical different volume between the different conditions. The position and index number of the spots are indicated in Fig. 3. Of these, 13 proteins were identified by mass spectrometry, 7 being upregulated with fold changes (FC) in abundance ranging from 1.2 to 1.9 and 6 being down-regulated with FC in abundance ranging from -1.2 to -1.5 after folate and MD deficiency compared to C (Table 2).

Seven and eleven proteins were modified by the FD and MDD condition respectively, among which five proteins being commonly modified by both types of deficiency: the abundances of the protein disulfide isomerase A4 (PDIA4), Seryl-tRNA synthase (Sars) and serum albumin precursor (ALB) were increased in a range of 1.3 to 1.5 whereas the expression levels of the CRYAB and 60S acidic ribosomal protein P2 (Rplp2) were decreased.

In the FD condition, two other proteins were differentially expressed: the nucleoside diphosphate kinase B (Nme1) was down-regulated, while the abundance of the inorganic pyrophosphatase (Ppa1) was increased. In MD deficiency, in addition to the 5 common proteins, the expression of six other proteins was modified. The Caldesmon 1 isoform β (Cald1), moesin (Msn) and glycyl-tRNA synthetase (Gars) were up-regulated, unlike the mitochondrial glutamate dehydrogenase-1 (Glud1), the electron transfer flavoprotein subunit α mitochondrial precursor (Efta) and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which were down-regulated.

Folate and MD deficiencies modified mRNA and protein expressions of chaperones

Proteomic analyses revealed that CRYAB and PDIA4 expressions were modified by both types of deficiency. In the myocardium of MDD pup rats as well as in cells exposed for 4 days to the MDD conditions, we previously showed a modification of the expression of 2 chaperones' proteins, namely CRYAB and PHB. To elucidate the molecular mechanisms involved, we

analyzed the mRNA expression of PHB, CRYAB and PDIA4 in the different conditions. The expression profile of these 3 mRNAs is similar with folate and MD deficiencies: they were downregulated at D1 and D2 and upregulated at D4 in comparison with C (Fig. 4).

Then, the expression of these two proteins was analyzed along the time course with Western blotting (Fig. 5). Compared to C cells, CRYAB decrease at D1 and D4 in FD cells and only at D4 in MDD cells. Inversely, PHB expression increased at D2 of folate deficiency and continued up to D4 compared to the C condition whereas the MDD condition induced a strong increase in PHB expression from the first day of deficiency (+ 50 %) until D4 when compared to C cells.

CRYAB, PHB and PDIA4 are necessary for appropriate protein folding. Changes in their mRNA and proteins expressions with both deficiencies suggested the presence of an ER stress.

Folate and MD deficiencies induced mRNA expression of ER stress biomarkers

The assessment of an ER stress was performed with a time course analysis of the mRNA expression of some of its key actors such as CHOP, ATF6 and BiP/GRP78 in H9c2 cells exposed to FD and MDD media in comparison with the C condition. After one day of both deficiencies, the expressions of CHOP and ATF6 were strongly increased by a 20-fold and 2-fold respectively (Fig. 6). These overexpressions were maintained over 4 days (data not shown). mRNA of BiP was overexpressed by a 2-fold only at D1 with folate and MD deficiencies (data not shown).

Folate and MD deficiencies increased mRNA expression of markers of ubiquitin-proteasome system (UPS)

The modifications of expression of chaperones' proteins and the presence of ER stress in FD and MDD cells suggested that protein misfolding increased with these deficiencies. Misfolded proteins in the lumen or membrane of the ER are ultimately translocated into the

cytosol, poly-ubiquitinated, and degraded by the proteasome. E3 ubiquitin ligases are key enzymes in the ubiquitination process as they recognize the substrate and facilitate coupling of multiple ubiquitin units to the protein that is to be degraded by the proteasome. We therefore measured the mRNA expression of E3 ligase, namely Hrd1 because it is one of the main E3 ligase of ER-associated degradation (ERAD). We also analyzed the mRNA expression of MAFbx involved in the degradation of specific muscle proteins. Both MAFbx and hrd1 mRNAs were increased after only 4 days of exposure in FD and MDD cells (Fig. 7) showing an activation of the proteasome system by the FD and MDD conditions.

Discussion

This study shows that folate and MD deficiencies in H9c2 cells alter proteome and induce an ER stress. To further study the impact of MD on cardiac cells, we developed an *in vitro* cell culture model lacking either folate (FD) or several MD (folate, vitamin B12 and choline). None of the experimental conditions modified cell size nor induced cytotoxicity. One particular interest of our cell model is that MD deficiency was associated with a significant increase in extracellular concentration of Hcy compared to C whereas such level was not observed in the FD condition. In the context of the analysis of the effects of HHcy, most of the *in vitro* studies are using the approach where Hcy is directly added in the cell medium. The present cell culture parameters are therefore favourable for an analysis of the early impacts of folate and MD deficiencies on cardiomyoblast cells associated or not with pathophysiological levels of extracellular Hcy. The modifications of the proteome concern different aspects of cell function, from protein synthesis and cell structure to energy metabolism.

Protein synthesis: In H9c2 cells, medium lack of folate and MD modified the abundance of proteins necessary for cell replication, transcription and translation. More precisely, MD

deficiency decreased the abundance of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a protein known to enhance the processivity of DNA polymerases in eukaryotes during DNA replication and an indicator of cell cycle progression at the G1/S transition. In rat cardiac microvascular endothelial cells, the expression of PCNA was decreased after treatment with Hcy suggesting an abnormality in cell proliferation (Wang *et al.*, 2012). Moreover, aminoacyl-tRNA synthetases, a family of enzymes that catalyze an essential step to the translation of the genetic message into proteins: the esterification of amino acids on the 3' end of tRNA, were altered by both MD and folate deficiencies. In fact, they increased the abundance of cytoplasmic seryl tRNA synthase, and MD but not folate depletion increased the abundance of glycyl tRNA synthetase. Their impact on these specifics tRNA synthetases can be explained by the interconnection of glycine and serine with the folate cycle. First, serine hydroxymethyltransferase catalyzes the transfer of a β-carbon from serine to tetrahydrofolate to form glycine and 5,10-methylene-tetrahydrofolate. Also, glycine N-methyltransferase catalyzes a reaction that converts glycine and S-adenosylmethionine into N-methylglycine and S-adenosylhomocysteine respectively. In addition, it has been shown that an alteration of mitochondrial seryl tRNA synthetase leads to derangements in mitochondrial protein synthesis and consequently in energy supply, thus leading to alteration of vascular development (Gibbons *et al.*, 2004; Herzog *et al.*, 2009). The abundance of the 60S acidic ribosomal protein P2, playing a role in the elongation step of protein synthesis is decreased after MD and folate deficiencies. In a previous study, we observed an increase in the abundance of this protein in MDD rat pups (Martinez *et al.,* accepted, 2012). This apparent discrepancy could be linked to the length of deficiency with a chronic deficiency in pup rats in comparison with the short time of the present experiments in H9c2 cells. All together, these results robustly suggest that folate and MD deficiencies have an impact on transcriptional and translational processes.

Structural proteins: Structural proteins of H9c2 cells were affected by the absence of MD but not of folate. Caldesmon, an actin and myosin binding protein and moesin, a member of the ERM family proteins (Ezrin, Radixin and Moesin) were increased after MD deficiency. These proteins have a crucial role in organizing membrane domains through their ability to interact with transmembrane proteins and the underlying cytoskeleton (Lee *et al.*, 2000). The absence of effect of folate deficiency may suggest that they also could be sensitive to the increased levels of extracellular Hcy levels in MDD.

ER folding and chaperones: In the present study, CRYAB, PHB and PDIA4 genes encoding for proteins playing a role in protein folding, were similarly modulated; transcription decreased at D1 and D2 to increase at D4. Then, the protein expressions with both deficiencies were different. Actually, a probable sufficient level of translation was maintained at the beginning of deficiencies whereas after 4 days of deprivation, the rate of mRNAs increased to supply the protein decreases. The proteomic analysis showed also an increase in the PDIA4 protein level at D4. PDI family, major proteins present within the lumen of the ER, are involved in the catalysis of disulfide bonds and necessary for appropriate protein folding and prevention of misfolding during stress (Laurindo *et al.*, 2012). Analysis of myocardial proteomic analysis of MDD pups rat showed a decrease in the abundance of PDIA3 and CRYAB (Martinez *et al.,* accepted, 2012). The PDI family has been linked to cardioprotection during ischemia in human and mice (Severino *et al.*, 2007; Vekich *et al.*, 2012). Chaperones act by allowing proper protein folding and by preventing the aggregation of protein misfolding and the main one in cardiomyocytes is CRYAB. A misense of the Hsp CRYAB led to dilated cardiomyopathy and alteration of the ubiquitin-proteasome system (UPS) proteolytic function, in the heart (Chen *et al.*, 2005). PHB is also reported as a chaperone specific for mitochondrial proteins and protecting against proapoptotic effect (Nijtmans *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010).

ER stress and unfolding protein response: As protein misfolding triggers the ER stress response (Demasi *et al.*, 2012), we thus we analyzed the impact of depletions on ER stress and UPR. We report here that folate and MD deficiencies in H9c2 cells increased the expression of CHOP, ATF6 and BiP, markers of ER stress. To the best of our knowledge, no cell study has shown yet the effect of these deficiencies on this parameter even if different studies evidenced that high level of Hcy can induce it. In human umbilical endothelial cells, high levels of added Hcy, lead to increased expression of mRNA GRP78/BiP (Kokame *et al.*, 1996) but also induce apoptosis by activation of the UPR, signaled through IRE1, implicating this response may cause endothelial cell injury associated with severe hyperhomocysteinemia (Zhang *et al.*, 2001). In addition, it has been shown that an *in vivo* supplementation of betaine in mice with alcoholic steatosis may decrease plasma Hcy level and CHOP mRNA and protein expression-induced by alcohol (Ji *et al.*, 2003). Accumulation of misfolded proteins in ER results in the activation of several transcription factors contributing to the induction of the gene program, UPR, that encodes proteins designed to restore optimal ER protein folding. ER stress induces the proteolytic cleavage of the transcription factor ATF6 (Fu *et al.*, 2008) which cytosolic moiety will move to the nucleus and act as a transcription activator of UPR. ATF6 restores normal function of the cell by activating the signaling pathways leading to increasing the production of molecular chaperones involved in protein folding like BiP proteins. In this study, the expression of ATF6 mRNA increased (by 3 fold from D1 of folate and MD deficiencies). In parallel, BiP and CHOP mRNAs also increased after both deficiencies. BiP has been reported to attenuate apoptosis induced by proteasome inhibition in rat cultured cardiomyocytes (Fu *et al.*, 2008) and the increased of the CHOP has also been largely reported during ER stress (Schneider *et al.*, 2012). Both CHOP and BiP expressions were induced in samples of human and mice hypertrophic hearts (Okada *et al.*, 2004). Together, these results showed thus, an induction of ER stress with an activation of the UPR by deficiencies.

Ubiquitin-proteasome system: The ER has a machinery of protein quality control which discriminates correctly folded from malformed proteins and allows these last to acquire a conformation or be degraded (Kostova *et al.*, 2003). ERAD pathways allow the destruction of abnormal proteins and polyubiquitinylation through the action of 3 enzymes namely E1 (ubiquitin-activating), E2 (ubiquitin-conjugating), and E3 (ubiquitin-ligase), is an essential step to initiate protein degradation by the 26S proteasome (Demasi *et al.*, 2012). Additionally, Hrd1 is one of the major mediators of substrate ubiquitination, whereas the E3 ubiquitin ligase MAFbx regulates key cardiac transcription factors to control muscle mass and remodeling. MAFbx is linked to specific muscle proteins and transcript levels have been observed as increased in rat hypertrophic heart (Razeghi *et al.*, 2006). A study suggested that increased proteasome activity followed the development of heart disease like hypertrophy (Schlossarek *et al.*, 2012). In a model of mice CRYAB-/-, the increase of ubiquitinated proteins and UPS impairment was detected before cardiac hypertrophy (Chen *et al.*, 2005). Also, it has been shown that cardiomyocytes of cat pressure overloaded myocardium with ubiquitinylated proteins are not undergoing to apoptotic cell death (Balasubramanian *et al.*, 2006). An accumulation of ubiquitinated proteins has been reported in failing human hearts (Tsukamoto *et al.*, 2006). In the present study, mRNA expression of E3 ligase, Hrd1 and MAFbx was strongly increased by both deficiencies, suggesting an activation of the UPS. Thus, absence of folate, as well as MD, most probably led to accumulation of aberrant proteins in the endoplasmic reticulum triggering the unfolded protein response pathway that contribute to cell surviving under these stress conditions.

Energy metabolism: Lack of folate and MD in media altered differently proteins linked to cell energy metabolism. The results observed in the present study confirmed partly what has been previously reported in vivo and in vitro with complete absence of MD (Martinez *et al.,* accepted,

2012). However, the FD and MDD conditions allow revealing interesting differences in particular for mitochondrial metabolism.

Folate deficiency increased the abundance of the inorganic pyrophosphatase (IPP), while it decreased the abundance of nucleoside diphosphate kinase B (NDKB). NDKB plays a major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP. By promoting the hydrolysis of pyrophosphate, IPP provides the driving force for the activation of fatty acids destined for oxidation (Carman *et al.*, 2006). On the other side, MDD cells showed decreases in abundance of specific mitochondrial proteins involved in energy metabolism: the electron transfer flavoprotein (Etfa) and the glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1). Etfa serves as a specific electron acceptor for several dehydrogenases, including acyl-CoA dehydrogenase (Zhang *et al.*, 2006). It transfers the electrons to the mitochondrial respiratory chain *via* ETF-ubiquinone oxidoreductase (ETF dehydrogenase). Acyl-CoA dehydrogenases constitute a class of enzymes catalyzing the initial step in each cycle of mitochondrial fatty acid β-oxidation in which FAD cofactor is required. The decrease of the abundance of Etfa can alter fatty acid oxidation. GLUD1 is a mitochondrial matrix enzyme that catalyses the oxidative deamination of glutamine to 2-oxoglutarate with a key role in energy homeostasis. A positive correlation has been shown between the abundance of GLUD1 with the serum level of vitamin B12 (Himmerich *et al.*, 2001). The differential results observed in MD and folate conditions can suggest that other factors could also sensitive to the increased levels of extracellular Hcy levels in MDD and affecting mitochondrial enzymes.

In conclusion, we first report here that folate and MD deficiencies in H9c2 cells modify the abundance of numerous proteins and notably ER protein folding and chaperones. In general, MDD condition modified expression of more proteins than folate deficiency and notably altered the abundance of structural proteins; both conditions affected expression of the ER folding proteins and chaperones. We demonstrated that the increased of the abundance of the chaperone

proteins are linked to the induction of an ER stress and UPR in FD and MDD cells. ER is machinery for quality control and misfolding proteins must be degraded. Thus, finally, we showed that FD and MDD conditions induce E3 ligases suggesting an activation of the UPS for degradation of ubiquitinylated proteins. All together, our data showed that Folate and MD deficiency conduce to the alteration of chaperones proteins, activate ER stress and the UPS in cardiomyoblast cells.

Acknowledgments

The authors thank Didier Viala and Christophe Chambon (Metabolism Exploration Platform, UMR 1019, INRA, Theix) for the MS identification of proteins and Philippe Gérard (Inserm U954, Nancy) for the vitamin assays.

References

Alessio AC, Santos CX, Debbas V, Oliveira LC, Haddad R & Annichino-Bizzacchi JM. (2011). Evaluation of mild hyperhomocysteinemia during the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient and normal mice. *Experimental and molecular pathology* **90,** 45-50.

Balasubramanian S, Mani S, Shiraishi H, Johnston RK, Yamane K, Willey CD, Cooper Gt, Tuxworth WJ & Kuppuswamy D. (2006). Enhanced ubiquitination of cytoskeletal proteins in pressure overloaded myocardium is accompanied by changes in specific E3 ligases. *J Mol Cell Cardiol* **41,** 669-679.

Carman GM & Han GS. (2006). Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends in biochemical sciences* **31,** 694-699.

Castro JP, Ott C, Jung T, Grune T & Almeida H. (2012). Carbonylation of the cytoskeletal protein actin leads to aggregate formation. *Free radical biology & medicine* **53,** 916-925.

Chang CM, Yu CC, Lu HT, Chou YF & Huang RF. (2007). Folate deprivation promotes mitochondrial oxidative decay: DNA large deletions, cytochrome c oxidase dysfunction, membrane depolarization and superoxide overproduction in rat liver. *Br J Nutr* **97,** 855-863.

Chen Q, Liu JB, Horak KM, Zheng H, Kumarapeli AR, Li J, Li F, Gerdes AM, Wawrousek EF & Wang X. (2005). Intrasarcoplasmic amyloidosis impairs proteolytic function of proteasomes in cardiomyocytes by compromising substrate uptake. *Circ Res* **97,** 1018-1026.

Demasi M & Laurindo FR. (2012). Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res* **95,** 183-193.

Divald A & Powell SR. (2006). Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free radical biology & medicine* **40,** 156-164.

Duthie SJ, Grant G, Pirie LP, Watson AJ & Margison GP. (2010). Folate deficiency alters hepatic and colon MGMT and OGG-1 DNA repair protein expression in rats but has no effect on genome-wide DNA methylation. *Cancer Prev Res (Phila)* **3,** 92-100.

Fan GC, Zhou X, Wang X, Song G, Qian J, Nicolaou P, Chen G, Ren X & Kranias EG. (2008). Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity. *Circ Res* **103,** 1270-1279.

Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, Asano Y, Fujita M, Takashima S, Hori M & Kitakaze M. (2008). Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res* **79,** 600-610.

Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juilliere Y, Malthiery Y & Gueant JL. (2011). Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* **225,** 324-335.

Gibbons WJ, Jr., Yan Q, Li R, Li X & Guan MX. (2004). Genomic organization, expression, and subcellular localization of mouse mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* **317,** 774-778.

Herzog W, Muller K, Huisken J & Stainier DY. (2009). Genetic evidence for a noncanonical function of seryl-tRNA synthetase in vascular development. *Circ Res* **104,** 1260-1266.

Himmerich H, Anghelescu I, Klawe C & Szegedi A. (2001). Vitamin B12 and hepatic enzyme serum levels correlate in male alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* **36,** 26-28.

Jager R, Bertrand MJ, Gorman AM, Vandenabeele P & Samali A. (2012). The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **104,** 259-270.

Ji C & Kaplowitz N. (2003). Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* **124,** 1488-1499.

Jung T, Engels M, Kaiser B, Poppek D & Grune T. (2006). Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **40,** 1303-1312.

Knedler A & Ham RG. (1987). Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. *In Vitro Cell Dev Biol* **23,** 481-491.

Kokame K, Kato H & Miyata T. (1996). Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* **271,** 29659-29665.

Kostova Z & Wolf DH. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO journal* **22,** 2309-2317.

Lan W, Guhaniyogi J, Horn MJ, Xia JQ & Graham B. (2007). A density-based proteomics sample fractionation technology: folate deficiency induced oxidative stress response in liver and brain. *J Biomol Tech* **18,** 213-225.

Laurindo FR, Pescatore LA & Fernandes Dde C. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free radical biology & medicine* **52,** 1954-1969.

Lee JH, Nguyen KH, Mishra S & Nyomba BL. (2010). Prohibitin is expressed in pancreatic beta-cells and protects against oxidative and proapoptotic effects of ethanol. *The FEBS journal* **277,** 488-500.

Lee YH, Gallant C, Guo H, Li Y, Wang CA & Morgan KG. (2000). Regulation of vascular smooth muscle tone by N-terminal region of caldesmon. Possible role of tethering actin to myosin. *J Biol Chem* **275,** 3213-3220.

Niculescu MD, Craciunescu CN & Zeisel SH. (2006). Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *Faseb J* **20,** 43-49.

Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, Muijsers AO, van der Spek H & Grivell LA. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *The EMBO journal* **19,** 2444-2451.

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M & Kitakaze M. (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* **110,** 705-712.

Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI & Austin RC. (1999). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* **94,** 959-967.

Park SJ, Kim KJ, Kim WU, Oh IH & Cho CS. (2012). Involvement of endoplasmic reticulum stress in homocysteine-induced apoptosis of osteoblastic cells. *Journal of bone and mineral metabolism*.

Razeghi P, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF & Taegtmeyer H. (2006). Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* **342,** 361-364.

Sakamoto M, Minamino T, Toko H, Kayama Y, Zou Y, Sano M, Takaki E, Aoyagi T, Tojo K, Tajima N, Nakai A, Aburatani H & Komuro I. (2006). Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy. *Circ Res* **99,** 1411-1418.

Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T & Carrier L. (2012). Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic research in cardiology* **107,** 235.

Schneider CC, Ampofo E & Montenarh M. (2012). CK2 regulates ATF4 and CHOP transcription within the cellular stress response signalling pathway. *Cellular signalling*.

Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, Frede S, Toietta G, Di Rocco G, Bussani R, Silvestri F, Piro M, Liuzzo G, Biasucci LM, Mellone P, Feroce F, Capogrossi M, Baldi F, Fandrey J, Ehrmann M, Crea F, Abbate A & Baldi A. (2007). Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **50,** 1029-1037.

Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, Shintani Y, Takashima S, Kato H, Liao Y, Okazaki H, Asai M, Hirata A, Fujita M, Asano Y, Yamazaki S, Asanuma H, Hori M & Kitakaze M. (2006). Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochem Biophys Res Commun* **340,** 1125-1133.

Tyagi N, Kandel M, Munjal C, Qipshidze N, Vacek JC, Pushpakumar SB, Metreveli N & Tyagi SC. (2011). Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: role of folic acid. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **29,** 1511-1516.

Vekich JA, Belmont PJ, Thuerauf DJ & Glembotski CC. (2012). Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *J Mol Cell Cardiol*.

Wang D, Wang H, Luo P, Hwang A, Sun D, Wang Y, Zhang Z, Liu N, Wang S, Li C & Cao F. (2012). Effects of ghrelin on homocysteine-induced dysfunction and inflammatory response in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Cell biology international* **36,** 511-517.

Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ & Kitajima S. (2001). Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* **276,** 35867-35874.

Zhang D, Xie X, Chen Y, Hammock BD, Kong W & Zhu Y. (2012). Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Circ Res* **110,** 808-817.

Zhang J, Frerman FE & Kim JJ. (2006). Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103,** 16212-16217.

Figures

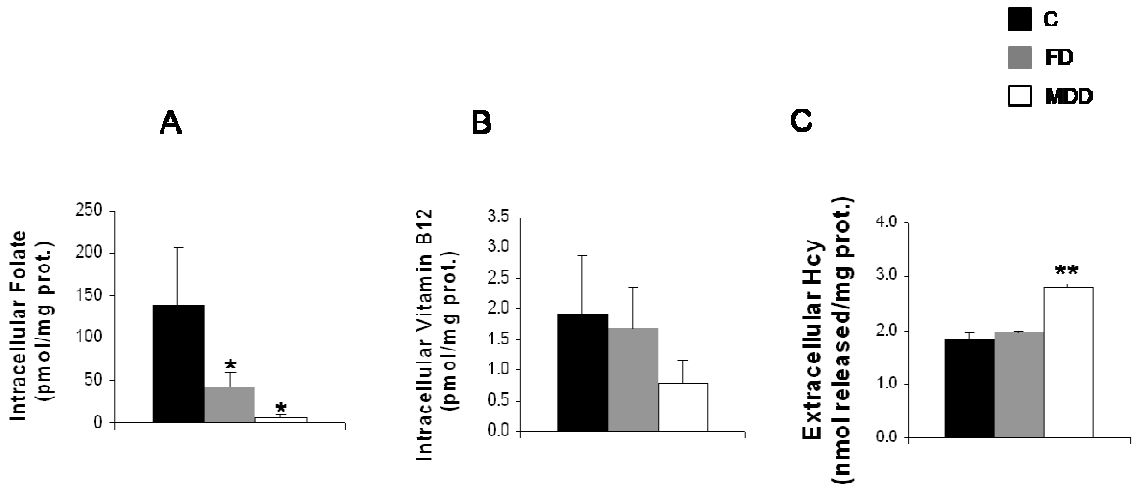


Fig. 1. Variations in intracellular concentrations of folate (A), vitamin B12 (B) and extracellular concentrations of Hcy (C) in H9c2 cardiomyoblasts exposed for 4 days to a C, FD and MDD synthetic MCDB-131 medium. Values are means (+ SD) of 4 experiments with different cell cultures. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$ *vs* C using an ANOVA followed by Mann Whitney test. *Data for C and MDD were already published in Martinez et al. (accepted, 2012) et al.*

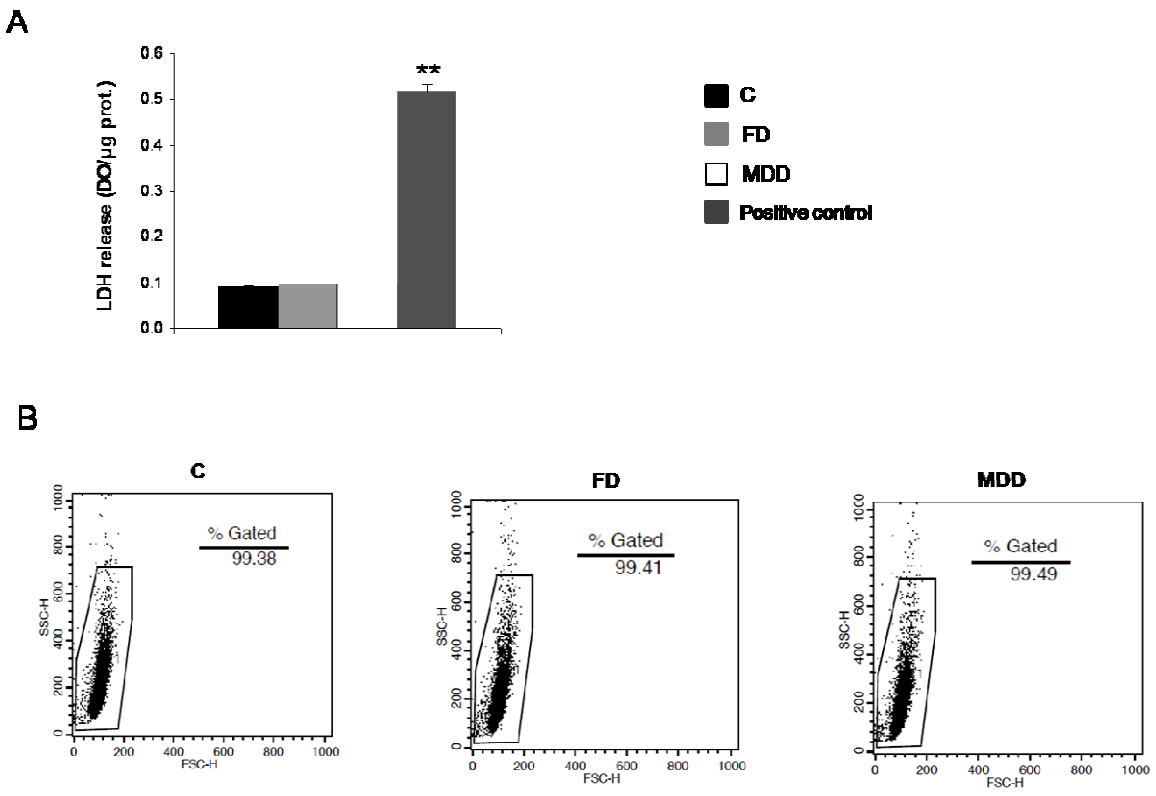


Fig. 2. Evaluation of the effect of 4 days exposure to FD and MDD media on the cytotoxicity (A) and size (B) of H9c2 cells. (A) LDH release in media after 4 days of exposure. Positive control: H9c2 cells exposed to the LDH assay lysis solution *(ref L2152, in vitro toxicology assay kit, sigma-aldrich)*. (B) Cell size of H9c2 cells exposed to C, FD or MDD media for 4 days was evaluated by cytofluorimetry. Values are means (+ SD) of 3 experiments with different cell cultures; **: $p<0.01$ using ANOVA.

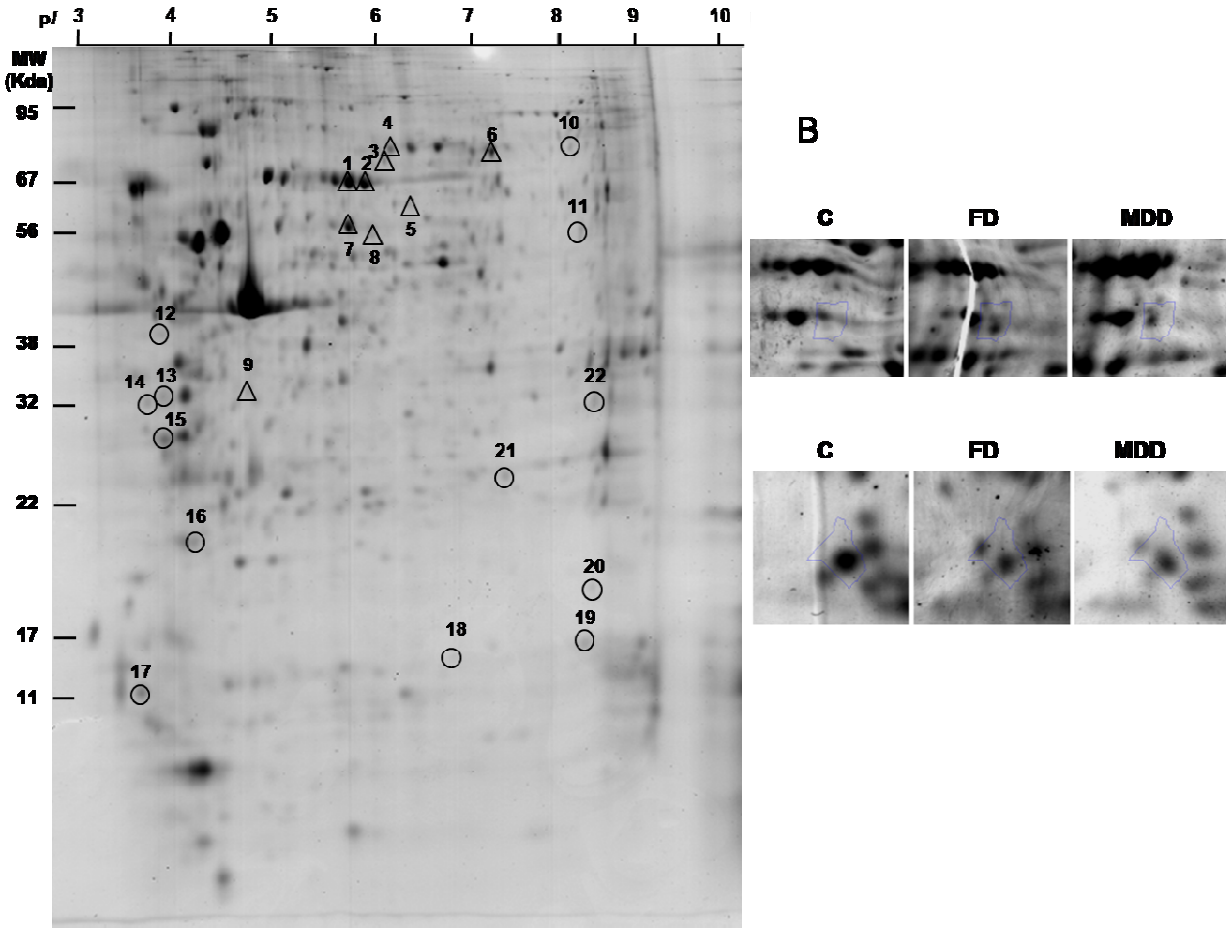


Fig. 3. (A) Densitometry scanning of typical Coomassie blue-stained 2-D gels carried out with total protein extracts from H9c2 cell. X-axis: p*I*, Y-axis: MW. The allocated numbers mark all the protein spots exhibiting significantly different volumes when comparing the FD and MDD *vs* C conditions ($p < 0.05$, ANOVA test integrated to the Samespots software). The triangle defined the up-regulated of the totality of the spots in both deficiencies compared to C whereas the circle marked the down-regulated spots. (B) Example of two spots exhibiting increased and decreased volumes in FD and MDD cells compared to C cells.

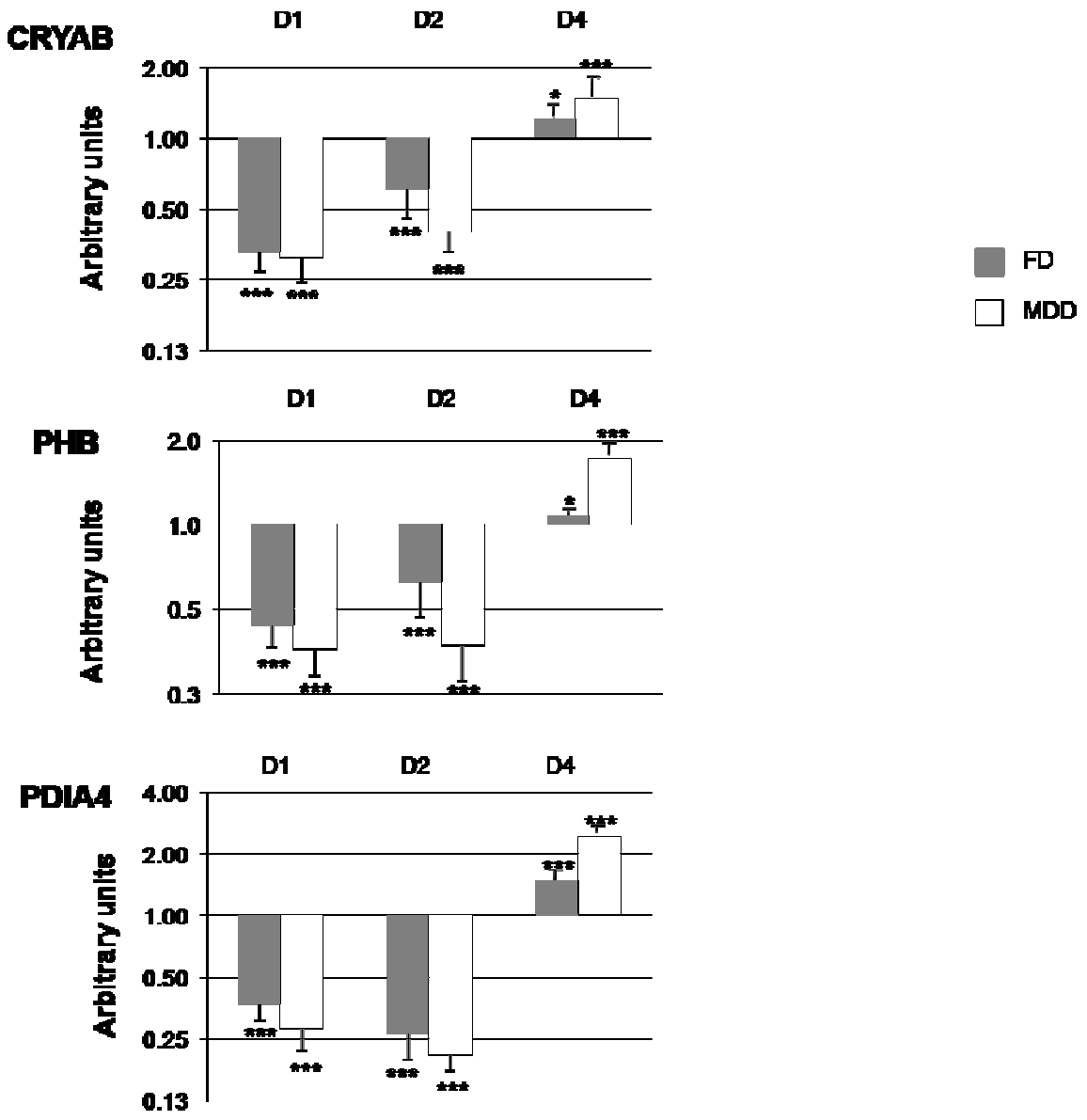


Fig. 4. Time course of the ARNm levels of the CRYAB, PHB and PDIA4 proteins in H9c2 cardiomyoblasts exposed for 1, 2, and 4 days in FD or MDD media. FD and MDD cells were compared to C *: $p<0.05$ and ***: $p<0.001$ using ANOVA then Tukey Kramer.

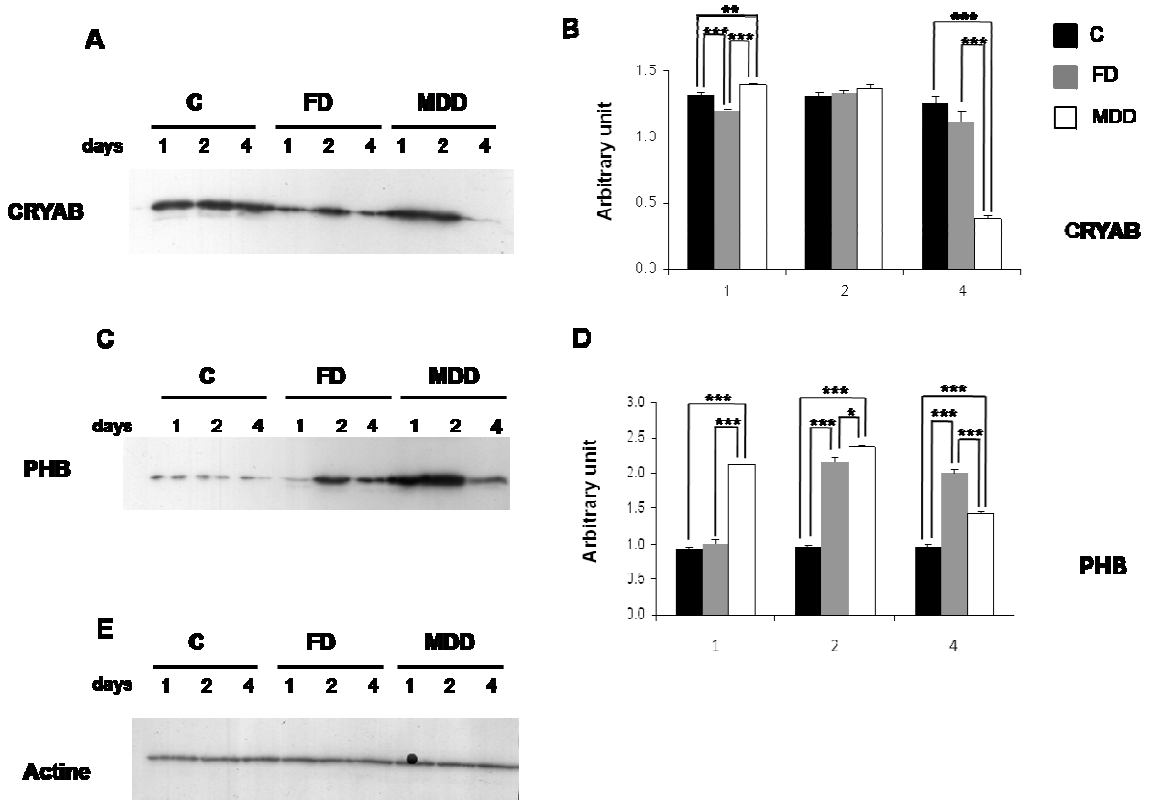


Fig. 5. Western blot analysis of the time course of CRYAB and PHB abundances in H9c2 cardiomyoblasts after folate or MDD deficiency. A, C: Representative Western blots; B, D: Quantification of band intensity by densitometry analysis. Normalization for loading differences was achieved by dividing the densitometry values for individual bands by those for β-actin in the same lane. Comparison of C, FD and MDD condition *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, and ***: $p<0.001$ using ANOVA and then Tukey Kramer.

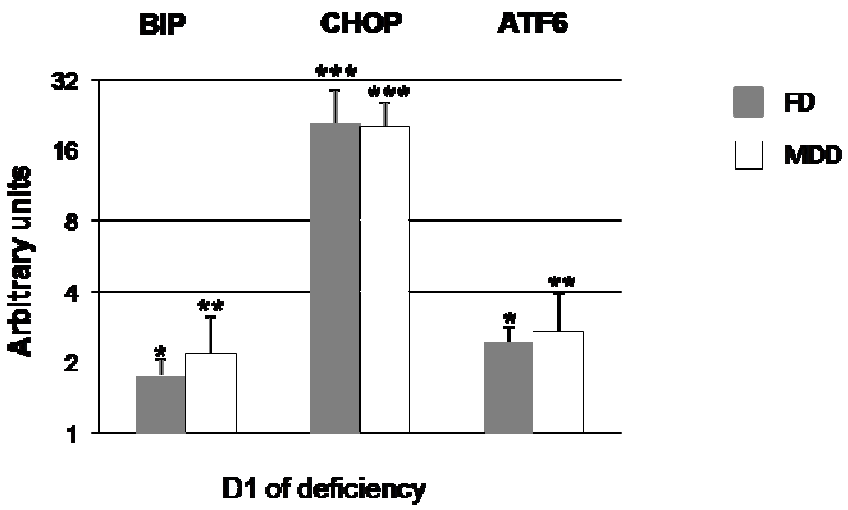


Fig. 6. mRNA levels of ER stress biomarkers after 1 day of folate or MD deficiency. FD and MDD cells were compared to C *: p<0.05, **: p<0.01, and ***: p<0.001

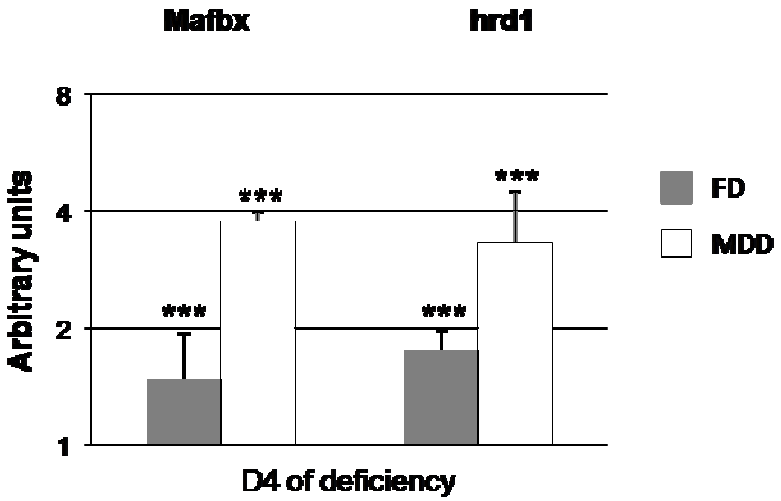


Fig. 7. mRNA level analysis of the expression of E3 ligase after 4 days of exposure to FD or MDD medium**.** FD and MDD cells were compared to **: p<0.01, and ***: p<0.001

Table

Table 1. Primers used for quantitative RT-PCR analysis.

CRYAB: α-crystallin B; PHB: Prohibitin; PDIA4: protein disulfide isomerase A4; Atf6: Activating transcription factor 6; CHOP: C/EBP-homologous protein; BIP: Heat shock 70 kDa protein 5; Hrd1: HMG-CoA reductase degradation protein 1; MAFbx: Muscle atrophy F-box protein and 18S

Primers' name	Accession number	Primers' sens sequence	Primers' antisens sequence
Cryab	NM_012935	5'-CCCTGAGCCCCTTCTACCTT-3'	5'-GCTTCACGTCCAGGTTCACA-3'
Phb	NM_031851	5'-TCCTCATCCCCTGGGTACAG-3'	5'-CGGCCGGAAGAGGATACATA-3'
Pdia4	NM_053849	5'-GAGTCGGTGACCCAGGCTAC-3'	5'-TTTCCCCAGGGAGACTTTCA-3'
CHOP	NM_001109896	5'-CATCCCCAGGAAACGAAGAG-3'	5'-GGTGCTTGTGACCTCTGCTG-3'
Atf6	NM_01107196	5'-TCAGCTGATGGCTGTCCAGT-3'	5'-AACTTCCAGGCGAAGCGTAA-3'
BIP	NM_013083	5'-CGAGGCGTATTTGGGAAAGA-3'	5'-CAGCAATAGTGCCAGCATCC-3'
Hrd1	NM_001100739	5'-CACCAGTGCAGCCACTTCTC-3'	5'-GGCCAGGTACAGAGCCAGAT-3'
MAFbx	NM_133521	5'-CTACGATGTTGCAGCCAAGA-3'	5'-GGCAGTCGAGAAGTCCAGTC-3'
18S	NR_046237	5'-AATCAGTTATGGTTCCTTTGTCG-3'	5'-GCTCTAGAATTACCACAGTTATCCAA-3'

Table 2: Summary of differentially abundant H9c2 proteins in response to folate and MD deprivation identified by proteomics. **: $p < 0.05$ using ANOVA followed by Bonferroni post-tests.

A: Identified proteins with increased spot intensity in:	Index number of spots	UniProt accession number	ANOVA (p value)	Mean fold change *vs C*	% Coverage of matched peptides	Number of matched peptides	Theoretical MW (kDa)/pI
FD and MDD *vs* C							
protein disulfide-isomerase A4** *(PDIA4)*	7,8 8	P38659	0.049	FD: 1.4 et 1.7 MDD: 1.4	58.22	23	62.7/5.12
Seryl-tRNA synthetase *(Sars)*	5	Q6P799	0.028	FD : 1.3 MDD: 1.3	23.4	8	58.6/6.19
serum albumin precursor *(Alb)*	2	P02770	0.042	FD: 1.5 MDD: 1.5	10.5	5	68.7/6.48
F *vs* C							
Inorganic pyrophosphate *(PPa1)*	9	Q499R7	0.041	1.2	13.8	3	32.8/5.47
MDD *vs* C							
Glycyl-tRNA synthetase *(Gars)*	3	Q5I0G4	0.040	1.5	21	8	72/6.07
caldesmon 1, isoform CRAβ *(Cald1)*	4	G3V9E3	0.012	1.6	18.8	9	60.6/6.58
moesin, isoform CRAα** *(Msn)*	6	O35763	0.020	1.4	32.9	15	67.8/6.47

B: Identified proteins with decreased spot intensity in	**Index number of spots**	**UniProt accession number**	**ANOVA (P value)**	**Mean fold change *vs* C**	**% Coverage of matched peptides**	**Number of matched peptides**	**Theoretical MW (kDa)/pI**
FD and MDD *vs* C							
α-crystallin B *(CRYAB)*	20	P23928	0.025	FD : 1.2 MDD 1.2	44.25	6	19.9/7.33
60S acidic ribosomal protein P2 *(Rplp2)*	17	P02401	0.047	FD: 1.3 MDD 1.2	66.96	4	11.7/4.54
FD *vs* C							
Nucleoside diphosphate kinase B *(Nme1)*	19	P19804	0.025	1.3	61.84	7	17.3/7.44
MDD *vs* C							
Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial** *(Glud1)*	11	P00367	0.043	1.3	41.40	15	61.4/8.00
electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial precursor *(Etfa)*	22	P13803	0.0426	1.4	41.14	9	34.9/8.38
Proliferating cell nuclear antigen *(PCNA)*	13	P04961	0.0006	1.5	44.06	7	28.7/4.69

II. 4. Résultats

II. 4. 1. Effets de la déficience en folates et en PDM sur la production d'Hcy par les cardiomyocytes

Dans les cellules cultivées sans PDM pendant 4 jours, les concentrations intracellulaires en folates et en vitamine B12 ont été fortement réduites tandis que la concentration extracellulaire d'Hcy a été augmentée, comparativement à celles cultivées dans le milieu complet *(Cf. résultats publication n°1)*. La carence en folates a quant à elle, permis de diminuer de manière importante la concentration cellulaire de cette vitamine sans effet sur celle de la vitamine B12 et sur la production cellulaire d'Hcy. Nous avons donc disposé de 2 modèles *in vitro* de déficience:

- ✔ **des cellules déficientes en au moins 2 PDM (folates et vitamine B12) et produisant des quantités accrues d'Hcy**
- ✔ **des cellules uniquement déficientes en folates et ne produisant pas davantage d'Hcy que les cellules contrôles.**

Il a ainsi été possible de comparer les impacts d'une déficience en folates et d'une déficience en PDM associée à une HHcy sur le protéome de cardiomyoblastes.

II. 4. 2. Mise en évidence de différences et similitudes entre les effets d'une déficience en folates et d'une déficience en folates/vitamine B12/choline sur le protéome des cardiomyoblastes

L'analyse protéomique des cellules H9c2 a permis d'identifier 13 protéines présentant des abondances significativement différentes entre les cellules carencées 4 jours en folates ou en PDM et leurs contrôles : 7 avaient une abondance accrue et 6 une abondance diminuée. La plupart des protéines sont cytosoliques et certaines sont mitochondriales ou nucléaires. La fonction biologique principale se répartit entre métabolisme énergétique, traduction/transcription ou stress du RE. La comparaison des résultats obtenus avec les 2 conditions de déficience montre que des protéines mitochondriales ou intervenant dans la structure cellulaire n'ont été identifiées que dans le modèle de déficience en 3 PDM **(Figures 37 et 38)**. Parmi les 13 protéines, 5 étaient communes aux 2 déficiences dont CRYAB.

De plus, plusieurs de ces protéines sont similaires ou identiques à celles identifiées dans notre analyse protéomique du myocarde de ratons déficients en 3 PDM. Il s'agit notamment d'une protéine disulfide isomérase (PDIA4) et de CRYAB. Leur abondance était respectivement

augmentée et diminuée, que ce soit dans les cellules carencées en folates ou dans celles carencées en 3 PDM.

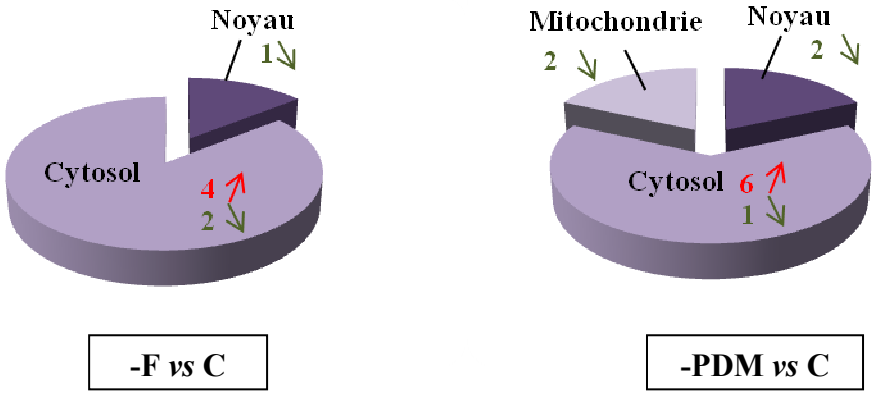


Figure 37 : Répartition des protéines suivant leur localisation. Les flèches vertes signifient une diminution de l'abondance et les flèches rouges, une augmentation. Le nombre associé est la quantité de protéines dont l'abondance augmente ou diminue.

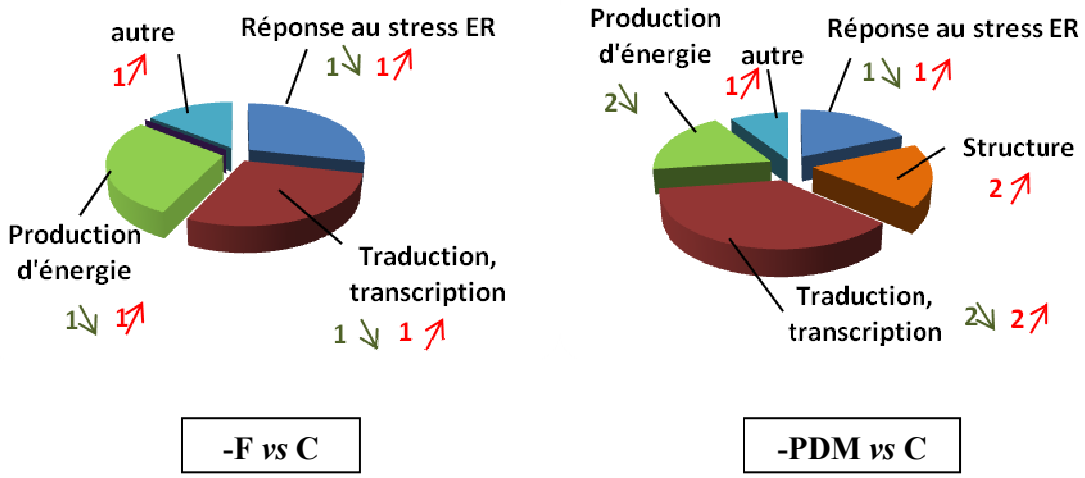


Figure 38 : Répartition des protéines suivant leur fonction. Les flèches vertes signifient une diminution de l'abondance et les flèches rouges, une augmentation. Le nombre associé est la quantité de protéines dont l'abondance augmente ou diminue.

Nos résultats démontrent d'une part, qu'une déficience en folates uniquement et une déficience multiple en 3 PDM sur le protéome de cardiomyoblastes en culture, affectent des voies similaires à celles retrouvées dans notre étude *in vivo*. D'autre part, l'expression de la protéine CRYAB semble particulièrement sensible à une réduction de la disponibilité des folates.

II. 4. 3. Activation de la réponse au stress du RE et de la protéolyse ubiquitine-dépendante dans les cellules H9c2 déficientes en PDM

Les protéines CRYAB et PHB nous ont particulièrement intéressées de part leur rôle de chaperones. Afin de comprendre les mécanismes des effets d'une déficience en folates ou en PDM sur ces 2 protéines ainsi que sur PDIA4, une cinétique de variation de l'expression de leurs gènes a été réalisée. Les résultats de notre étude montrent que, relativement aux contrôles, les niveaux cellulaires des 3 ARNm variaient similairement à J1 et J2 (diminution), ainsi qu'à J4 (augmentation), indépendamment du type de carence. En revanche, leurs expressions protéiques n'avaient pas le même profil. La déficience en PDM altérerait donc l'abondance cellulaire de ces 3 protéines par des mécanismes affectant la transcription et/ou la stabilité de leurs ARN, mais aussi les étapes traductionnelle et/ou post-traductionnelle de la régulation de leur expression.

Afin de mieux caractériser l'induction d'un stress du RE par la déficience en folates ou en 3 PDM, nous avons déterminé les niveaux d'ARNm de plusieurs marqueurs de ce processus. L'augmentation d'expression de *chop*, *bip* et *atf6* a confirmé la mise en route, dès le premier jour de carence, de cette réponse cellulaire par les cardiomyoblastes déficients en PDM.

L'induction d'un stress du RE suggère que des protéines malformées ont été synthétisées et que les mécanismes d'élimination pourraient être stimulés afin d'éviter leur accumulation intracellulaire. Nous avons donc évalué l'activité du principal système de dégradation protéolytique, la voie ubiquitine-protéasome. Pour ce faire, nous avons mesuré l'expression des gènes *murf1* et *Hrd1* qui codent pour deux E3 ligases importantes dans le système de contrôle qualité du RE. Nos résultats montrent que le niveau de leur ARNm dans les cardiomyoblastes est augmenté après 4 jours de déficience en folates ou en 3 PDM.

L'induction rapide du stress du RE dans les cardiomyoblastes déficients en PDM est suivie par l'activation plus tardive du système d'ubiquitination des protéines, suggérant leur dégradation par la voie dépendante du protéasome.

II. 5. Conclusion

La déficience en folates ou en folates, vitamine B12 et choline induit des modifications du protéome des cellules cardiomyoblastiques H9c2 en culture, avec toutefois des différences entre les 2 types de carence. Des protéines chaperones nécessaires au bon repliement des protéines sont affectées dans les 2 cas. L'induction d'un stress du RE et de la voie du protéasome ubiquitine-dépendante pourrait constituer un mécanisme important du processus de survie déclenché par les cardiomyoblastes au cours d'une déficience en PDM.

III. Etudes complémentaires

III. 1. Implication de c-myc dans les mécanismes de l'effet de la déficience en PDM

Les résultats de notre recherche, grâce à l'outil bio-informatique IPA permettant la construction de réseaux métaboliques associant les modifications du protéome mises en évidence dans l'étude *in vivo*, prédisent que le facteur de transcription C-MYC serait activé par la déficience en PDM dans le myocarde des ratons **(Figure 39)**. Cette activation contribuerait à la diminution d'expression de Tpm1 et Cryab et à l'augmentation d'expression de Prdx3, PHB, GRP75, Hspd1, Hsp27 et Nppa comme cela a été rapporté dans la littérature (Guo *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001; Menssen *et al.*, 2002; Wonsey *et al.*, 2002). Cependant, elle n'a malheureusement pu être vérifiée dans ce modèle animal du fait de quantités insuffisantes d'échantillons myocardiques.

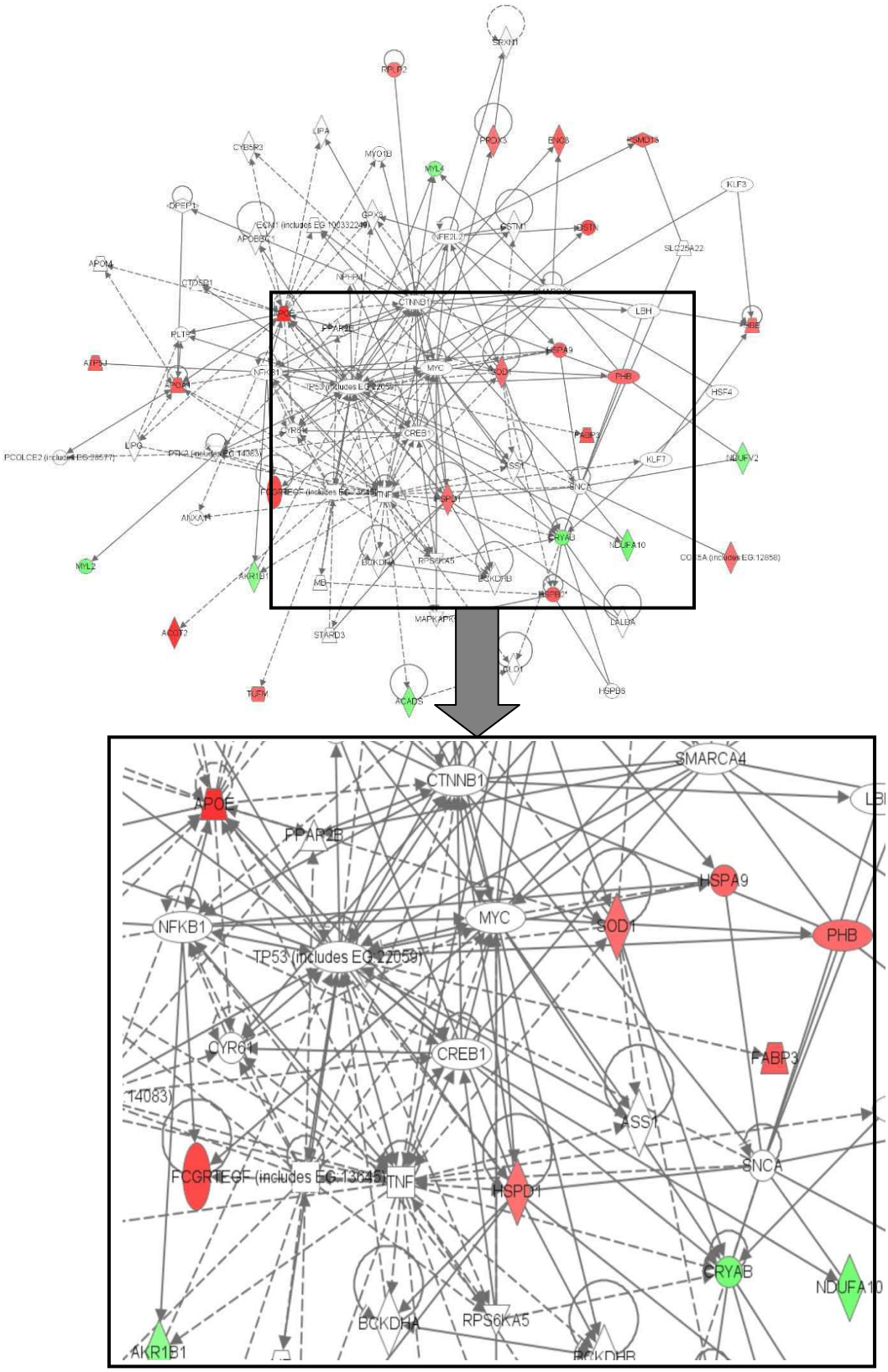


Figure 39 : Réseau généré par l'outil IPA montrant la relation du facteur de transcription C-MYC avec plusieurs des protéines identifiées dans l'analyse *in vivo* du protéome de myocarde de ratons déficients en PDM.

La possibilité d'une modification de l'expression du gène *c-myc* a par contre, pu être testée dans les modèles cellulaires **(Figure 40)**. Nos mesures montrent que le niveau de l'ARNm de ce gène est significativement augmenté dès le premier jour de déficience en 3 PDM (par 3,5 fois) ou en folates (par 2,5 fois) dans les cardiomyoblastes. Après 2 et 4 jours de carence, son expression se maintient à un niveau supérieur à celui mesuré dans les cellules contrôles, suggérant l'activation substantielle de ce facteur de transcription par une déficience en PDM dans des cellules cardiaques.

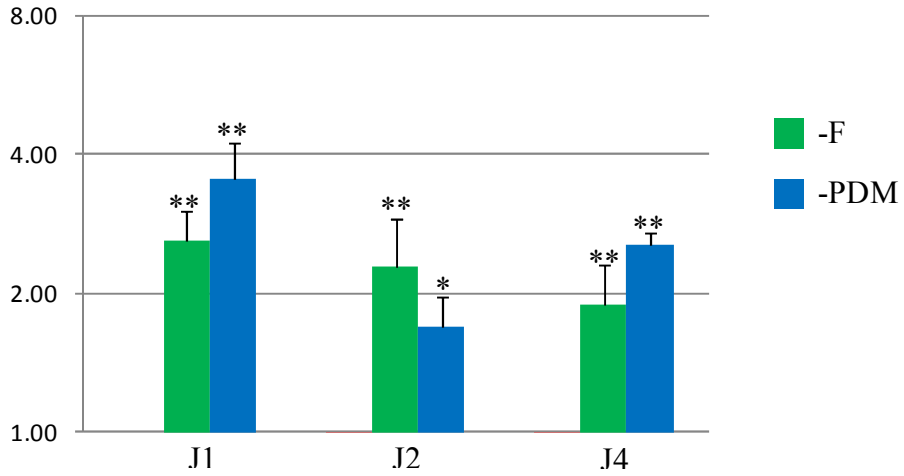


Figure 40 : Expression du gène *c-myc* au cours du temps dans des cellules cardiomyoblastiques H9c2 exposées à un milieu déficient en folates (-F) ou en 3 PDM (folates, vitamine B12 ou choline; -PDM).

III. 2. Evaluation du stress oxydant dans les cellules déficientes en folates ou en PDM

Dans le modèle animal, l'évaluation de la carbonylation totale des protéines a permis de mettre en évidence un stress oxydant dans le myocarde des ratons déficients en PDM. De ce fait et au vu des nombreuses publications ayant rapporté ce phénomène dans des conditions de carence en folates/vitamine B12 et/ou d'HHcy, il nous a paru important de l'évaluer dans les cardiomyoblastes carencés seulement en folates et en PDM. Pour cela, nous avons mesuré le stress oxydant mitochondrial par cytométrie en flux en utilisant le marqueur « MitoSOX » **(Figure 41)**.

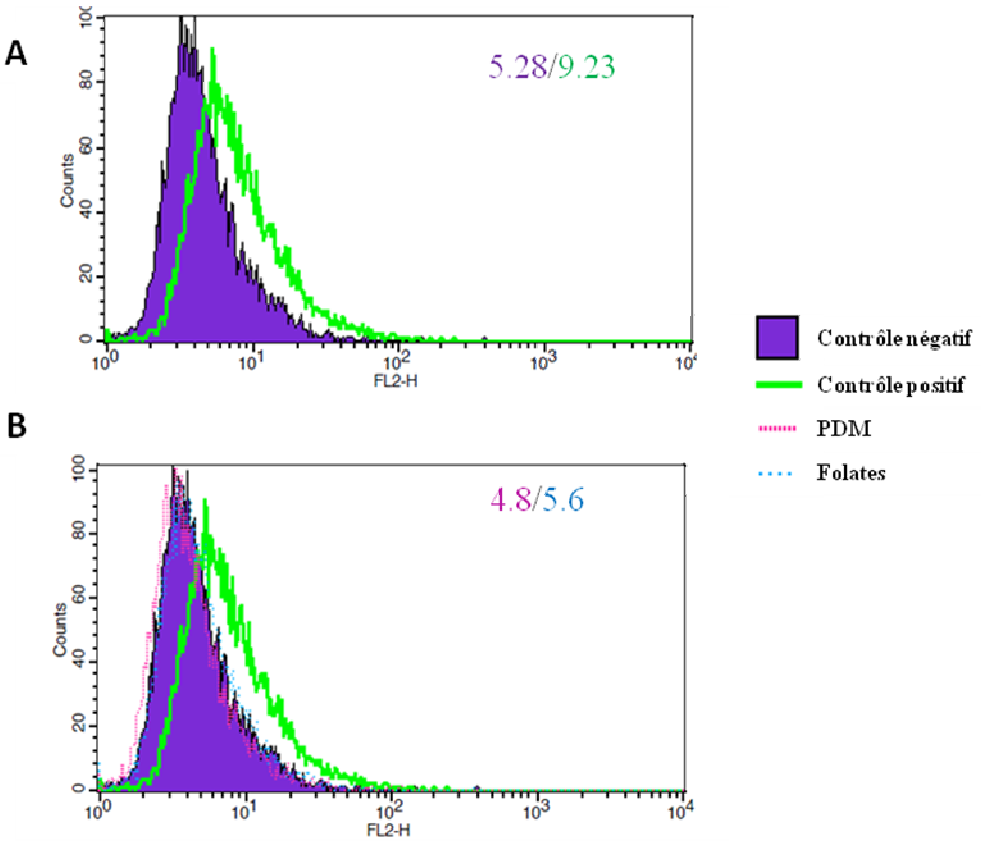


Figure 41 : Evaluation du stress oxydant dans les cellules H9c2 après 4 jours de carence en folates ou 3 PDM. En ordonnée : le % de cellules; en abscisse : l'intensité de fluorescence

Le contrôle négatif, correspondant à des cellules exposées au milieu contrôle, avait une fluorescence intracellulaire moyenne de 5,28 u.a (unité arbitraire) tandis que le contrôle positif, correspondant à des cellules soumises à un stress oxydant par exposition au tert-butyle (50 µM, 45min), avait une fluorescence moyenne de 9,23 u.a. Comparativement, la fluorescence moyenne émise par des cellules exposées durant 4 jours à un milieu déficient en 3 PDM et en folates était respectivement égale à 4,8 et 5,6, des valeurs similaires à celle du contrôle négatif. La conclusion de cette étude est que la déficience en PDM n'induirait pas de stress oxydant dans les cardiomyoblastes.

De plus, la mesure par RT-PCR de l'expression génique de 2 marqueurs de la réponse enzymatique au stress oxydant, SOD1 et SOD2, n'a indiqué aucune modification dans les cellules exposées à l'une ou l'autre des déficiences (résultats non illustrés). De même, la mesure de l'abondance de la protéine SOD1 par WB n'a montré aucune différence entre ces conditions et le contrôle **(Figure 42)**.

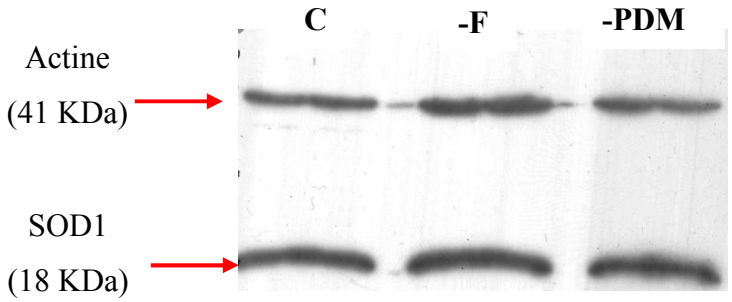


Figure 42 : Mesure de l'abondance protéique de la SOD1 après 4 jours de déficience en folates ou en 3 PDM.

Une déficience en folates ou en 3 PDM durant 4 jours n'induirait pas de stress oxydant dans les cellules H9c2.

III. 3. Evaluation de la capacité de méthylation des cellules déficientes en folates ou en PDM

Une méthode de dosage par CLHP de la SAM et de la SAH circulantes a été développée au laboratoire. Toutefois, des mesures réalisées sur des cellules H9c2 déficientes en folates ou en 3 PDM *vs* leurs contrôles n'ont malheureusement pas permis de tirer des conclusions claires sur leur capacité de méthylation respective **(Tableau 7)**. De nouveaux essais devront être réalisés.

Tableau 7 : Concentration de SAM et SAH dans les extraits de cellules contrôles et déficientes en 3 PDM ou folates.

	SAM (µM)	**SAM** (pmol/mg prot.)	**Moyenne SAM** (pmol/mg prot.)	SD	**SAH** (µM)	**SAH** (pmol/mg prot.)	**Moyenne SAH** (pmol/mg prot.)	SD
C	**0,476**	393	329	98	**0,143**	118	158	31
	0,173	206			**0,151**	180		
	0,338	294			**0,172**	150		
	0,278	421			**0,123**	186		
Sans Folates	**1,087**	523	542	193	**0,035**	17	18	1
	1,157	697			**0,032**	19		
	0.155	277			**0,011**	20		
	0,955	673			**0,025**	18		
Sans PDM	**0,348**	512	396	142	**0,016**	24	17	5
	0,27	375			**0,013**	18		
	0,346	494			**0,013**	19		
	0,258	203			**0,015**	12		

	Résultats validés : les spectres UV montrent clairement qu'il s'agit de SAH et/ou de SAM
	Résultats inexploitables : les spectres UV montrent qu'il y a une ou plusieurs autres molécules que la SAH sous le pic
	Résultats exploitables mais proches des limites de quantification

DISCUSSION GENERALE

Une déficience en folates, vitamine B12 et choline, et l'HHcy qui en résulte sont des facteurs du risque de développement de MCV. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les origines de cette association mais les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu sont encore mal connus. L'analyse protéomique constitue un outil particulièrement intéressant pour tenter de disséquer la complexité des interactions et mécanismes moléculaires mis en jeu. A ce jour, très peu d'études de ce type ont été réalisées pour comparer les impacts de la déficience en un ou plusieurs PDM, avec ou sans hyperhomocystéinémie, sur le tissu cardiaque, que ce soit chez l'animal ou sur des modèles de cellules en culture. Ceci a motivé les deux études qui ont été réalisées au cours de mon travail de thèse, la première sur le myocarde de ratons issus de mères déficientes en folates, vitamine B12 et choline, la seconde sur des cardiomyoblastes exposés au même type de déficience ou à une simple déficience en folates.

Les résultats de l'étude n°1 montrent qu'*in vivo* la déficience maternelle en 3 PDM induit des modifications de l'abondance de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et lipidique mais aussi dans d'autres processus tels que le stress oxydant ou du RE, liés aux MCV. Dans la deuxième étude, nous avons observé que la majorité des voies altérées *in vivo* par la déficience en 3 PDM l'étaient également *in vitro*. L'exposition de cardiomyoblastes à un milieu uniquement carencé en folates produisait sur certaines protéines cibles (notamment des protéines chaperones et de la réponse au stress du RE) des effets similaires à la carence en 3 PDM, mais suggérait aussi des différences au niveau de l'impact des 2 conditions sur le protéome cellulaire.

I. Effets de la déficience en PDM sur le protéome cardiaque

Notre première étude protéomique a été réalisée sur des échantillons de cœur de ratons de 21 jours déficients en PDM et présentant une HHcy modérée (30 µM) comparativement à des ratons contrôles ayant un statut en PDM et une homocystéinémie (5 µM) normaux. L'équipe INSERM U954 qui a développé ce modèle, a observé une hypertrophie du ventricule gauche chez les animaux déficients en PDM (Garcia et al., 2011). Des études chez des femmes et leurs nouveaux-nés avaient par ailleurs rapporté qu'une déficience en vitamine B12 ainsi qu'une hyperhomocytéinémie chez la mère pendant la grossesse conduisait à un risque 2 fois plus élevé de cardiopathie congénitale (Verkleij-Hagoort *et al.,* 2006a; Verkleij-Hagoort *et al.,* 2006b).

Notre analyse protéomique *in vivo* chez le raton a permis d'identifier une variété de protéines du myocarde affectées par la déficience maternelle en PDM et d'identifier des voies métaboliques susceptibles d'être perturbées et de contribuer ainsi à la dysfonction cardiaque. Plus précisément, 39 protéines avaient leur abondance significativement modifiée par cette condition relativement à la condition contrôle. En utilisant l'outil d'analyse bio-informatique Ingenuity, nous avons montré que 34 d'entres-elles appartenaient à un réseau métabolique en relation avec une « perturbation du développement cardiaque et une altération cellulaire et du métabolisme lipidique ».

Nos résultats ont montré notamment que l'abondance du peptide natriurétique de type A (ANP) était augmentée dans le myocarde des ratons déficients en PDM. Ceci est en accord avec l'étude de Garcia *et al.* (2011) qui montrait une élévation du niveau plasmatique du BNP dans le même modèle. Ces 2 protéines sont considérées comme des indicateurs du risque de nouveaux évènements cardiovasculaires et de décès chez des patients relevant d'un infarctus du myocarde (Retterstol *et al.*, 2001). Les concentrations plasmatiques de l'ANP et du BNP sont également augmentées en cas d'insuffisance cardiaque (Washio *et al.*, 2011) ou de sténose (Nishikimi *et al.*, 2004). Des études de populations ont aussi montré l'existence d'associations entre l'homocystéinémie, l'insuffisance et l'hypertrophie cardiaque et le BNP (Gueant-Rodriguez *et al.*, 2007; Herrmann *et al.*, 2007b).

Outre l'ANP, plusieurs des protéines révélées par nos analyses protéomiques, que ce soit *in vivo* sur le myocarde des ratons ou *in vitro* sur notre modèle de cardiomyoblastes en culture (étude 2), ont été rapportées comme « biomarqueurs » dans diverses pathologies cardiovasculaires **(Tableau 8)**.

Tableau 8 : Exemple d'études protéomiques identifiant des protéines « marqueurs » de pathologies cardiovasculaires.

Etudes	Protéines "marqueurs"	Echantillons utilisés	Techniques de protéomiques utilisées
Scheler *et al.*, 1999	Hsp 27	***Etude chez l'homme :*** coeurs normaux (n=7) et coeurs altérés (cardiomyopathie n=6 ou ischémie n=5)	2-DE puis immunoblot (pour identifier Hsp27)
Agnetti *et al.*, 2008	Desmin, CRYAB, Hsp 60, GRP 75	***Etude cellulaire :*** cultures primaires de cardiomyocytes néonatales de rats traitées avec de l'endothéline-1 pendant 48h (modèle *in vitro* d'hypertrophie de cellules cardiaques)	2-DE puis MS (MALDI TOF et LC/MS-MS)
Clemente-Bernard *et al.*, 2008	Glycéraldehyde-3-phosphate déhydrogenase, CRYAB, Péroxiredoxine 2, isocitrate deshydrogénase	***Etude chez le rat :*** coeurs de rats insuffisants cardiaques induit par une ligature de l'artère coronaire gauche (n=4) pendant 2 mois vs contrôles (n=4)	2-DE puis MALDI TOF
Urbonavicius *et al.*, 2009	Enzymes mitochondriales	***Etude chez l'homme :*** biopsies de 9 patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique stable (n=9) subissant un pontage coronarien, et de patients ayant une transplantation cardiaque (n=4). Les régions où la fonction contractile est conservée servent de témoins.	2-DE puis LC/MS-MS
Wei *et al.*, 2009	Hsp 70	***Etude chez l'homme :*** Patients avec une insuffisance cardiaque (n=8) vs coeurs sains (n=8)	2-DE puis MALDI TOF
Bergquist *et al.*, 2012	CRYAB, myosine, actine, desmine	***Etude chez l'homme :*** Patients avec maladie de la valve aortique (n=10) ou maladie coronarienne (n=10). Chaque groupe est le contrôle de l'autre.	LC-MALDI-TOF/TOF

L'ensemble des protéines identifiées *in vivo* et *in vitro* peuvent être classées en 3 groupes fonctionnels :

- ✔ *Protéines du cytosquelette*
- ✔ *Protéines associées au métabolisme énergétique*
- ✔ *Protéines associées à des réactions de stress*

Nos observations sont en ce sens cohérentes avec celles d'autres études, chez l'animal ou chez l'Homme, montrant une altération de ces 3 importantes fonctions au cours de pathologies cardiovasculaires (McGregor *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2012). La déficience en PDM et l'HHcy qui lui est associée *in vivo*, pourraient donc conduire à un dysfonctionnement de la contraction cardiaque par réduction de l'apport énergétique et l'induction d'un stress oxydant et/ou du RE au niveau cellulaire. Convergents sur un grand nombre de points, nos résultats *in vivo* et *in vitro* – notamment ceux des analyses protéomiques – suggèrent toutefois quelques différences. Par exemple, l'altération de protéines intervenant dans la réponse au stress

oxydant observée dans le myocarde de ratons déficients en PDM et hyperhomocystéinémiques n'a pas été retrouvée dans des cardiomyoblastes exposés à une condition similaire.

II. Induction d'un stress oxydant par une déficience nutritionnelle en PDM *in vivo*

L'induction d'un stress oxydant par l'HHcy et l'effet protecteur des PDM contre celui-ci ont été rapportés par plusieurs études tant *in vivo* que *in vitro* (Moreira *et al.*, 2011; Tyagi *et al.*, 2011). Une déficience en PDM, principalement en folates, peut altérer le statut redox du foie et du cœur chez le rat notamment (Chanson *et al.*, 2005; Chanson *et al.*, 2007; Pogribny *et al.*, 2012).

Plusieurs résultats de notre étude *in vivo* démontrent la présence d'un stress oxydant dans le myocarde des ratons déficients en PDM. D'une part, le niveau total de carbonylation des protéines, la principale MPT oxydative, était augmenté. D'autre part, notre analyse protéomique a mis en évidence une augmentation de l'abondance d'enzymes de la réponse anti-oxydante, la SOD1 et la peroxyredoxine 3. Ce résultat suggère que des mécanismes de compensation ont été activés pour contrecarrer une production anormale d'ERO. L'induction d'un stress oxydant par la déficience en PDM *in vivo* peut s'expliquer par différents mécanismes. Tout d'abord, l'HHcy générée pourrait contribuer à la formation d'ERO comme cela a été montré dans des cultures *ex vivo* de cardiomyocytes de souris génétiquement modifiées (Wang *et al.*, 2012b), *in vitro* dans des cellules endothéliales aortiques humaines (Moreira *et al.*, 2011) ou encore *in vivo* chez l'animal après consommation d'un régime enrichi en méthionine et/ou déficient en un ou plusieurs PDM (Au-Yeung *et al.*, 2004). L'association d'un stress oxydant avec une déficience en folates et vitamine B12, et l'HHcy a également été rapportée chez l'Homme (Al-Maskari *et al.*, 2012). Certains auteurs suggèrent que les folates, vitamine 12 et choline, pourraient agir comme des anti-oxydants. Leur déficience conduirait, de ce fait, à un déséquilibre pro-oxydant. *In vivo* chez l'animal et l'Homme et *in vitro* sur des cultures cellulaires, une supplémentation en cobalamine ou en folates semble capable de diminuer la production d'ERO (Birch *et al.*, 2009; Tyagi *et al.*, 2011).

Le stress oxydant que nous avons mis en évidence dans le myocarde de ratons déficients en PDM pourrait contribuer au développement d'une pathologie cardiaque chez ces animaux. Une augmentation de la carbonylation de protéines plasmatiques a été déterminée chez des

patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Cameron *et al.*, 2006) ou après un infarctus du myocarde (Mocatta *et al.*, 2007). Une réduction de la carbonylation des protéines mitochondriales pourrait, à l'inverse, contribuer à la cardioprotection ou limiter l'évolution du fonctionnement cardiaque vers les processus pathologiques (Khaliulin *et al.*, 2007). Plus récemment, des auteurs ont identifié l'actine et la créatine kinase comme des cibles importantes du processus de carbonylation protéique dans le cœur de patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique (Brioschi *et al.*, 2012). Ces 2 protéines ont un rôle majeur, respectivement, dans la structure cardiaque et la phosphorylation de la créatine en créatine phosphate qui constitue une réserve d'énergie clé pour le fonctionnement du cœur. Or, s'il est reconnu que les dommages oxydatifs des protéines ont des répercussions sur leur(s) fonction(s) cellulaire(s) (Berlett *et al.*, 1997), les mécanismes de cette association, ainsi que ses conséquences sur la physiopathologie cardiaque, ne sont pas encore clarifiés. Le rôle de telles MPT d'enzymes ou de protéines structurales a notamment été invoqué assez tôt, dans l'athérosclérose (Steinberg *et al.*, 1989). Parmi les protéines que nous avons identifiées dans l'analyse protéomique *in vivo*, certaines sont connues pour leur sensibilité à la carbonylation. Par exemple, le HNE peut ainsi inactiver l'IDH3 mitochondriale, une enzyme clé du métabolisme énergétique du myocyte (Benderdour *et al.*, 2003). De même, l'ACO2, une autre enzyme du cycle de Krebs, et NDUFV2 présentent dans leur structure un centre riche en fer et en soufre qui les rend très sensible à l'oxydation (Bulteau *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011). Cette caractéristique structurale pourrait expliquer la réduction de leur abondance dans le myocarde des ratons déficients en PDM. D'autres protéines de structure ou ayant une activité de type chaperone, comme la vimentine, la tropomyosine et GRP75, semblent également sensibles à la carbonylation (Hung *et al.*, 2009).

En revanche, nos mesures des ARNm des SOD1 et 2, et de l'abondance de la protéine SOD1, n'ont indiqué aucune variation de l'expression de ces enzymes de la réponse anti-oxydante dans des cardiomyoblastes de la lignée H9c2 carencés en folates ou en 3 PDM. De plus, nos analyses par cytométrie en flux en présence d'un agent fluorescent spécifiquement oxydé par une production mitochondriale d'O_2^- démontrent l'absence d'un tel stress oxydant dans les cellules soumises à l'une ou l'autre des déficiences. Ces observations sont en opposition avec certaines données de la littérature montrant, par exemple, une augmentation de la libération d'ERO par des cardiomyocytes de rat exposés *ex vivo* à de fortes concentrations d'Hcy (Duthie *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012b). Cette différence dans les résultats pourrait être liée à nos conditions expérimentales. En effet, les quantités d'Hcy produites par les

cardiomyoblastes H9c2 déficients en PDM sont faibles, en comparaison de celles que les auteurs de nombreuses publications ajoutent directement au milieu extracellulaire. De plus, une durée d'exposition supérieure à 4 jours permettrait très probablement d'augmenter les effets de la déficience en PDM sur le métabolisme des cardiomyoblastes. Cependant, l'intérêt de notre modèle est qu'il permet de révéler des événements cellulaires précoces induits par ces conditions nutritionnelles.

III. Fonctions altérées par la déficience en PDM dans le myocarde *in vivo* et dans les cardiomyoblastes *in vitro*

III. 1. Métabolismes énergétique et lipidique

L'analyse protéomique a révélé que 39% des protéines myocardiques altérées par la déficience en PDM chez le raton jouaient un rôle dans la production énergétique et le métabolisme lipidique. Ces résultats sont en accord avec l'observation antérieure d'une altération de la β-oxydation mitochondriale et d'une accumulation tissulaire de lipides dans le même modèle (Garcia *et al.,* 2011). Notre étude a mis en relief une diminution d'abondance pour plusieurs protéines mitochondriales impliquées dans ces processus telles que l'acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte (SCAD) et l'enzyme trifonctionnelle (HADHA). Les acyl-CoA deshydrogénases enlèvent 2 atomes d'hydrogène des carbones α et β de l'acyl-CoA avec réduction de son coenzyme, le FAD en FADH2 qui est ré-oxydé au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Fait intéressant, nous avons également montré par notre analyse protéomique in vitro que la protéine Etfa (electron transfer flavoprotein) qui sert d'accepteur d'électrons spécifique des acyl-CoA déshydrogénases a son abondance diminuée dans des cardiomyoblastes déficients en 3 PDM et produisant anormalement de l'Hcy. Ces deux protéines sont étroitement liées ; il a en effet été montré qu'une déficience de la protéine Efta entraîne une diminution de l'activité acyl-CoA déshydrogénase pouvant conduire à une pathologie rare caractérisée notamment par une hypertrophie ventriculaire (Schiff *et al.,* 2006; Singla *et al.,* 2008). Quant à la HADHA, elle catalyse les trois étapes finales de la β-oxydation mitochondriale des AG. Une diminution de son expression peut donc fortement altérer ce processus. L'observation d'une diminution de l'abondance de NDUFV2 et NDUFA10 est en adéquation avec l'altération de l'activité myocardique des complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale mise en évidence dans une autre étude chez le raton déficient en PDM (Garcia *et al.*, 2011). De plus, la diminution de

l'abondance de ces 2 protéines, ainsi que de la SCAD et de la HADHA, semble liée à celle de l'expression d'ERRα et de PPARα et à l'altération de la méthylation et de l'acétylation de PGC-1α, en association avec l'hypertrophie cardiaque observée chez les mêmes ratons (Garcia *et al.*, 2011). Enfin, l'altération de l'abondance des protéines HADHA, SCAD et NDUFA10 a été associée avec l'apparition d'une hypertrophie cardiaque chez des rats hypertendus (Zhou *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2009).

L'expression augmentée de FABP3 pourrait aussi contribuer au développement de complications cardiovasculaires par la déficience en PDM et l'HHcy. Cette protéine intervient dans le transport des AG vers la mitochondrie en vue de leur oxydation. L'augmentation de sa concentration plasmatique est considérée comme un indicateur de lésions cardiaques chez le rat (Hasic *et al.*, 2011). Parallèlement à l'altération du transport des lipides et de la β-oxydation, la concentration de l'enzyme clé de la glycolyse, la β-énolase (ENO3), était augmentée dans le myocarde des ratons déficients en PDM. ENO3 catalyse la conversion du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate, l'avant-dernière étape de la glycolyse, avant la formation de pyruvate qui entre dans le cycle de Krebs. La diminution de la β-oxydation et l'augmentation de l'utilisation du glucose, observées dans notre modèle, ont été associées à l'insuffisance cardiaque (Huss *et al.*, 2005) et la régulation de ces voies métaboliques est maintenant considérée comme une potentielle cible thérapeutique (Jaswal *et al.*, 2011). Enfin, l'abondance accrue des apolipoprotéines APOA1 et APOE, observée dans le myocarde des ratons déficients en PDM, n'est pas en accord avec la majorité des données de la littérature. Il a par exemple été rapporté une diminution des concentrations plasmatiques d'APOA1 chez des souris MTHFR$^{-/-}$ hyperhomocsytéinémiques, ainsi que chez des patients atteints de maladie coronarienne (Mikael *et al.*, 2006). Néanmoins, certaines évidences expérimentales soutiennent que l'augmentation des niveaux des protéines APOA1 et APOE pourrait constituer une réponse cardioprotectrice (Yancey *et al.*, 2007).

III. 2. Altération de la structure du cœur et des cardiomyoblastes

La déficience en 3 PDM affecte différentes protéines intervenant dans la structure du muscle cardiaque et des cardiomyoblastes. *In vivo*, nous avons en effet mis en évidence une diminution de l'abondance des myosines MYL2 et MYL4, de l'α-tropomyosine, de la troponine 2 et, en parallèle, une augmentation de celle de la destrine et de la troponine C. *In vitro*, nous avons observé qu'après 4 jours de déficience en 3 PDM, les abondances de la caldesmone et de la moesine étaient augmentées. En revanche, une durée identique de

déficience en folates, sans production anormale d'Hcy, s'est révélée sans effet sur les protéines structurales des cardiomyoblastes. Le remodelage des organites tels que le sarcolemme, le réticulum sarcoplasmique, les mitochondries et les myofibrilles est un élément clé dans le développement de l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque (Dhalla *et al.*, 2009). L'altération de l'expression de protéines structurales a régulièrement été impliquée dans le développement de MCV (Komamura *et al.*, 2004). La déficience en PDM (folates, vitamine B12 et choline) et l'augmentation de la production d'Hcy pourraient donc contribuer à la pathologie cardiaque en affectant des protéines importantes pour le maintien du cytosquelette (Lee *et al.*, 2000).

III. 3. Activation de protéines chaperones

Nos études *in vivo* et *in vitro* ont aussi montré que l'abondance de plusieurs protéines chaperones était modifiée par une déficience en folates ou en 3 PDM. *In vivo*, le niveau protéique de Hspd1, Hsp27, Hsp9 (GRP75) et Hspb2 était augmenté dans le myocarde des ratons déficients en PDM. Ces Hsp auraient un rôle cardioprotecteur majeur du fait de leur activité de chaperone facilitant le repliement intra- et inter- protéines, la réparation ou la dégradation des protéines malformées (Agashe *et al.*, 2000). Par exemple, Hspd1 serait impliquée dans le « pliage » de la structure tridimensionnelle de la SCAD dont l'abondance était diminuée dans le myocarde des ratons déficients en 3 PDM (Bross *et al.*, 2007). Une activation des Hsp a par ailleurs, été rapportée au cours de l'ischémie (Truettner *et al.*, 2009) et de l'insuffisance ou de l'hypertrophie cardiaque (Wei *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011). L'expression de Hsp27 a été trouvée inversement corrélée avec les complications des plaques d'athérosclérose (Martin-Ventura *et al.*, 2004). Des Hsp semblent aussi être liées à l'ANP et au BNP. Ainsi, la transfection de cardiomyocytes avec le gène codant la protéine chaperone HSPB8 entraîne leur hypertrophie parallèlement à une augmentation de l'expression des gènes *anp* et *bnp* (Depre *et al.,* 2002). Or, HSPB8 interagit avec la protéine Hsp27 (aussi nommée HSPB1), ce qui suggère que l'augmentation de l'abondance de cette dernière dans le myocarde des ratons déficients en PDM pourrait jouer un rôle dans la variation identique du niveau de l'ANP. En outre, les Hsp pourraient également participer, *via* la modulation du niveau de glutathion, à la protection contre le stress oxydant induit par la déficience en PDM et l'HHcy associée (Kalmar *et al.*, 2009). En effet, chez des souris dont les gènes *cryab* et *Hsp27* ont été invalidés, la concentration cardiaque du glutathion était diminuée de 43% relativement à celle mesurée chez des souris sauvages (Morrison *et al.*, 2004). Des

observations similaires ont été faites chez des souris KO pour le facteur de transcription 1, indispensable à l'expression de certaines Hsp dont CRYAB (Yan *et al.*, 2002). L'abondance de cette dernière était diminuée à la fois dans le myocarde des ratons déficients en 3 PDM et dans les cardiomyoblastes cultivés dans un milieu sans folates ou sans les 3 mêmes PDM. Une telle observation n'avait jamais été rapportée antérieurement.

CRYAB est l'Hsp la plus importante et la plus abondante dans les cardiomyocytes (Kumarapeli *et al.*, 2004). Elle peut interagir directement avec l'actine, notamment dans les H9c2 durant un stress du RE afin de stabiliser le cytosquelette et les myofilaments contractiles (Verschuure *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2007). La mutation du gène *cryab* conduisant à l'altération de la desmine, un constituant majeur des myofilaments, est liée à une myopathie chez l'homme et la souris (Vicart *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001b). Ceci se traduit par une dysfonction contractile et plus tardivement une insuffisance cardiaque. Il a été rapporté par ailleurs, que des souris KO pour *cryab* et *hspb2* développaient une hypertrophie cardiaque et avaient une concentration plasmatique de l'ANP augmentée (Kumarapeli *et al.*, 2008). Il semble que la protéine CRYAB aurait un rôle primordial dans ces altérations puisque des souris KO pour *hspb2* ne présentaient aucune anomalie de ce type à la différence de celles KO pour *cryab*. L'observation d'un effet cardioprotecteur de la surexpression de CRYAB va dans le même sens (Kumarapeli *et al.*, 2008; Kumarapeli *et al.*, 2010). Au vu de ces différentes données bibliographiques, la modification des niveaux de l'ARNm et de la protéine CRYAB pourrait jouer un rôle important dans l'altération cardiaque provoquée par une déficience en PDM.

Une autre protéine chaperone, la prohibitine, s'est révélée particulièrement intéressante dans le modèle cardiaque de déficience en PDM. Elle est impliquée dans divers processus cellulaires telles que la prolifération ou l'apoptose (Coates *et al.*, 2001). Elle est particulièrement abondante dans le cœur, et se trouve localisée principalement dans la membrane interne mitochondriale. Elle forme un complexe de 2 sous-unités, PHB1 et PHB2. La surexpression de la PHB dans des cellules H9c2 inhibe la mort cellulaire et contrecarre la baisse du potentiel de membrane mitochondriale induite par l'hypoxie (Muraguchi *et al.*, 2010). L'augmentation de l'expression de la PHB serait également, un indicateur de la survie cellulaire (Theiss *et al.*, 2007; Artal-Sanz *et al.*, 2009b). Ceci pourrait contribuer à expliquer l'absence d'apoptose et la viabilité inchangée des cardiomyoblastes exposés aux milieux déficients en folates ou en 3 PDM. Une seule publication semble faire un lien entre l'Hcy et la PHB. Il s'agit d'une analyse du protéome de cellules aortiques musculaires lisses mises en

condition d'hyperhomocystéinémie traitées ou pas (contrôles) avec un extrait végétal riche en polyphénols. L'abondance de la PHB, de même que la formation d'ERO, était diminuée dans les cellules traitées comparativement à leurs contrôles (Hung *et al.*, 2009). La PHB pourrait donc jouer un rôle dans la réponse au stress oxydant. Il a été ainsi montré que la surexpression de PHB1 protège des cardiomyocytes en culture des dommages oxydatifs induit par l'H_2O_2, notamment au niveau de la perméabilité de la membrane mitochondriale (Liu *et al.*, 2009). Des expériences similaires ont montré une augmentation de l'expression des niveaux d'ARNm et protéique des glutathion transférases dans des cellules intestinales en culture (Theiss *et al.*, 2007). La possibilité d'un tel rôle de la PHB dans la réponse anti-oxydante est à relier à l'augmentation de son abondance dans le myocarde des ratons déficients en PDM et hyperhomocystéinémiques. Néanmoins, notre étude sur les cellules H9c2 montre une expression augmentée de la PHB malgré l'absence d'un stress oxydant.

Un rôle de protéine chaperone a également été proposé pour la PHB. En effet, le complexe PHB1/2 pourrait aider à l'assemblage des sous-unités de la chaîne de transport mitochondrial des électrons (Artal-Sanz *et al.*, 2009a) et les protégerait de la protéolyse (Nijtmans *et al.*, 2000). L'augmentation d'abondance de la PHB dans le myocarde des ratons déficients en PDM pourrait ainsi participer au processus de remaniement des mitochondries afin d'en maintenir la morphologie et la fonction (Garcia *et al.*, 2011; Theiss *et al.*, 2011). De plus, la PHB interagirait directement avec certaines sous-unités de la cytochrome c oxydase (COX), une protéine mitochondriale que nous avons également identifiée comme altérée par la déficience en PDM *in vivo*. En effet, il a été rapporté que la PHB permettrait de maintenir l'activité de COX et l'expression de son ARNm (Tsutsumi *et al.*, 2009). La PHB interagirait aussi avec la phosphatidyléthanolamine et la cardiolipine, un lipide très abondant dans la membrane interne mitochondriale, impliquée dans le contrôle de sa perméabilité aux protons et particulièrement important au niveau cardiaque (Osman *et al.*, 2009).

La PHB1 pourrait également altérer le fonctionnement du cycle de Krebs en inhibant la pyruvate carboxylase qui intervient dans la formation d'oxaloacétate à partir de pyruvate (Vessal *et al.*, 2006). Il a même été proposé que la PHB pourrait être impliquée dans la réorientation du métabolisme énergétique en faveur de la glycolyse anaérobie au détriment de la phosphorylation oxydative (Vessal *et al.*, 2006). En effet, la PHB serait une cible du facteur de transcription *c-myc* (Haggerty *et al.,* 2003), lequel contribue à l'expression de gènes d'enzymes glycolytiques telle que l'énolase (Osthus *et al.*, 2000), identifiée dans notre étude protéomique *in vivo*. La PHB pourrait donc jouer un rôle important dans le fonctionnement

énergétique cardiaque. En outre, l'utilisation de l'outil bio-informatique IPA *(Cf. résultats complémentaires)* nous a révélé que l'expression de plusieurs des protéines identifiées *in vivo* était sous le contrôle de C-MYC. De plus, le niveau de l'ARNm de *c-myc* était augmenté dans les cardiomyoblastes dès le premier jour de déficience en folates ou en PDM. Ces deux conditions de déficience pourraient donc activer ce facteur de transcription notamment capable de réguler l'expression de protéines à activité chaperone comme PHB. Des auteurs ont montré que C-MYC pouvait se fixer directement sur le promoteur du gène *phb* (Menssen *et al.,* 2002). Une étude a même montré que la déficience en choline pourrait induire une hypométhylation de *c-myc* conduisant à sa surexpression dans le foie de rats (Tsujiuchi *et al.*, 1999). C-MYC pourrait donc être une cible de l'effet cellulaire de la choline mais également de la bétaine et de l'acide folique (Du *et al.*, 2009; Chagas *et al.*, 2011). De plus, l'expression du gène c-myc est très faible dans le cœur adulte sain et augmente en cas d'hypertrophie (Pollack *et al.*, 1994). Il a même été rapporté que l'induction de l'expression de *c-myc* peut conduire à une cardiomyopathie hypertrophique sévère suivie d'un dysfonctionnement ventriculaire et finalement à la mort par une insuffisance cardiaque congestive (Dzimiri *et al.*, 2004). C-MYC pourrait donc être un lien moléculaire possible entre la déficience en PDM et la modulation de l'expression de certains gènes et protéines identifiés dans nos analyses protéomiques. Enfin, l'expression de la PHB pourrait être contrôlée par la SAM. Celle-ci était en effet, diminuée dans des hépatocytes isolés de souris KO pour la SAM synthétase, alors que la restauration du niveau intracellulaire de SAM permettait le retour à un niveau normal d'expression de la protéine (Santamaria *et al.*, 2003). Les résultats de nos dosages de la SAM et la SAH dans les cellules H9c2 ne nous ont malheureusement, pas permis de déterminer si leur capacité de méthylation était affectée après 4 jours de déficience en folates ou 3 PDM. Cependant, le ratio SAM/SAH dans les myocardes de ratons que nous avons utilisé dans l'étude n°1, était altéré par la déficience en 3 PDM, conduisant à des modifications d'expression génique et protéique (Garcia *et al.*, 2011). Une carence en PDM se traduit fréquemment chez l'Homme par une perturbation de ce ratio au niveau plasmatique (Guerra-Shinohara *et al.*, 2004; Guerra-Shinohara *et al.*, 2007).

III. 4. Induction d'un stress du RE

La déficience en folates ou en PDM induit un stress du RE. L'augmentation, d'une part, de la carbonylation de protéines et, d'autre part, de l'expression de protéines chaperones dans le myocarde de ratons déficients en PDM suggèrent une quantité accrue de protéines

malformées dans le tissu. Outre les chaperones, la famille des PDI joue un rôle important dans la mise en place de la structure tertiaire des protéines et particulièrement, la formation de ponts disulfures dans le RE (Laurindo *et al.,* 2012). Ces isomérases comme les chaperones, auraient des propriétés protectrices au cours d'une ischémie chez l'homme et la souris (Severino *et al.,* 2007; Vekich *et al.,* 2012). Nos études in vivo et in vitro ont mis en évidence une modification de l'abondance de, respectivement, PDIA3 et 4 après une déficience en PDM, suggérant que les cellules cardiaques nécessiteraient alors des quantités plus importantes de ces protéines dans cette condition. L'accumulation et l'agrégation de protéines malformées dans la lumière cause une surcharge du RE et conduit à un stress (Lee do *et al.,* 2010). Cette surcharge est néfaste pour la cellule et doit être contrée afin d'éviter la mort. C'est dans ce but que la voie UPR est activée spécifiquement par le stress du RE (Jager et al., 2012). La réponse UPR consiste en l'activation de PERK, ATF6 et IRE-1 et a pour but d'augmenter la capacité de repliement et de maturation des protéines via la synthèse accrue de chaperones. Lorsque la voie UPR ne réussit pas à palier la surcharge du RE, l'apoptose est induite provoquant la mort cellulaire. L'activation du stress du RE et de la voie UPR a été retrouvée chez des souris avec hypertrophie cardiaque (Okada *et al.,* 2004) et chez l'Homme souffrant d'insuffisance cardiaque (Fu *et al.,* 2010a). Comme décrit dans la revue bibliographique, une déficience en PDM pourrait conduire au stress du RE via une production excessive d'Hcy. Une augmentation de l'expression de BiP (GRP78) a été rapportée dans un modèle d'HHcy modérée chez la souris nourrie avec un régime enrichi en méthionine et pauvre en folates et vitamines B12 et B6 (Alessio *et al.,* 2011). In vitro, des concentrations élevées d'Hcy altèrent l'expression des gènes atf4 et atf6 (Outinen *et al.,* 1999; Zhang *et al.,* 2012c) et l'expression des protéines GRP75, IRE-1, ATF4 et CHOP (Park *et al.,* 2012). La voie IRE-1 de l'UPR pourrait être activée dans cette condition afin d'augmenter l'expression de la MTHFR et ainsi réduire l'HHcy (Leclerc *et al.,* 2008). Nos résultats corroborent ces différentes observations puisque la déficience en PDM associée à l'augmentation de l'Hcy conduisait à un stress du RE dans nos modèles in vivo et in vitro. Ils montrent néanmoins que la déficience en folates seule, sans production cellulaire anormale d'Hcy, semble également capable de générer un stress du RE puisque les niveaux des ARNm de chop, bip et atf6 étaient augmentés. Nos résultats suggèrent donc que la déficience en folates et en PDM pourrait conduire à une accumulation de protéines malformées et donc à un stress du RE jouant un rôle important dans le développement des MCV.

III. 5. Induction du système de dégradation protéasome-dépendant

L'accumulation de protéines malformées et le stress du RE conduisent à l'activation et l'augmentation du système ubiquitine-protéasome dépendant (Demasi *et al.*, 2012). Les protéines de la réponse au stress du RE constituent un système de contrôle qualité des protéines synthétisées, pouvant également faciliter leur dégradation lorsqu'elles sont malformées par la voie dénommée ERAD (ER associated degradation). Nos résultats *in vitro* montrent que cette voie est activée par la déficience en folates et en PDM. L'expression des ARNm de deux E3 ligases, Hrd1, appartenant au complexe de dégradation ERAD (Schulze *et al.*, 2005) et Mafbx était effectivement augmentée. Les protéines ainsi ciblées doivent être polyubiquitinylées avant leur dégradation par le protéasome 26S. Par exemple, l'actine carbonylée pourrait être dégradée par cette voie au cours d'une ischémie cardiaque (Divald *et al.*, 2006). Il a été également observé que des protéines ubiquitinylées s'accumulaient dans le cœur lors d'une défaillance cardiaque chez l'Homme (Tsukamoto *et al.*, 2006). Une activation du protéasome a aussi été observée dans le développement de l'hypertrophie cardiaque (Schlossarek *et al.*, 2012). Dans l'étude *in vivo*, nous avons mis en évidence une augmentation de l'abondance de la sous-unité 26S du protéasome (Psmd13) dans le myocarde des ratons déficients en PDM, suggérant une activation de la voie de dégradation des protéines. Ce processus est à relier à l'augmentation du niveau total de la carbonylation des protéines que nous avons également pu mesurer dans le tissu cardiaque, et qui constitue un marquage irréversible des protéines devant être éliminées par le système protéolytique. La déficience en PDM pourrait donc conduire à l'activation du système de dégradation protéasome-dépendant.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. Conclusion générale

L'objectif principal de mes recherches était d'étudier les effets de la déficience en PDM sur le protéome cardiaque. Des analyses différentielles *in vivo* et *in vitro* m'ont permis d'observer un certain nombre de réponses biologiques, du cœur ou de cardiomyoblastes en culture, à une déficience en folates ou en 3 PDM (folates, vitamine B12 et choline). Il s'agit pour l'essentiel d'une altération de la structure cellulaire, des métabolismes lipidiques et énergétiques et de l'état d'équilibre antioxydant/oxydant, ainsi que d'une induction de la réponse au stress du RE. Les molécules communes identifiées dans les 2 études sont principalement des protéines ayant une activité de type chaperone contribuant à la bonne conformation des protéines synthétisées. Dans les cardiomyoblastes, l'induction du stress du RE était mesurable dès les premiers jours de carence en folates ou en PDM. Enfin, nos données suggèrent que ce phénomène s'accompagne d'une activation du système de dégradation protéolytique dépendant de l'ubiquitine et du protéasome.

II. Perspectives

II. 1. Stress du RE et du système de dégradation des protéines protéasome-dépendant

Pour approfondir les mécanismes de l'effet de la déficience en PDM et de l'HHcy sur le stress du RE, il conviendrait de rechercher si les modifications d'expression de gènes observées dans notre étude n°2 s'accompagnent effectivement d'une augmentation du niveau et de l'activité des protéines correspondantes, CHOP, BiP et ATF6 dans les cardiomyoblastes H9c2. Des western blot des protéines CHOP et BiP ont déjà été réalisés mais n'ont donné aucun résultat pour le moment. Plusieurs anticorps ont été utilisés mais aucun ne permet de mettre en évidence les protéines CHOP et BiP dans les cardiomyoblastes. Ensuite, il faudrait évaluer si les autres voies de la réponse UPR : PERK et IRE1 sont également activées par la déficience en folates ou PDM dans les mêmes cellules. Enfin, nos études *in vivo* et *in vitro* ayant respectivement montré une augmentation de l'abondance de la protéine Psmd13 (sous-unité 13 du protéasome 26S) et des ARNm d'E3 ligase, la possibilité d'une activation de cette voie de dégradation protéolytique devra être confirmée par la mesure de l'activité du protéasome.

II. 2. Implication de C-MYC et de la méthylation dans l'expression génique

Les réseaux métaboliques révélés par l'analyse IPA de nos données de protéomique suggéraient l'implication de C-MYC dans les changements d'expression de plusieurs protéines identifiés comme cibles de la déficience en PDM *in vivo* ou *in vitro*. La protéine C-MYC pourrait notamment se lier directement au promoteur du gène de la prohibitine. *In vitro*, nous avons démontré l'induction du gène *c-myc* dès le premier jour de carence des cardiomyoblastes en PDM ainsi qu'en folates. Au vu de ces résultats et de la littérature, *c-myc* serait d'une part, une cible des donneurs de méthyles et d'autre part, impliqué dans les pathologies cardiaques. Il serait donc intéressant d'évaluer si l'expression des gènes codant des protéines modulées par la déficience en PDM, comme PHB et CRYAB, est sous le contrôle du facteur de transcription C-MYC dans notre modèle cellulaire. Enfin, la mise au point du dosage CLHP de la SAM et la SAH dans les cellules H9c2 permettrait de déterminer si leur capacité de méthylation est affectée par la carence en folates ou en PDM. L'impact d'une éventuelle réduction du rapport des concentrations SAM/SAH intracellulaires sur la méthylation de gènes codant des protéines différemment exprimées dans les cardiomyoblastes déficients en PDM pourrait alors être recherché.

II. 3. Une politique de prévention primaire ne serait-elle pas judicieuse ?

Les déficiences en folates et vitamine B12 sont fréquentes dans la population générale et peuvent toucher des populations plus fragiles telles que les femmes enceintes et les personnes âgées. Notre étude *in vivo* sur les ratons montre que la déficience en PDM conduit à l'altération de protéines importantes dans le fonctionnement cardiaque. De plus, notre étude *in vitro* sur les cardiomyoblastes suggère l'accumulation de protéines malformées, l'induction d'un stress du RE et l'activation de système de dégradation protéique dès les premiers jours de déficience en PDM. Ces modifications pourraient contribuer au développement d'une l'hypertrophie cardiaque, comme observée dans le modèle animal, et favoriser la survenue de maladies cardiovasculaires chez l'Homme. Bien que les études n'aient pas montré de diminution de la morbidité et de la mortalité chez des patients hyperhomocystéinémiques atteints de cardiomyopathies après une supplémentation en folates et/ou d'autres vitamines B, certains travaux ont révélé une amélioration des fonctions cardiovasculaires. Au vu de nos résultats et des données des études épidémiologiques actuelles, une politique de prévention primaire contre du moins, le développement de pathologies cardiaques pourrait inclure le

dépistage de la déficience en folates et en vitamine B12 chez les adultes à risque avec la perspective de les supplémenter avec l'un ou l'autre de ces PDM si nécessaire.

II. 4. Limites de nos études

Nos recherches ont été principalement, conduites au travers d'études protéomiques *in vivo* chez le raton et *in vitro* sur cellules cardiomyoblastes. En général, les analyses protéomiques permettent de détecter jusqu'à 2000 protéines chez l'homme ce qui ne couvre qu'une faible partie du protéome cardiaque de l'être humain qui compte plus de 10000 protéines (McGregor *et al.,* 2003). Pour notre étude, nous avons utilisé une approche basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle en réalisant une première séparation des protéines selon un gradient de pH linéaire compris entre 3 et 10, puis des gels SDS-PAGE de grande dimension (17 cm de largeur). Ceci nous a permis selon les critères de l'outil SameSpots de discriminer environ 900 spots dans l'extrait protéique de myocarde de ratons. Ces mêmes observations peuvent être faites pour l'étude protéomique des cardiomyoblastes où 500 spots ont été séparés. Par la suite, l'analyse par le logiciel SameSpots a permis de déterminer, dans les études réalisées sur les cœurs de ratons et dans les cardiomyoblastes H9c2, que respectivement, 73 et 22 spots ont une abondance différente entre les différentes conditions (contrôle et carencé en folates et/ou PDM). Ces spots ont ensuite été prélevés sur les gels d'électrophorèse et identifiées par spectrométrie de masse. Trente neuf protéines (sur 73) chez le raton et 13 protéines (sur 22) dans les cellules ont ainsi été identifiées. La réalisation de nouvelles analyses protéomiques avec des conditions de séparation différentes pour les 2 dimensions (par ex. avec des bandelettes de gradient de pH compris entre 4 et 7 ou 6 et 9) ou encore directement par spectrométrie de masse devrait permettre d'augmenter le nombre de protéines discriminées et offrir de nouvelles informations sur les voies métaboliques affectées par la déficience en PDM. Enfin, l'utilisation de la lignée cellulaire H9c2 sous sa forme cardiomyoblastique peut constituer une autre limite de notre étude. La réalisation d'expériences de déficience en PDM sur des cellules H9c2 différenciées en cardiomyocytes – donc plus près de la physiologie myocardique - permettrait de vérifier la validité de nos observations actuelles. L'obtention d'un tel modèle serait tout à fait originale, mais très probablement peu aisée comme le suggère le nombre réduit d'études réalisées avec des H9c2 « cardiomyocytes » *vs* « cardiomyoblastes ».

REFERENCES

Achon M, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G & Selhub J. (2009). Mild methionine excess does not affect thymidylate synthesis or inflammation markers expression in human aortic endothelial cells. *Ann Nutr Metab* **54,** 28-34.

Agarwala KL, Kokame K, Kato H & Miyata T. (2000). Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein. *Biochem Biophys Res Commun* **272,** 641-647.

Agashe VR & Hartl FU. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in cell & developmental biology* **11,** 15-25.

Aghamohammadi V, Gargari BP & Aliasgharzadeh A. (2011). Effect of folic acid supplementation on homocysteine, serum total antioxidant capacity, and malondialdehyde in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* **30,** 210-215.

Al-Maskari MY, Waly MI, Ali A, Al-Shuaibi YS & Ouhtit A. (2012). Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. *Nutrition* **28,** e23-26.

Al Khatib L, Obeid O, Sibai AM, Batal M, Adra N & Hwalla N. (2006). Folate deficiency is associated with nutritional anaemia in Lebanese women of childbearing age. *Public Health Nutr* **9,** 921-927.

Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring JE & Manson JE. (2008). Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *Jama* **299,** 2027-2036.

Aldini G, Dalle-Donne I, Colombo R, Maffei Facino R, Milzani A & Carini M. (2006). Lipoxidation-derived reactive carbonyl species as potential drug targets in preventing protein carbonylation and related cellular dysfunction. *ChemMedChem* **1,** 1045-1058.

Aldini G, Dalle-Donne I, Vistoli G, Maffei Facino R & Carini M. (2005). Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. *Journal of mass spectrometry : JMS* **40,** 946-954.

Alessio AC, Santos CX, Debbas V, Oliveira LC, Haddad R & Annichino-Bizzacchi JM. (2011). Evaluation of mild hyperhomocysteinemia during the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient and normal mice. *Experimental and molecular pathology* **90,** 45-50.

Alkhoury K, Parkin SM, Homer-Vanniasinkam S & Graham AM. (2011). Chronic homocysteine exposure upregulates endothelial adhesion molecules and mediates leukocyte: endothelial cell interactions under flow conditions. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **41,** 429-435.

Allen LH. (2008). Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull* **29,** S20-34; discussion S35-27.

Allen LH. (2009). How common is vitamin B-12 deficiency? *Am J Clin Nutr* **89,** 693S-696S.

Andres E, Vogel T, Federici L, Zimmer J, Ciobanu E & Kaltenbach G. (2008). Cobalamin deficiency in elderly patients: a personal view. *Current gerontology and geriatrics research*, 848267.

Antoniades C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H & Channon KM. (2006). 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* **114,** 1193-1201.

Aon MA & Cortassa S. (2012). Mitochondrial network energetics in the heart. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*.

Arasaradnam RP, Commane DM, Bradburn D & Mathers JC. (2008). A review of dietary factors and its influence on DNA methylation in colorectal carcinogenesis. *Epigenetics* **3,** 193-198.

Artal-Sanz M & Tavernarakis N. (2009a). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **20,** 394-401.

Artal-Sanz M & Tavernarakis N. (2009b). Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in C. elegans. *Nature* **461,** 793-797.

Asanuma Y, Oeser A, Stanley E, Bailey DG, Shintani A & Stein CM. (2008). Effects of C-reactive Protein and Homocysteine on Cytokine Production: Modulation by Pravastatin. *Archives of drug information* **1,** 14-22.

Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, Yip JC, Siow YL & O K. (2004). Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress. *Circ Res* **94,** 28-36.

Bailey RL, Carmel R, Green R, Pfeiffer CM, Cogswell ME, Osterloh JD, Sempos CT & Yetley EA. (2011). Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* **94,** 552-561.

Baker F PD, Blackwood S, Hunt J, Erskine M, Dyas M et al. (2002). Blinded comparison of folic acid and placebo in patients with ischemic heart disease: an outcome trial. *Circulation*.

Banka S, Ryan K, Thomson W & Newman WG. (2011). Pernicious anemia - genetic insights. *Autoimmunity reviews* **10,** 455-459.

Barone E, Di Domenico F, Cenini G, Sultana R, Coccia R, Preziosi P, Perluigi M, Mancuso C & Butterfield DA. (2011). Oxidative and nitrosative modifications of biliverdin reductase-A in the brain of subjects with Alzheimer's disease and amnestic mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **25,** 623-633.

Baudino TA, Carver W, Giles W & Borg TK. (2006). Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291,** H1015-1026.

Benderdour M, Charron G, DeBlois D, Comte B & Des Rosiers C. (2003). Cardiac mitochondrial NADP+-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development. *J Biol Chem* **278,** 45154-45159.

Bennett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L & Deanfield JE. (2002). Does oral folic acid lower total homocysteine levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? *Circulation* **105,** 1810-1815.

Berlett BS & Stadtman ER. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272,** 20313-20316.

Bers DM. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415,** 198-205.

Bidulescu A, Chambless LE, Siega-Riz AM, Zeisel SH & Heiss G. (2009). Repeatability and measurement error in the assessment of choline and betaine dietary intake: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Nutr J* **8,** 14.

Birch CS, Brasch NE, McCaddon A & Williams JH. (2009). A novel role for vitamin B(12): Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free radical biology & medicine* **47,** 184-188.

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

Blencowe H, Cousens S, Modell B & Lawn J. (2010). Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *Int J Epidemiol* **39 Suppl 1,** i110-121.

Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M & Finnell RH. (2006). Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* **7,** 724-731.

Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Dytfeld J, Lacinski M, Jablecka A & Jakubowski H. (2008). Plasma homocysteine is a determinant of tissue necrosis factor-alpha in hypertensive patients. *Biomed Pharmacother* **62,** 360-365.

Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD & Lentz SR. (2000). Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20,** 1557-1564.

Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR & Haynes WG. (2001). Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. *Clin Sci (Lond)* **100,** 161-167.

Bonaa KH, Njolstad I, Ueland PM, Schirmer H, Tverdal A, Steigen T, Wang H, Nordrehaug JE, Arnesen E & Rasmussen K. (2006). Homocysteine lowering and cardiovascular events after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* **354,** 1578-1588.

Borowczyk K, Tisonczyk J & Jakubowski H. (2012). Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: protective role of bleomycin hydrolase. *Amino acids* **43,** 1339-1348.

Brew K & Nagase H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* **1803,** 55-71.

Brioschi M, Polvani G, Fratto P, Parolari A, Agostoni P, Tremoli E & Banfi C. (2012). Redox proteomics identification of oxidatively modified myocardial proteins in human heart failure: implications for protein function. *PloS one* **7,** e35841.

Bross P, Li Z, Hansen J, Hansen JJ, Nielsen MN, Corydon TJ, Georgopoulos C, Ang D, Lundemose JB, Niezen-Koning K, Eiberg H, Yang H, Kolvraa S, Bolund L & Gregersen N. (2007). Single-nucleotide variations in the genes encoding the mitochondrial Hsp60/Hsp10 chaperone system and their disease-causing potential. *Journal of human genetics* **52,** 56-65.

Buchman AL. (2009). The addition of choline to parenteral nutrition. *Gastroenterology* **137,** S119-128.

Buemi M, Marino D, Di Pasquale G, Floccari F, Ruello A, Aloisi C, Corica F, Senatore M, Romeo A & Frisina N. (2001). Effects of homocysteine on proliferation, necrosis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture and influence of folic acid. *Thrombosis research* **104,** 207-213.

Bulteau AL, Ikeda-Saito M & Szweda LI. (2003). Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* **42,** 14846-14855.

Busby A, Abramsky L, Dolk H, Armstrong B, Addor MC, Anneren G, Armstrong N, Baguette A, Barisic I, Berghold A, Bianca S, Braz P, Calzolari E, Christiansen M, Cocchi G, Daltveit AK, De Walle H, Edwards G, Gatt M, Gener B, Gillerot Y, Gjergja R, Goujard J, Haeusler M, Latos-Bielenska A, McDonnell R, Neville A, Olars B, Portillo I, Ritvanen A, Robert-Gnansia E, Rosch C, Scarano G & Steinbicker V. (2005). Preventing neural tube defects in Europe: a missed opportunity. *Reprod Toxicol* **20,** 393-402.

Cai H & Harrison DG. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87,** 840-844.

Cameron VA, Mocatta TJ, Pilbrow AP, Frampton CM, Troughton RW, Richards AM & Winterbourn CC. (2006). Angiotensin type-1 receptor A1166C gene polymorphism correlates with oxidative stress levels in human heart failure. *Hypertension* **47,** 1155-1161.

Capasso R, Sambri I, Cimmino A, Salemme S, Lombardi C, Acanfora F, Satta E, Puppione DL, Perna AF & Ingrosso D. (2012). Homocysteinylated albumin promotes increased

monocyte-endothelial cell adhesion and up-regulation of MCP1, Hsp60 and ADAM17. *PloS one* **7,** e31388.

Carluccio MA, Ancora MA, Massaro M, Carluccio M, Scoditti E, Distante A, Storelli C & De Caterina R. (2007). Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293,** H2344-2354.

Cassano P, Lezza AM, Leeuwenburgh C, Cantatore P & Gadaleta MN. (2004). Measurement of the 4,834-bp mitochondrial DNA deletion level in aging rat liver and brain subjected or not to caloric restriction diet. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019,** 269-273.

Cau SB, Carneiro FS & Tostes RC. (2012). Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Frontiers in physiology* **3,** 218.

Chagas CE, Bassoli BK, de Souza CA, Deminice R, Jordao Junior AA, Paiva SA, Dagli ML, Ong TP & Moreno FS. (2011). Folic acid supplementation during early hepatocarcinogenesis: cellular and molecular effects. *International journal of cancer Journal international du cancer* **129,** 2073-2082.

Chalupsky K & Cai H. (2005). Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102,** 9056-9061.

Champier J, Claustrat F, Nazaret N, Fevre Montange M & Claustrat B. (2012). Folate depletion changes gene expression of fatty acid metabolism, DNA synthesis, and circadian cycle in male mice. *Nutr Res* **32,** 124-132.

Chang CM, Yu CC, Lu HT, Chou YF & Huang RF. (2007). Folate deprivation promotes mitochondrial oxidative decay: DNA large deletions, cytochrome c oxidase dysfunction, membrane depolarization and superoxide overproduction in rat liver. *Br J Nutr* **97,** 855-863.

Chang L, Xu J, Yu F, Zhao J, Tang X & Tang C. (2004). Taurine protected myocardial mitochondria injury induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Amino acids* **27,** 37-48.

Chanson A, Rock E, Martin JF, Liotard A & Brachet P. (2007). Preferential response of glutathione-related enzymes to folate-dependent changes in the redox state of rat liver. *Eur J Nutr* **46,** 204-212.

Chanson A, Sayd T, Rock E, Chambon C, Sante-Lhoutellier V, Potier de Courcy G & Brachet P. (2005). Proteomic analysis reveals changes in the liver protein pattern of rats exposed to dietary folate deficiency. *J Nutr* **135,** 2524-2529.

Chaussalet M, Lamy E, Foucault-Bertaud A, Genovesio C, Sabatier F, Dignat-George F & Charpiot P. (2004). Homocysteine modulates the proteolytic potential of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **316,** 170-176.

Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA & Jacobsen DW. (1999). Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advances in enzyme regulation* **39,** 93-109.

Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ & Rozen R. (2001). Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Human molecular genetics* **10,** 433-443.

Cheng Z, Jiang X, Kruger WD, Pratico D, Gupta S, Mallilankaraman K, Madesh M, Schafer AI, Durante W, Yang X & Wang H. (2011). Hyperhomocysteinemia impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasorelaxation in transgenic cystathionine beta synthase-deficient mice. *Blood* **118,** 1998-2006.

Chiang JK, Sung ML, Yu HR, Chang HI, Kuo HC, Tsai TC, Yen CK & Chen CN. (2011). Homocysteine induces smooth muscle cell proliferation through differential regulation of cyclins A and D1 expression. *Journal of cellular physiology* **226,** 1017-1026.

Cho E, Zeisel SH, Jacques P, Selhub J, Dougherty L, Colditz GA & Willett WC. (2006). Dietary choline and betaine assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr* **83,** 905-911.

Choi SW, Friso S, Ghandour H, Bagley PJ, Selhub J & Mason JB. (2004). Vitamin B-12 deficiency induces anomalies of base substitution and methylation in the DNA of rat colonic epithelium. *J Nutr* **134,** 750-755.

Chou HC, Chen YW, Lee TR, Wu FS, Chan HT, Lyu PC, Timms JF & Chan HL. (2010). Proteomics study of oxidative stress and Src kinase inhibition in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. *Free radical biology & medicine* **49,** 96-108.

Chou YF & Huang RF. (2009). Mitochondrial DNA deletions of blood lymphocytes as genetic markers of low folate-related mitochondrial genotoxicity in peripheral tissues. *Eur J Nutr* **48,** 429-436.

Chou YF, Yu CC & Huang RF. (2007). Changes in mitochondrial DNA deletion, content, and biogenesis in folate-deficient tissues of young rats depend on mitochondrial folate and oxidative DNA injuries. *J Nutr* **137,** 2036-2042.

Christensen KE, Wu Q, Wang X, Deng L, Caudill MA & Rozen R. (2010). Steatosis in mice is associated with gender, folate intake, and expression of genes of one-carbon metabolism. *J Nutr* **140,** 1736-1741.

Chung HK, Kim OY, Lee H, Do HJ, Kim YS, Oh J, Kang SM & Shin MJ. (2011). Relationship between dietary folate intake and plasma monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in heart failure patients. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **49,** 62-66.

Clarke R, Halsey J, Bennett D & Lewington S. (2011). Homocysteine and vascular disease: review of published results of the homocysteine-lowering trials. *J Inherit Metab Dis* **34,** 83-91.

Coates PJ, Nenutil R, McGregor A, Picksley SM, Crouch DH, Hall PA & Wright EG. (2001). Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Exp Cell Res* **265,** 262-273.

Colucci M, Cattaneo M, Martinelli I, Semeraro F, Binetti BM & Semeraro N. (2008). Mild hyperhomocysteinemia is associated with increased TAFI levels and reduced plasma fibrinolytic potential. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **6,** 1571-1577.

Cossins EA. (2000). The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Canadian Journal of Botany* **78,** 691–708.

Crabtree MJ & Channon KM. (2011). Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **25,** 81-88.

Crott JW, Liu Z, Keyes MK, Choi SW, Jang H, Moyer MP & Mason JB. (2008). Moderate folate depletion modulates the expression of selected genes involved in cell cycle, intracellular signaling and folate uptake in human colonic epithelial cell lines. *The Journal of nutritional biochemistry* **19,** 328-335.

Cui R, Iso H, Date C, Kikuchi S & Tamakoshi A. (2010). Dietary folate and vitamin b6 and B12 intake in relation to mortality from cardiovascular diseases: Japan collaborative cohort study. *Stroke* **41,** 1285-1289.

da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM & Zeisel SH. (2005). Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am J Clin Nutr* **81,** 440-444.

da Costa KA, Niculescu MD, Craciunescu CN, Fischer LM & Zeisel SH. (2006). Choline deficiency increases lymphocyte apoptosis and DNA damage in humans. *Am J Clin Nutr* **84,** 88-94.

da Cunha AA, Ferreira AG, da Cunha MJ, Pederzolli CD, Becker DL, Coelho JG, Dutra-Filho CS & Wyse AT. (2011). Chronic hyperhomocysteinemia induces oxidative damage in the rat lung. *Mol Cell Biochem* **358,** 153-160.

Das M, Ghose M, Borah NC & Choudhury N. (2010). A community based study of the relationship between homocysteine and some of the life style factors. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* **25,** 295-301.

Dayal S, Arning E, Bottiglieri T, Boger RH, Sigmund CD, Faraci FM & Lentz SR. (2004). Cerebral vascular dysfunction mediated by superoxide in hyperhomocysteinemic mice. *Stroke* **35,** 1957-1962.

Dayal S & Lentz SR. (2007). Role of redox reactions in the vascular phenotype of hyperhomocysteinemic animals. *Antioxidants & redox signaling* **9,** 1899-1909.

Dayal S & Lentz SR. (2008a). Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28,** 1596-1605.

Dayal S, Rodionov RN, Arning E, Bottiglieri T, Kimoto M, Murry DJ, Cooke JP, Faraci FM & Lentz SR. (2008b). Tissue-specific downregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase in hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295,** H816-825.

De Santis M, Quattrocchi T, Mappa I, Spagnuolo T, Licameli A, Chiaradia G & De Luca C. (2012). Folic Acid Use in Planned Pregnancy: An Italian Survey. *Maternal and child health journal*.

De Wals P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Lowry RB, Sibbald B, Evans JA, Van den Hof MC, Zimmer P, Crowley M, Fernandez B, Lee NS & Niyonsenga T. (2007). Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med* **357,** 135-142.

Dean RT, Fu S, Stocker R & Davies MJ. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal* **324 (Pt 1),** 1-18.

Demasi M & Laurindo FR. (2012). Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res* **95,** 183-193.

Depre C, Hase M, Gaussin V, Zajac A, Wang L, Hittinger L, Ghaleh B, Yu X, Kudej RK, Wagner T, Sadoshima J & Vatner SF. (2002). H11 kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* **91,** 1007-1014.

Des Rosiers C, Labarthe F, Lloyd SG & Chatham JC. (2011). Cardiac anaplerosis in health and disease: food for thought. *Cardiovasc Res* **90,** 210-219.

Detopoulou P, Panagiotakos DB, Antonopoulou S, Pitsavos C & Stefanadis C. (2008). Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* **87,** 424-430.

Devi S, Kennedy RH, Joseph L, Shekhawat NS, Melchert RB & Joseph J. (2006). Effect of long-term hyperhomocysteinemia on myocardial structure and function in hypertensive rats. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **15,** 75-82.

Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Leyva D, Elimban V, Dent MR & Tappia PS. (2009). Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* **81,** 429-438.

Dhir A & Kulkarni SK. (2011). Nitric oxide and major depression. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **24,** 125-131.

Di Santolo M, Banfi G, Stel G & Cauci S. (2009). Association of recreational physical activity with homocysteine, folate and lipid markers in young women. *European journal of applied physiology* **105,** 111-118.

Diaz-Arrastia R. (2000). Homocysteine and neurologic disease. *Archives of neurology* **57,** 1422-1427.

Dietrich M, Brown CJ & Block G. (2005). The effect of folate fortification of cereal-grain products on blood folate status, dietary folate intake, and dietary folate sources among adult non-supplement users in the United States. *J Am Coll Nutr* **24,** 266-274.

DiFabio JM, Gori T, Thomas G, Jedrzkiewicz S & Parker JD. (2010). Daily low-dose folic acid supplementation does not prevent nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and tolerance: a human in vivo study. *The Canadian journal of cardiology* **26,** 461-465.

Divald A & Powell SR. (2006). Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free radical biology & medicine* **40,** 156-164.

Domenicali M, Vendemiale G, Serviddio G, Grattagliano I, Pertosa AM, Nardo B, Principe A, Viola A, Trevisani F, Altomare E, Bernardi M & Caraceni P. (2005). Oxidative injury in rat fatty liver exposed to ischemia-reperfusion is modulated by nutritional status. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **37,** 689-697.

Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Lang D, Newcombe RG, Kredan MB, Lewis MJ & Goodfellow J. (2001). Folate improves endothelial function in coronary artery disease: an effect mediated by reduction of intracellular superoxide? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21,** 1196-1202.

Du YP, Peng JS, Sun A, Tang ZH, Ling WH & Zhu HL. (2009). Assessment of the effect of betaine on p16 and c-myc DNA methylation and mRNA expression in a chemical induced rat liver cancer model. *BMC cancer* **9,** 261.

Duthie SJ. (2011). Epigenetic modifications and human pathologies: cancer and CVD. *The Proceedings of the Nutrition Society* **70,** 47-56.

Duthie SJ, Grant G, Pirie LP, Watson AJ & Margison GP. (2010). Folate deficiency alters hepatic and colon MGMT and OGG-1 DNA repair protein expression in rats but has no effect on genome-wide DNA methylation. *Cancer Prev Res (Phila)* **3,** 92-100.

Duthie SJ & Hawdon A. (1998). DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *Faseb J* **12,** 1491-1497.

Duthie SJ, Mavrommatis Y, Rucklidge G, Reid M, Duncan G, Moyer MP, Pirie LP & Bestwick CS. (2008). The response of human colonocytes to folate deficiency in vitro: functional and proteomic analyses. *J Proteome Res* **7,** 3254-3266.

Dzimiri N, Al-Bahnasi K & Al-Halees Z. (2004). Myocardial hypertrophy is not a prerequisite for changes in early gene expression in left ventricular volume overload. *Fundamental & clinical pharmacology* **18,** 39-44.

Ebbesen LS & Ingerslev J. (2005). Folate deficiency-induced hyperhomocysteinemia attenuates, and folic acid supplementation restores, the functional activities of rat coagulation factors XII, X, and II. *J Nutr* **135,** 1836-1840.

Ebbing M, Bleie O, Ueland PM, Nordrehaug JE, Nilsen DW, Vollset SE, Refsum H, Pedersen EK & Nygard O. (2008). Mortality and cardiovascular events in patients treated with homocysteine-lowering B vitamins after coronary angiography: a randomized controlled trial. *Jama* **300,** 795-804.

Edirimanne VE, Woo CW, Siow YL, Pierce GN, Xie JY & O K. (2007). Homocysteine stimulates NADPH oxidase-mediated superoxide production leading to endothelial dysfunction in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **85,** 1236-1247.

El Oudi M, Aouni Z, Mazigh C & Machghoul S. (2011). Total homocysteine levels and cardiovascular risk factors in healthy Tunisians. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit* **17,** 937-942.

Endo N, Nishiyama K, Okabe M, Matsumoto M, Kanouchi H & Oka T. (2007). Vitamin B6 suppresses apoptosis of NM-1 bovine endothelial cells induced by homocysteine and copper. *Biochim Biophys Acta* **1770,** 571-577.

Esfandiari F, Villanueva JA, Wong DH, French SW & Halsted CH. (2005). Chronic ethanol feeding and folate deficiency activate hepatic endoplasmic reticulum stress pathway in micropigs. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **289,** G54-63.

Fabian E, Kickinger A, Wagner KH & Elmadfa I. (2011). Homocysteine and asymmetric dimethylarginine in relation to B vitamins in elderly people. *Wiener klinische Wochenschrift* **123,** 496-501.

Fan GC & Kranias EG. (2011). Small heat shock protein 20 (HspB6) in cardiac hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* **51,** 574-577.

Faux NG, Ellis KA, Porter L, Fowler CJ, Laws SM, Martins RN, Pertile KK, Rembach A, Rowe CC, Rumble RL, Szoeke C, Taddei K, Taddei T, Trounson BO, Villemagne VL, Ward V, Ames D, Masters CL & Bush AI. (2011). Homocysteine, vitamin B12, and folic acid levels in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and healthy elderly: baseline characteristics in subjects of the Australian Imaging Biomarker Lifestyle study. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **27,** 909-922.

Fenech M. (2010). Folate, DNA damage and the aging brain. *Mechanisms of ageing and development* **131,** 236-241.

Fenech M. (2012). Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutation research* **733,** 21-33.

Fimognari FL, Loffredo L, Di Simone S, Sampietro F, Pastorelli R, Monaldo M, Violi F & D'Angelo A. (2009). Hyperhomocysteinaemia and poor vitamin B status in chronic obstructive pulmonary disease. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **19,** 654-659.

Finkelstein JD. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *European journal of pediatrics* **157 Suppl 2,** S40-44.

Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH & Sadler TW. (2002). Perturbations in choline metabolism cause neural tube defects in mouse embryos in vitro. *Faseb J* **16,** 619-621.

Food and Nutrition Board IoM. (1998). Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B-6, Vitamin B012, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline *Washington, DC: National Academy of Sciences***,** 390-422.

Fragasso A, Mannarella C, Ciancio A, Scarciolla O, Nuzzolese N, Clemente R, Vitullo E & Sacco A. (2012). Holotranscobalamin is a useful marker of vitamin B12 deficiency in alcoholics. *TheScientificWorldJournal* **2012,** 128182.

Francischetti IM. (2008). Does activation of the blood coagulation cascade have a role in malaria pathogenesis? *Trends in parasitology* **24,** 258-263.

Frank D & Frey N. (2011). Cardiac Z-disc signaling network. *J Biol Chem* **286,** 9897-9904.

Frank JS & Langer GA. (1974). The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *The Journal of cell biology* **60,** 586-601.

Fredriksen A, Meyer K, Ueland PM, Vollset SE, Grotmol T & Schneede J. (2007). Large-scale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *Hum Mutat* **28,** 856-865.

Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M & Minamino T. (2010a). Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation* **122,** 361-369.

Fu MM, Sun R, Tian ZG & Wei HM. (2010b). Increased susceptibility to experimental steatohepatitis induced by methionine-choline deficiency in HBs-Tg mice. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* **9,** 513-519.

Fu YF, Xiong Y & Guo Z. (2005). A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats. *European journal of pharmacology* **508,** 167-175.

Galligan JJ, Smathers RL, Fritz KS, Epperson LE, Hunter LE & Petersen DR. (2012). Protein carbonylation in a murine model for early alcoholic liver disease. *Chemical research in toxicology* **25,** 1012-1021.

Gandhi S & Abramov AY. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012,** 428010.

Garcia-Pinilla JM, Espinosa-Caliani S, Jimenez-Navarro M, Gomez-Doblas JJ, Cabrera-Bueno F, Reyes-Engel A & de Teresa-Galvan E. (2007). Influence of 677 C-->T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase on medium-term prognosis after acute coronary syndromes. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* **34,** 142-147.

Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juilliere Y, Malthiery Y & Gueant JL. (2011). Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* **225,** 324-335.

Ghosh N & Haddad H. (2011). Atrial natriuretic peptides in heart failure: pathophysiological significance, diagnostic and prognostic value. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **89,** 587-591.

Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, Huang Y, Young D & Jacob ST. (2006). A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr* **136,** 1522-1527.

Gil-Prieto R, Hernandez V, Cano B, Oya M & Gil A. (2009). Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study. *Nutrition & metabolism* **6,** 39.

Gilsing AM, Crowe FL, Lloyd-Wright Z, Sanders TA, Appleby PN, Allen NE & Key TJ. (2010). Serum concentrations of vitamin B12 and folate in British male omnivores, vegetarians and vegans: results from a cross-sectional analysis of the EPIC-Oxford cohort study. *Eur J Clin Nutr* **64,** 933-939.

Givvimani S, Qipshidze N, Tyagi N, Mishra PK, Sen U & Tyagi SC. (2011). Synergism between arrhythmia and hyperhomo-cysteinemia in structural heart disease. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* **3,** 107-119.

Glowacki R, Bald E & Jakubowski H. (2010). Identification and origin of Nepsilon-homocysteinyl-lysine isopeptide in humans and mice. *Amino acids* **39,** 1563-1569.

Go EK, Jung KJ, Kim JY, Yu BP & Chung HY. (2005). Betaine suppresses proinflammatory signaling during aging: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinases. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* **60,** 1252-1264.

Goetze JP, Friis-Hansen L, Rehfeld JF, Nilsson B & Svendsen JH. (2006). Atrial secretion of B-type natriuretic peptide. *European heart journal* **27,** 1648-1650.

Gokkusu C, Tulubas F, Unlucerci Y, Ozkok E, Umman B & Aydin M. (2010). Homocysteine and pro-inflammatory cytokine concentrations in acute heart disease. *Cytokine* **50,** 15-18.

Gomez J, Sanchez-Roman I, Gomez A, Sanchez C, Suarez H, Lopez-Torres M & Barja G. (2011). Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **43,** 377-386.

Gori T, Burstein JM, Ahmed S, Miner SE, Al-Hesayen A, Kelly S & Parker JD. (2001). Folic acid prevents nitroglycerin-induced nitric oxide synthase dysfunction and nitrate tolerance: a human in vivo study. *Circulation* **104,** 1119-1123.

Graf D, Kurz AK, Reinehr R, Fischer R, Kircheis G & Haussinger D. (2002). Prevention of bile acid-induced apoptosis by betaine in rat liver. *Hepatology* **36,** 829-839.

Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, Domenicali M, Nardo B, Cavallari A, Trevisani F, Bernardi M & Altomare E. (2000). Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr* **130,** 2131-2136.

Greene ND, Stanier P & Moore GE. (2011). The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects. *Epigenetics* **6,** 875-883.

Gregory JF, 3rd. (2001). Case study: folate bioavailability. *J Nutr* **131,** 1376S-1382S.

Gregory JF, 3rd, Caudill MA, Opalko FJ & Bailey LB. (2001). Kinetics of folate turnover in pregnant women (second trimester) and nonpregnant controls during folic acid supplementation: stable-isotopic labeling of plasma folate, urinary folate and folate catabolites shows subtle effects of pregnancy on turnover of folate pools. *J Nutr* **131,** 1928-1937.

Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B & Ushio-Fukai M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20,** 2175-2183.

Gu HJ, Gao CB, Gong JL, Li XJ, Sun B & Li XN. (2012). Comparative proteomic analysis in left ventricular remodeling following myocardial infarction in rats. *Biomedical and environmental sciences : BES* **25,** 117-123.

Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Nippert M, Abdelmouttaleb I, Herbeth B, Aliot E, Danchin N & Gueant JL. (2007). Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5,** 1209-1216.

Gueant Rodriguez RM, Spada R, Pooya S, Jeannesson E, Moreno Garcia MA, Anello G, Bosco P, Elia M, Romano A, Alberto JM, Juilliere Y & Gueant JL. (2012).

Homocysteine predicts increased NT-pro-BNP through impaired fatty acid oxidation. *Int J Cardiol*.

Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Pagliusi RA, Blaia-d'Avila VL, Allen RH & Stabler SP. (2007). Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. *Metabolism* **56,** 339-347.

Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Peres S, Pagliusi RA, Sampaio Neto LF, D'Almeida V, Irazusta SP, Allen RH & Stabler SP. (2004). Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. *Am J Clin Nutr* **80,** 1312-1321.

Gugliucci A. (2008). Antithrombin activity is inhibited by acrolein and homocysteine thiolactone: Protection by cysteine. *Life sciences* **82,** 413-418.

Guilland JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P & Hercberg S. (2003a). [Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 2. Epidemiological data]. *Pathologie-biologie* **51,** 111-121.

Guilland JC, Favier A, Potier de Courcy G, Galan P & Hercberg S. (2003b). [Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease?. 1. Basic data]. *Pathologie-biologie* **51,** 101-110.

Guo H, Lee JD, Uzui H, Yue H, Wang J, Toyoda K, Geshi T & Ueda T. (2006). Effects of folic acid and magnesium on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **70,** 141-146.

Guo H, Lee JD, Uzui H, Yue H, Wang P, Toyoda K, Geshi T & Ueda T. (2007). Effects of heparin on the production of homocysteine-induced extracellular matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Canadian journal of cardiology* **23,** 275-280.

Guo QM, Malek RL, Kim S, Chiao C, He M, Ruffy M, Sanka K, Lee NH, Dang CV & Liu ET. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer research* **60,** 5922-5928.

Gupta S, Kuhnisch J, Mustafa A, Lhotak S, Schlachterman A, Slifker MJ, Klein-Szanto A, High KA, Austin RC & Kruger WD. (2009). Mouse models of cystathionine beta-synthase deficiency reveal significant threshold effects of hyperhomocysteinemia. *Faseb J* **23,** 883-893.

Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, van't Hof MA, Giesendorf BA, van Oppenraaij-Emmerzaal D & van de Putte LB. (1999). Influence of sulphasalazine, methotrexate, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **58,** 79-84.

Hagar HH. (2002). Folic acid and vitamin B(12) supplementation attenuates isoprenaline-induced myocardial infarction in experimental hyperhomocysteinemic rats.

Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society **46,** 213-219.

Haggerty TJ, Zeller KI, Osthus RC, Wonsey DR & Dang CV. (2003). A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100,** 5313-5318.

Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free radical research* **31,** 261-272.

Hasic S, Jadric R, Cosovic E, Kiseljakovic E, Mornjakovic Z & Winterhalter-Jadric M. (2011). Heart-type fatty acid-binding protein and its relation with morphological changes in rat myocardial damage model induced by isoproterenol. *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih mediciniskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences* **11,** 240-244.

Hasselmann O, Blau N, Ramaekers VT, Quadros EV, Sequeira JM & Weissert M. (2010). Cerebral folate deficiency and CNS inflammatory markers in Alpers disease. *Mol Genet Metab* **99,** 58-61.

Hazra A, Selhub J, Chao WH, Ueland PM, Hunter DJ & Baron JA. (2010). Uracil misincorporation into DNA and folic acid supplementation. *Am J Clin Nutr* **91,** 160-165.

Herbert V. (1994). Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* **59,** 1213S-1222S.

Herrmann M, Muller S, Kindermann I, Gunther L, Konig J, Bohm M & Herrmann W. (2007a). Plasma B vitamins and their relation to the severity of chronic heart failure. *Am J Clin Nutr* **85,** 117-123.

Herrmann M, Stanger O, Paulweber B, Hufnagl C & Herrmann W. (2007b). Effect of folate supplementation on N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *Int J Cardiol* **118,** 267-269.

Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W & Schultz G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res* **69,** 1476-1486.

Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ, Jr., Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM & Schmidt AM. (2001). Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* **107,** 675-683.

Holven KB, Halvorsen B, Bjerkeli V, Damas JK, Retterstol K, Morkrid L, Ose L, Aukrust P & Nenseter MS. (2006). Impaired inhibitory effect of interleukin-10 on the balance between matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor in mononuclear cells from hyperhomocysteinemic subjects. *Stroke* **37,** 1731-1736.

Hornberger J. (1998). A cost-benefit analysis of a cardiovascular disease prevention trial, using folate supplementation as an example. *American journal of public health* **88,** 61-67.

Hubmacher D, Sabatier L, Annis DS, Mosher DF & Reinhardt DP. (2011). Homocysteine modifies structural and functional properties of fibronectin and interferes with the fibronectin-fibrillin-1 interaction. *Biochemistry* **50,** 5322-5332.

Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M & Helfand M. (2008). Homocysteine level and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin Proc* **83,** 1203-1212.

Hung YC, Wang PW, Pan TL, Bazylak G & Leu YL. (2009). Proteomic screening of antioxidant effects exhibited by radix Salvia miltiorrhiza aqueous extract in cultured rat aortic smooth muscle cells under homocysteine treatment. *Journal of ethnopharmacology* **124,** 463-474.

Huss JM & Kelly DP. (2005). Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* **115,** 547-555.

Hwang SY, Siow YL, Au-Yeung KK, House J & O K. (2011). Folic acid supplementation inhibits NADPH oxidase-mediated superoxide anion production in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology* **300,** F189-198.

Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ, Anderson TJ & Parsons HG. (2002). Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282,** H2167-2172.

Innis SM, Davidson AG, Melynk S & James SJ. (2007). Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* **85,** 702-708.

Institut de Veille Sanitaire I. (2006). Etude Nationale Nutrition Santé, ENNS.

Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM & Swendseid ME. (1998). Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* **128,** 1204-1212.

Jacobs F, Van Craeyveld E, Muthuramu I, Gordts SC, Emmerechts J, Hoylaerts M, Herijgers P & De Geest B. (2011). Correction of endothelial dysfunction after selective homocysteine lowering gene therapy reduces arterial thrombogenicity but has no effect on atherogenesis. *J Mol Med (Berl)* **89,** 1051-1058.

Jager R, Bertrand MJ, Gorman AM, Vandenabeele P & Samali A. (2012). The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **104,** 259-270.

Jagerstad M. (2012). Folic acid fortification prevents neural tube defects and may also reduce cancer risks. *Acta Paediatr*.

Jakubowski H. (1999). Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Faseb J* **13,** 2277-2283.

Jakubowski H. (2000). Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* **130,** 377S-381S.

Jakubowski H. (2002). Homocysteine is a protein amino acid in humans. Implications for homocysteine-linked disease. *J Biol Chem* **277,** 30425-30428.

Jakubowski H. (2008). The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **59 Suppl 9,** 155-167.

Jakubowski H. (2011). Quality control in tRNA charging -- editing of homocysteine. *Acta biochimica Polonica* **58,** 149-163.

Jakubowski H, Boers GH & Strauss KA. (2008). Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylated protein levels in humans. *Faseb J* **22,** 4071-4076.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL & Gaylor DW. (1999). Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* **70,** 495-501.

Jang H, Mason JB & Choi SW. (2005). Genetic and epigenetic interactions between folate and aging in carcinogenesis. *J Nutr* **135,** 2967S-2971S.

Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR & Lopaschuk GD. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta* **1813,** 1333-1350.

Jenkins PV, Rawley O, Smith OP & O'Donnell JS. (2012). Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis. *British journal of haematology* **157,** 653-663.

Ji C & Kaplowitz N. (2003). Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* **124,** 1488-1499.

Ji C & Kaplowitz N. (2004). Hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and alcoholic liver injury. *World journal of gastroenterology : WJG* **10,** 1699-1708.

Jiang Y, Sun T, Xiong J, Cao J, Li G & Wang S. (2007). Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **39,** 657-667.

Jin L, Caldwell RB, Li-Masters T & Caldwell RW. (2007). Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **58,** 191-206.

Jing G, Wang JJ & Zhang SX. (2012). ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Experimental diabetes research* **2012,** 589589.

Joseph J, Joseph L, Shekhawat NS, Devi S, Wang J, Melchert RB, Hauer-Jensen M & Kennedy RH. (2003). Hyperhomocysteinemia leads to pathological ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285,** H679-686.

Joseph J, Kennedy RH, Devi S, Wang J, Joseph L & Hauer-Jensen M. (2005). Protective role of mast cells in homocysteine-induced cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288,** H2541-2545.

Joseph J, Washington A, Joseph L, Koehler L, Fink LM, Hauer-Jensen M & Kennedy RH. (2002). Hyperhomocysteinemia leads to adverse cardiac remodeling in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283,** H2567-2574.

Jung AY, Smulders Y, Verhoef P, Kok FJ, Blom H, Kok RM, Kampman E & Durga J. (2011). No effect of folic acid supplementation on global DNA methylation in men and women with moderately elevated homocysteine. *PloS one* **6,** e24976.

Jung T, Engels M, Kaiser B, Poppek D & Grune T. (2006). Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **40,** 1303-1312.

Kalmar B & Greensmith L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* **61,** 310-318.

Ke XD, Foucault-Bertaud A, Genovesio C, Dignat-George F, Lamy E & Charpiot P. (2010). Homocysteine modulates the proteolytic potential of human arterial smooth muscle cells through a reactive oxygen species dependant mechanism. *Mol Cell Biochem* **335,** 203-210.

Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, Parker J, Suleiman MS & Halestrap AP. (2007). Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of physiology* **581,** 1147-1161.

Khodadadi S, Riazi GH, Ahmadian S, Hoveizi E, Karima O & Aryapour H. (2012). Effect of N-homocysteinylation on physicochemical and cytotoxic properties of amyloid beta-peptide. *FEBS letters* **586,** 127-131.

Kienesberger PC, Pulinilkunnil T, Nagendran J & Dyck JR. (2012). Myocardial triacylglycerol metabolism. *J Mol Cell Cardiol*.

Knock E, Deng L, Krupenko N, Mohan RD, Wu Q, Leclerc D, Gupta S, Elmore CL, Kruger W, Tini M & Rozen R. (2011). Susceptibility to intestinal tumorigenesis in folate-

deficient mice may be influenced by variation in one-carbon metabolism and DNA repair. *The Journal of nutritional biochemistry* **22,** 1022-1029.

Koc A, Kocyigit A, Soran M, Demir N, Sevinc E, Erel O & Mil Z. (2006). High frequency of maternal vitamin B12 deficiency as an important cause of infantile vitamin B12 deficiency in Sanliurfa province of Turkey. *Eur J Nutr* **45,** 291-297.

Kokame K, Agarwala KL, Kato H & Miyata T. (2000). Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **275,** 32846-32853.

Kokame K, Kato H & Miyata T. (1996). Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* **271,** 29659-29665.

Kolling J, Scherer EB, da Cunha AA, da Cunha MJ & Wyse AT. (2011). Homocysteine induces oxidative-nitrative stress in heart of rats: prevention by folic acid. *Cardiovascular toxicology* **11,** 67-73.

Kolodziejczyk-Czepas J, Talar B, Nowak P, Olas B & Wachowicz B. (2012). Homocysteine and its thiolactone impair plasmin activity induced by urokinase or streptokinase in vitro. *International journal of biological macromolecules* **50,** 754-758.

Komamura K, Iwai N, Kokame K, Yasumura Y, Kim J, Yamagishi M, Morisaki T, Kimura A, Tomoike H, Kitakaze M & Miyatake K. (2004). The role of a common TNNT2 polymorphism in cardiac hypertrophy. *Journal of human genetics* **49,** 129-133.

Kovacheva VP, Davison JM, Mellott TJ, Rogers AE, Yang S, O'Brien MJ & Blusztajn JK. (2009). Raising gestational choline intake alters gene expression in DMBA-evoked mammary tumors and prolongs survival. *Faseb J* **23,** 1054-1063.

Kraus JP, Janosik M, Kozich V, Mandell R, Shih V, Sperandeo MP, Sebastio G, de Franchis R, Andria G, Kluijtmans LA, Blom H, Boers GH, Gordon RB, Kamoun P, Tsai MY, Kruger WD, Koch HG, Ohura T & Gaustadnes M. (1999). Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum Mutat* **13,** 362-375.

Kronenberg G, Gertz K, Overall RW, Harms C, Klein J, Page MM, Stuart JA & Endres M. (2011). Folate deficiency increases mtDNA and D-1 mtDNA deletion in aged brain of mice lacking uracil-DNA glycosylase. *Experimental neurology* **228,** 253-258.

Kruman, II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M & Mattson MP. (2002). Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22,** 1752-1762.

Kumarapeli AR, Horak K & Wang X. (2010). Protein quality control in protection against systolic overload cardiomyopathy: the long term role of small heat shock proteins. *American journal of translational research* **2,** 390-401.

Kumarapeli AR, Su H, Huang W, Tang M, Zheng H, Horak KM, Li M & Wang X. (2008). Alpha B-crystallin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy. *Circ Res* **103,** 1473-1482.

Kumarapeli AR & Wang X. (2004). Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol* **37,** 1097-1109.

Labat-Robert J. (2012). Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. *Pathologie-biologie* **60,** 15-19.

Lahner E, Persechino S & Annibale B. (2012). Micronutrients (Other than iron) and Helicobacter pylori infection: a systematic review. *Helicobacter* **17,** 1-15.

Lan W, Guhaniyogi J, Horn MJ, Xia JQ & Graham B. (2007). A density-based proteomics sample fractionation technology: folate deficiency induced oxidative stress response in liver and brain. *J Biomol Tech* **18,** 213-225.

Laurindo FR, Pescatore LA & Fernandes Dde C. (2012). Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free radical biology & medicine* **52,** 1954-1969.

Lazarou C & Kapsou M. (2010). The role of folic acid in prevention and treatment of depression: an overview of existing evidence and implications for practice. *Complementary therapies in clinical practice* **16,** 161-166.

Le Grusse J, and B. Watier. . (1993.). Vitamine B12 cobalamines. . *Données Biochimiques, Nutritionnelles et Cliniques Centre d'Études et d'Information sur les vitamines, Paris, France***,** Pages 255–271

Leclerc D & Rozen R. (2008). Endoplasmic reticulum stress increases the expression of methylenetetrahydrofolate reductase through the IRE1 transducer. *J Biol Chem* **283,** 3151-3160.

Lee do Y, Lee KS, Lee HJ, Kim do H, Noh YH, Yu K, Jung HY, Lee SH, Lee JY, Youn YC, Jeong Y, Kim DK, Lee WB & Kim SS. (2010). Activation of PERK signaling attenuates Abeta-mediated ER stress. *PloS one* **5,** e10489.

Lee JE, Jacques PF, Dougherty L, Selhub J, Giovannucci E, Zeisel SH & Cho E. (2010). Are dietary choline and betaine intakes determinants of total homocysteine concentration? *Am J Clin Nutr* **91,** 1303-1310.

Lee SJ, Lee YS, Seo KW, Bae JU, Kim GH, Park SY & Kim CD. (2012). Homocysteine enhances MMP-9 production in murine macrophages via ERK and Akt signaling pathways. *Toxicology and applied pharmacology* **260,** 89-94.

Lee YH, Gallant C, Guo H, Li Y, Wang CA & Morgan KG. (2000). Regulation of vascular smooth muscle tone by N-terminal region of caldesmon. Possible role of tethering actin to myosin. *J Biol Chem* **275,** 3213-3220.

Lever M, George PM, Atkinson W, Molyneux SL, Elmslie JL, Slow S, Richards AM & Chambers ST. (2011). Plasma lipids and betaine are related in an acute coronary syndrome cohort. *PloS one* **6,** e21666.

Lever M, George PM, Elmslie JL, Atkinson W, Slow S, Molyneux SL, Troughton RW, Richards AM, Frampton CM & Chambers ST. (2012). Betaine and secondary events in an acute coronary syndrome cohort. *PloS one* **7,** e37883.

Li M, Chen J, Li YS, Feng YB, Gu X & Shi CZ. (2006). Folic acid reduces adhesion molecules VCAM-1 expession in aortic of rats with hyperhomocysteinemia. *Int J Cardiol* **106,** 285-288.

Li M, Chen J, Li YS, Feng YB & Zeng QT. (2007). Folic acid reduces chemokine MCP-1 release and expression in rats with hyperhomocystinemia. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **16,** 305-309.

Li N, Yi FX, Rute E, Zhang DX, Slocum GR & Zou AP. (2002). Effects of homocysteine on intracellular nitric oxide and superoxide levels in the renal arterial endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283,** H1237-1243.

Li Z & Vance DE. (2008). Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J Lipid Res* **49,** 1187-1194.

Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH, Jukema JW & van Veldhuisen DJ. (2003). Secondary prevention with folic acid: effects on clinical outcomes. *J Am Coll Cardiol* **41,** 2105-2113.

Liem A, Reynierse-Buitenwerf GH, Zwinderman AH, Jukema JW & van Veldhuisen DJ. (2005). Secondary prevention with folic acid: results of the Goes extension study. *Heart* **91,** 1213-1214.

Liem AH, van Boven AJ, Veeger NJ, Withagen AJ, Robles de Medina RM, Tijssen JG & van Veldhuisen DJ. (2004). Efficacy of folic acid when added to statin therapy in patients with hypercholesterolemia following acute myocardial infarction: a randomised pilot trial. *Int J Cardiol* **93,** 175-179.

Lijfering WM, Veeger NJ, Brouwer JL & van der Meer J. (2007). The risk of venous and arterial thrombosis in hyperhomocysteinemic subjects may be a result of elevated factor VIII levels. *Haematologica* **92,** 1703-1706.

Lin CC & Yin MC. (2007a). B vitamins deficiency and decreased anti-oxidative state in patients with liver cancer. *Eur J Nutr* **46,** 293-299.

Lin HC, Song TY & Hu ML. (2009). S-Adenosylhomocysteine promotes the invasion of C6 glioma cells via increased secretion of matrix metalloproteinase-2 in murine microglial BV2 cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **112,** 322-330.

Lin HL, Chen CJ, Tsai WC, Yen JH & Liu HW. (2006). In vitro folate deficiency induces apoptosis by a p53, Fas (Apo-1, CD95) independent, bcl-2 related mechanism in

phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Br J Nutr* **95,** 870-878.

Lin PY, Yang TH, Lin HG & Hu ML. (2007b). Synergistic effects of S-adenosylhomocysteine and homocysteine on DNA damage in a murine microglial cell line. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **379,** 139-144.

Lindberg HK, Wang X, Jarventaus H, Falck GC, Norppa H & Fenech M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation research* **617,** 33-45.

Lipinski B. (2011). Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2011,** 809696.

Liu HY, Liao PC, Chuang KT & Kao MC. (2011). Mitochondrial targeting of human NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) and its association with early-onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Journal of biomedical science* **18,** 29.

Liu S, Stampfer MJ, Hu FB, Giovannucci E, Rimm E, Manson JE, Hennekens CH & Willett WC. (1999). Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr* **70,** 412-419.

Liu X, Ren Z, Zhan R, Wang X, Zhang Z, Leng X, Yang Z & Qian L. (2009). Prohibitin protects against oxidative stress-induced cell injury in cultured neonatal cardiomyocyte. *Cell Stress Chaperones* **14,** 311-319.

Liu Z, Choi SW, Crott JW, Smith DE & Mason JB. (2008). Multiple B-vitamin inadequacy amplifies alterations induced by folate depletion in p53 expression and its downstream effector MDM2. *International journal of cancer Journal international du cancer* **123,** 519-525.

Loikas S, Koskinen P, Irjala K, Lopponen M, Isoaho R, Kivela SL & Pelliniemi TT. (2007). Vitamin B12 deficiency in the aged: a population-based study. *Age Ageing* **36,** 177-183.

Loland KH, Bleie O, Blix AJ, Strand E, Ueland PM, Refsum H, Ebbing M, Nordrehaug JE & Nygard O. (2010). Effect of homocysteine-lowering B vitamin treatment on angiographic progression of coronary artery disease: a Western Norway B Vitamin Intervention Trial (WENBIT) substudy. *The American journal of cardiology* **105,** 1577-1584.

Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C & Genest J, Jr. (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* **354,** 1567-1577.

Lu B, Yu H, Zwartbol M, Ruifrok WP, van Gilst WH, de Boer RA & Sillje HH. (2012a). Identification of hypertrophy- and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models. *Physiological genomics* **44,** 443-454.

Lu L, Ni J, Zhou T, Xu W, Fenech M & Wang X. (2012b). Choline and/or folic acid deficiency is associated with genomic damage and cell death in human lymphocytes in vitro. *Nutrition and cancer* **64,** 481-487.

Lubos E, Loscalzo J & Handy DE. (2007). Homocysteine and glutathione peroxidase-1. *Antioxidants & redox signaling* **9,** 1923-1940.

Luk TH, Dai YL, Siu CW, Yiu KH, Li SW, Fong B, Wong WK, Tam S & Tse HF. (2012). Association of Lower Habitual Physical Activity Level With Mitochondrial and Endothelial Dysfunction in Patients With Stable Coronary Artery Disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*.

Luo X, Xiao Y, Song F, Yang Y, Xia M & Ling W. (2012). Increased plasma S-adenosyl-homocysteine levels induce the proliferation and migration of VSMCs through an oxidative stress-ERK1/2 pathway in apoE(-/-) mice. *Cardiovasc Res* **95,** 241-250.

Lv S, Fan R, Du Y, Hou M, Tang Z, Ling W & Zhu H. (2009). Betaine supplementation attenuates atherosclerotic lesion in apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Nutr* **48,** 205-212.

Ma AG, Schouten EG, Sun YY, Yang F, Han XX, Zhang FZ, Jiang DC & Kok FJ. (2010). Supplementation of iron alone and combined with vitamins improves haematological status, erythrocyte membrane fluidity and oxidative stress in anaemic pregnant women. *Br J Nutr* **104,** 1655-1661.

MacFarlane AJ, Greene-Finestone LS & Shi Y. (2011). Vitamin B-12 and homocysteine status in a folate-replete population: results from the Canadian Health Measures Survey. *Am J Clin Nutr* **94,** 1079-1087.

Malinowska J, Nowak P & Olas B. (2011). Comparison of the effect of homocysteine in the reduced form, its thiolactone and protein homocysteinylation on hemostatic properties of plasma. *Thrombosis research* **127,** 214-219.

Malinowska J, Tomczynska M & Olas B. (2012). Changes of blood platelet adhesion to collagen and fibrinogen induced by homocysteine and its thiolactone. *Clinical biochemistry*.

Mancuso M, Filosto M, Choub A, Tentorio M, Broglio L, Padovani A & Siciliano G. (2007). Mitochondrial DNA-related disorders. *Bioscience reports* **27,** 31-37.

Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias AS, Freitas LA & Marroni NP. (2011). Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arquivos de gastroenterologia* **48,** 72-79.

Martin-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel JB, Jensen ON, Hernandez-Merida S, Tunon J, Vivanco F & Egido J. (2004). Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation* **110,** 2216-2219.

Martin H, Lindblad B & Norman M. (2007). Endothelial function in newborn infants is related to folate levels and birth weight. *Pediatrics* **119,** 1152-1158.

Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G & Rosenberg IH. (2007). A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **16,** 1325-1329.

Mato JM & Lu SC. (2005). Homocysteine, the bad thiol. *Hepatology* **41,** 976-979.

Mato JM, Martinez-Chantar ML & Lu SC. (2008). Methionine metabolism and liver disease. *Annu Rev Nutr* **28,** 273-293.

Mayer EL, Jacobsen DW & Robinson K. (1996). Homocysteine and coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* **27,** 517-527.

Mayer O, Filipovsky J, Hromadka M, Svobodova V, Racek J, Mayer O, Jr., Stehlik P, Trefil L & Zarybnicka M. (2002). Treatment of hyperhomocysteinemia with folic acid: effects on homocysteine levels, coagulation status, and oxidative stress markers. *Journal of cardiovascular pharmacology* **39,** 851-857.

McCully KS. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* **56,** 111-128.

McGregor E & Dunn MJ. (2003). Proteomics of heart disease. *Human molecular genetics* **12 Spec No 2,** R135-144.

McNeil CJ, Beattie JH, Gordon MJ, Pirie LP & Duthie SJ. (2011). Differential effects of nutritional folic acid deficiency and moderate hyperhomocysteinemia on aortic plaque formation and genome-wide DNA methylation in vascular tissue from ApoE-/- mice. *Clinical epigenetics* **2,** 361-368.

McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid M, Duncan G, Maloney CA & Rees WD. (2008). Disruption of lipid metabolism in the liver of the pregnant rat fed folate-deficient and methyl donor-deficient diets. *Br J Nutr* **99,** 262-271.

Meguid NA, Dardir AA, El-Sayed EM, Ahmed HH, Hashish AF & Ezzat A. (2010). Homocysteine and oxidative stress in Egyptian children with Down syndrome. *Clinical biochemistry* **43,** 963-967.

Meng C, Jin X, Xia L, Shen SM, Wang XL, Cai J, Chen GQ, Wang LS & Fang NY. (2009). Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J Proteome Res* **8,** 2463-2475.

Mennen LI, de Courcy GP, Guilland JC, Ducros V, Bertrais S, Nicolas JP, Maurel M, Zarebska M, Favier A, Franchisseur C, Hercberg S & Galan P. (2002). Homocysteine,

cardiovascular disease risk factors, and habitual diet in the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. *Am J Clin Nutr* **76,** 1279-1289.

Menssen A & Hermeking H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99,** 6274-6279.

Mikael LG, Genest J, Jr. & Rozen R. (2006). Elevated homocysteine reduces apolipoprotein A-I expression in hyperhomocysteinemic mice and in males with coronary artery disease. *Circ Res* **98,** 564-571.

Mikael LG, Wang XL, Wu Q, Jiang H, Maclean KN & Rozen R. (2009). Hyperhomocysteinemia is associated with hypertriglyceridemia in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Mol Genet Metab* **98,** 187-194.

Milić M RR, Kašuba V, Oreščanin V, Balija M, Jukić I. (2010). Correlation between folate and vitamin B12 and markers of DNA stability in healthy men: preliminary results. *Acta biochimica Polonica* **57,** 339-345.

Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA & Green R. (2002). Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* **100,** 718-720.

Milman N. (2011). Anemia--still a major health problem in many parts of the world! *Ann Hematol* **90,** 369-377.

Min AK, Kim MK, Kim HS, Seo HY, Lee KU, Kim JG, Park KG & Lee IK. (2012). Alpha-lipoic acid attenuates methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Life sciences* **90,** 200-205.

Minnich A, Tian N, Byan L & Bilder G. (2001). A potent PPARalpha agonist stimulates mitochondrial fatty acid beta-oxidation in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280,** E270-279.

Mishra PK, Tyagi N, Kundu S & Tyagi SC. (2009). MicroRNAs are involved in homocysteine-induced cardiac remodeling. *Cell Biochem Biophys* **55,** 153-162.

Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development* **21,** 2861-2873.

Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM & Winterbourn CC. (2007). Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **49,** 1993-2000.

Moens AL, Claeys MJ, Wuyts FL, Goovaerts I, Van Hertbruggen E, Wendelen LC, Van Hoof VO & Vrints CJ. (2007). Effect of folic acid on endothelial function following acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* **99,** 476-481.

Moens AL, Vrints CJ, Claeys MJ, Timmermans JP, Champion HC & Kass DA. (2008). Mechanisms and potential therapeutic targets for folic acid in cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294,** H1971-1977.

Mohammed R & Lamand M. (1986). Cardiovascular lesions in cobalt-vitamin B12 deficient sheep. *Annales de recherches veterinaires Annals of veterinary research* **17,** 447-450.

Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM & Mills JL. (2008). Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* **29,** S101-111; discussion S112-105.

Moreira ES, Brasch NE & Yun J. (2011). Vitamin B12 protects against superoxide-induced cell injury in human aortic endothelial cells. *Free radical biology & medicine* **51,** 876-883.

Morrison LE, Whittaker RJ, Klepper RE, Wawrousek EF & Glembotski CC. (2004). Roles for alphaB-crystallin and HSPB2 in protecting the myocardium from ischemia-reperfusion-induced damage in a KO mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286,** H847-855.

Moser B, Szekeres T, Bieglmayer C, Wagner KH, Misik M, Kundi M, Zakerska O, Nersesyan A, Kager N, Zahrl J, Hoelzl C, Ehrlich V & Knasmueller S. (2011). Impact of spinach consumption on DNA stability in peripheral lymphocytes and on biochemical blood parameters: results of a human intervention trial. *Eur J Nutr* **50,** 587-594.

Moshal KS, Metreveli N, Frank I & Tyagi SC. (2008). Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia. *Current vascular pharmacology* **6,** 84-92.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G & Pacher P. (2007). Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **358,** 203-208.

Munjal C, Givvimani S, Qipshidze N, Tyagi N, Falcone JC & Tyagi SC. (2011). Mesenteric vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem* **348,** 99-108.

Muraguchi T, Kawawa A & Kubota S. (2010). Prohibitin protects against hypoxia-induced H9c2 cardiomyocyte cell death. *Biomed Res* **31,** 113-122.

Murphy G & Nagase H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine* **29,** 290-308.

Nagoshi T, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD & Mochizuki S. (2011). Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Current pharmaceutical design* **17,** 3846-3853.

Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T & Kimura H. (2004). Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* **279,** 52961-52969.

Napoli C & Ignarro LJ. (2001). Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **5,** 88-97.

Narayanan S, McConnell J, Little J, Sharp L, Piyathilake CJ, Powers H, Basten G & Duthie SJ. (2004). Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **13,** 1436-1443.

Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C & Salvayre R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British journal of pharmacology* **153,** 6-20.

Neves MF, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Pu Q, Rozen R & Schiffrin EL. (2004). Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *Journal of hypertension* **22,** 959-966.

Niculescu MD, Craciunescu CN & Zeisel SH. (2006). Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *Faseb J* **20,** 43-49.

Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, Muijsers AO, van der Spek H & Grivell LA. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *The EMBO journal* **19,** 2444-2451.

Nishikimi T, Mori Y, Ishimura K, Tadokoro K, Yagi H, Yabe A, Horinaka S & Matsuoka H. (2004). Association of plasma atrial natriuretic peptide, N-terminal proatrial natriuretic peptide, and brain natriuretic peptide levels with coronary artery stenosis in patients with normal left ventricular systolic function. *The American journal of medicine* **116,** 517-523.

Noguchi K, Hamadate N, Matsuzaki T, Sakanashi M, Nakasone J, Uchida T, Arakaki K, Kubota H, Ishiuchi S, Masuzaki H, Sugahara K, Ohya Y & Tsutsui M. (2011). Increasing dihydrobiopterin causes dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in rats in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301,** H721-729.

Nurk E, Tell GS, Vollset SE, Nygard O, Refsum H, Nilsen RM & Ueland PM. (2004). Changes in lifestyle and plasma total homocysteine: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* **79,** 812-819.

Nygard O, Refsum H, Ueland PM & Vollset SE. (1998). Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* **67,** 263-270.

Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M & Kvale G. (1995). Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *Jama* **274,** 1526-1533.

Oger E, Lacut K, Le Gal G, Couturaud F, Abalain JH, Mercier B & Mottier D. (2007). Interrelation of hyperhomocysteinemia and inherited risk factors for venous thromboembolism. Results from the E.D.I.TH. study: a hospital-based case-control study. *Thrombosis research* **120,** 207-214.

Oger E, Lacut K, Le Gal G, Couturaud F, Guenet D, Abalain JH, Roguedas AM & Mottier D. (2006). Hyperhomocysteinemia and low B vitamin levels are independently associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study: a hospital-based case-control study. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **4,** 793-799.

Ohrvik VE & Witthoft CM. (2011). Human folate bioavailability. *Nutrients* **3,** 475-490.

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M & Kitakaze M. (2004). Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* **110,** 705-712.

Olas B, Kedzierska M & Wachowicz B. (2008). Comparative studies on homocysteine and its metabolite-homocysteine thiolactone action in blood platelets in vitro. *Platelets* **19,** 520-527.

Oliva J, Zhong J, Buslon VS & French SW. (2012). The effect of SAMe and betaine on Hepa 1-6, C34 and E47 liver cell survival in vitro. *Experimental and molecular pathology* **92,** 126-130.

Olthof MR, Bots ML, Katan MB & Verhoef P. (2006). Effect of folic acid and betaine supplementation on flow-mediated dilation: a randomized, controlled study in healthy volunteers. *PLoS clinical trials* **1,** e10.

Osman C, Merkwirth C & Langer T. (2009). Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci* **122,** 3823-3830.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA & Dang CV. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* **275,** 21797-21800.

Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI & Austin RC. (1999). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* **94,** 959-967.

Ozdemir O, Yakut A, Dinleyici EC, Aydogdu SD, Yarar C & Colak O. (2011). Serum asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, vitamin B(12), folate levels, and lipid profiles in epileptic children treated with valproic acid. *European journal of pediatrics* **170,** 873-877.

Paoli P, Sbrana F, Tiribilli B, Caselli A, Pantera B, Cirri P, De Donatis A, Formigli L, Nosi D, Manao G, Camici G & Ramponi G. (2010). Protein N-homocysteinylation induces

the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *Journal of molecular biology* **400,** 889-907.

Park SJ, Kim KJ, Kim WU, Oh IH & Cho CS. (2012). Involvement of endoplasmic reticulum stress in homocysteine-induced apoptosis of osteoblastic cells. *Journal of bone and mineral metabolism*.

Pfeiffer CM, Huff DL & Gunter EW. (1999). Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* **45,** 290-292.

Pfeiffer CM, Hughes JP, Durazo-Arvizu RA, Lacher DA, Sempos CT, Zhang M, Yetley EA & Johnson CL. (2012). Changes in measurement procedure from a radioassay to a microbiologic assay necessitate adjustment of serum and RBC folate concentrations in the U.S. population from the NHANES 1988-2010. *J Nutr* **142,** 894-900.

Pirchl M, Ullrich C & Humpel C. (2010). Differential effects of short- and long-term hyperhomocysteinaemia on cholinergic neurons, spatial memory and microbleedings in vivo in rats. *The European journal of neuroscience* **32,** 1516-1527.

Pirchl M, Ullrich C, Sperner-Unterweger B & Humpel C. (2012). Homocysteine has anti-inflammatory properties in a hypercholesterolemic rat model in vivo. *Molecular and cellular neurosciences* **49,** 456-463.

Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K & Jacobsen DW. (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* **103,** 2717-2723.

Pogribna M, Melnyk S, Pogribny I, Chango A, Yi P & James SJ. (2001). Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. *American journal of human genetics* **69,** 88-95.

Pogribny IP, James SJ & Beland FA. (2012). Molecular alterations in hepatocarcinogenesis induced by dietary methyl deficiency. *Molecular nutrition & food research* **56,** 116-125.

Pogribny IP, James SJ, Jernigan S & Pogribna M. (2004). Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. *Mutation research* **548,** 53-59.

Pogribny IP, Karpf AR, James SR, Melnyk S, Han T & Tryndyak VP. (2008). Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet. *Brain research* **1237,** 25-34.

Poli G, Biasi F & Leonarduzzi G. (2008a). 4-Hydroxynonenal-protein adducts: A reliable biomarker of lipid oxidation in liver diseases. *Molecular aspects of medicine* **29,** 67-71.

Poli G, Schaur RJ, Siems WG & Leonarduzzi G. (2008b). 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal research reviews* **28,** 569-631.

Pollack PS, Houser SR, Budjak R & Goldman B. (1994). c-myc gene expression is localized to the myocyte following hemodynamic overload in vivo. *J Cell Biochem* **54,** 78-84.

Polyzos SA, Kountouras J, Patsiaoura K, Katsiki E, Zafeiriadou E, Deretzi G, Zavos C, Gavalas E, Katsinelos P, Mane V & Slavakis A. (2012). Serum homocysteine levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of hepatology* **11,** 68-76.

Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP & Gueant JL. (2012). Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. *Journal of hepatology* **57,** 344-351.

Powell CL, Bradford BU, Craig CP, Tsuchiya M, Uehara T, O'Connell TM, Pogribny IP, Melnyk S, Koop DR, Bleyle L, Threadgill DW & Rusyn I. (2010). Mechanism for prevention of alcohol-induced liver injury by dietary methyl donors. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **115,** 131-139.

Purohit V, Abdelmalek MF, Barve S, Benevenga NJ, Halsted CH, Kaplowitz N, Kharbanda KK, Liu QY, Lu SC, McClain CJ, Swanson C & Zakhari S. (2007). Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium. *Am J Clin Nutr* **86,** 14-24.

Qipshidze N, Tyagi N, Sen U, Givvimani S, Metreveli N, Lominadze D & Tyagi SC. (2010). Folic acid mitigated cardiac dysfunction by normalizing the levels of tissue inhibitor of metalloproteinase and homocysteine-metabolizing enzymes postmyocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299,** H1484-1493.

Quere I, Perneger TV, Zittoun J, Bellet H, Gris JC, Daures JP, Schved JF, Mercier E, Laroche JP, Dauzat M, Bounameaux H, Janbon C & de Moerloose P. (2002). Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* **359,** 747-752.

Raaf L, Noll C, Cherifi Mel H, Samuel JL, Delcayre C, Delabar JM, Benazzoug Y & Janel N. (2011). Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats. *Mol Cell Biochem* **347,** 63-70.

Ramaswami G, Chai H, Yao Q, Lin PH, Lumsden AB & Chen C. (2004). Curcumin blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* **40,** 1216-1222.

Ray JG, Kearon C, Yi Q, Sheridan P & Lonn E. (2007). Homocysteine-lowering therapy and risk for venous thromboembolism: a randomized trial. *Annals of internal medicine* **146,** 761-767.

Redeen S, Ryberg A, Petersson F, Eriksson O, Nagga K & Borch K. (2010). Homocysteine levels in chronic gastritis and other conditions: relations to incident cardiovascular disease and dementia. *Digestive diseases and sciences* **55,** 351-358.

Refsum H, Nurk E, Smith AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I, Tverdal A, Tell GS, Nygard O & Vollset SE. (2006). The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *J Nutr* **136,** 1731S-1740S.

Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexo E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C & Scott JM. (2004). Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* **50,** 3-32.

Remacha AF, Souto JC, Ramila E, Perea G, Sarda MP & Fontcuberta J. (2002). Enhanced risk of thrombotic disease in patients with acquired vitamin B12 and/or folate deficiency: role of hyperhomocysteinemia. *Ann Hematol* **81,** 616-621.

Retterstol L, Djurovic S, Bohn M, Bakken A, Erikssen J & Berg K. (2001). Plasma N-terminal pro-atrial natriuretic peptide predicts death after premature myocardial infarction, but not as well as radionuclide ejection fraction. A ten-year follow-up study. *Scand Cardiovasc J* **35,** 373-378.

Riza Erbay A, Turhan H, Yasar AS, Ayaz S, Sahin O, Senen K, Sasmaz H & Yetkin E. (2005). Elevated level of plasma homocysteine in patients with slow coronary flow. *Int J Cardiol* **102,** 419-423.

Roman Vinas B, Ribas Barba L, Ngo J, Gurinovic M, Novakovic R, Cavelaars A, de Groot LC, Van't Veer P, Matthys C & Serra Majem L. (2011). Projected prevalence of inadequate nutrient intakes in europe. *Ann Nutr Metab* **59,** 84-95.

Ronco AM, Llanos M, Tamayo D & Hirsch S. (2007). 5-methyltetrahydrofolic acid stimulates endothelin-1 production in low density lipoprotein-treated human endothelial cells. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **17,** 188-194.

Roybal CN, Yang S, Sun CW, Hurtado D, Vander Jagt DL, Townes TM & Abcouwer SF. (2004). Homocysteine increases the expression of vascular endothelial growth factor by a mechanism involving endoplasmic reticulum stress and transcription factor ATF4. *J Biol Chem* **279,** 14844-14852.

Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M, Davoodi G, Mahmoodian M, Fallah N, Darvish S & Karimi A. (2006). Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* **6,** 38.

Sakata Y, Chancey AL, Divakaran VG, Sekiguchi K, Sivasubramanian N & Mann DL. (2008). Transforming growth factor-beta receptor antagonism attenuates myocardial fibrosis in mice with cardiac-restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Basic research in cardiology* **103,** 60-68.

Sanli C, Oguz D, Olgunturk R, Tunaoglu FS, Kula S, Pasaoglu H, Gulbahar O & Cevik A. (2012). Elevated Homocysteine and Asymmetric Dimethyl Arginine Levels in

Pulmonary Hypertension Associated With Congenital Heart Disease. *Pediatric cardiology*.

Santamaria E, Avila MA, Latasa MU, Rubio A, Martin-Duce A, Lu SC, Mato JM & Corrales FJ. (2003). Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100,** 3065-3070.

Satyanarayana A, Balakrishna N, Pitla S, Reddy PY, Mudili S, Lopamudra P, Suryanarayana P, Viswanath K, Ayyagari R & Reddy GB. (2011). Status of B-vitamins and homocysteine in diabetic retinopathy: association with vitamin-B12 deficiency and hyperhomocysteinemia. *PloS one* **6,** e26747.

Schiff M, Froissart R, Olsen RK, Acquaviva C & Vianey-Saban C. (2006). Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Mol Genet Metab* **88,** 153-158.

Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T & Carrier L. (2012). Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic research in cardiology* **107,** 235.

Schneider MP, Schlaich MP, Harazny JM, Raff U, Ritt M, Ott C & Schmieder RE. (2011). Folic acid treatment normalizes NOS-dependence of vascular tone in the metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* **19,** 960-967.

Schroecksnadel K, Grammer TB, Boehm BO, Marz W & Fuchs D. (2010). Total homocysteine in patients with angiographic coronary artery disease correlates with inflammation markers. *Thromb Haemost* **103,** 926-935.

Schroeder RA & Kuo PC. (1995). Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesthesia and analgesia* **81,** 1052-1059.

Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Koning F, Kloetzel PM & Seeger M. (2005). The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *Journal of molecular biology* **354,** 1021-1027.

Sen S, Reddy PL, Grewal RP, Busby M, Chang P & Hinderliter A. (2010a). Hyperhomocysteinemia is Associated with Aortic Atheroma Progression in Stroke/TIA Patients. *Front Neurol* **1,** 131.

Sen U, Mishra PK, Tyagi N & Tyagi SC. (2010b). Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension. *Cell Biochem Biophys* **57,** 49-58.

Seo H, Oh H, Park H, Park M, Jang Y & Lee M. (2010). Contribution of dietary intakes of antioxidants to homocysteine-induced low density lipoprotein (LDL) oxidation in atherosclerotic patients. *Yonsei medical journal* **51,** 526-533.

Serviddio G, Giudetti AM, Bellanti F, Priore P, Rollo T, Tamborra R, Siculella L, Vendemiale G, Altomare E & Gnoni GV. (2011). Oxidation of hepatic carnitine

palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet. *PloS one* **6,** e24084.

Seto SW, Lam TY, Or PM, Lee WY, Au AL, Poon CC, Li RW, Chan SW, Yeung JH, Leung GP, Lee SM, Ngai SM & Kwan YW. (2010). Folic acid consumption reduces resistin level and restores blunted acetylcholine-induced aortic relaxation in obese/diabetic mice. *The Journal of nutritional biochemistry* **21,** 872-880.

Severino A, Campioni M, Straino S, Salloum FN, Schmidt N, Herbrand U, Frede S, Toietta G, Di Rocco G, Bussani R, Silvestri F, Piro M, Liuzzo G, Biasucci LM, Mellone P, Feroce F, Capogrossi M, Baldi F, Fandrey J, Ehrmann M, Crea F, Abbate A & Baldi A. (2007). Identification of protein disulfide isomerase as a cardiomyocyte survival factor in ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **50,** 1029-1037.

Shane B. (2008). Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food Nutr Bull* **29,** S5-16; discussion S17-19.

Shargorodsky M, Boaz M, Pasternak S, Hanah R, Matas Z, Fux A, Beigel Y & Mashavi M. (2009). Serum homocysteine, folate, vitamin B12 levels and arterial stiffness in diabetic patients: which of them is really important in atherogenesis? *Diabetes/metabolism research and reviews* **25,** 70-75.

Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A & Sengupta S. (2006). Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids in health and disease* **5,** 1.

Shaw GM, Carmichael SL, Yang W, Selvin S & Schaffer DM. (2004). Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring. *American journal of epidemiology* **160,** 102-109.

Sheth JJ & Sheth FJ. (2003). Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. *Indian pediatrics* **40,** 115-123.

Shinohara M, Ji C & Kaplowitz N. (2010). Differences in betaine-homocysteine methyltransferase expression, endoplasmic reticulum stress response, and liver injury between alcohol-fed mice and rats. *Hepatology* **51,** 796-805.

Shirodaria C, Antoniades C, Lee J, Jackson CE, Robson MD, Francis JM, Moat SJ, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Neubauer S & Channon KM. (2007). Global improvement of vascular function and redox state with low-dose folic acid: implications for folate therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* **115,** 2262-2270.

Sies H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift* **69,** 965-968.

Singh BN, Rao KS, Ramakrishna T, Rangaraj N & Rao Ch M. (2007). Association of alphaB-crystallin, a small heat shock protein, with actin: role in modulating actin filament dynamics in vivo. *Journal of molecular biology* **366,** 756-767.

Singh R, Kanwar SS, Sood PK & Nehru B. (2011). Beneficial effects of folic acid on enhancement of memory and antioxidant status in aged rat brain. *Cellular and molecular neurobiology* **31,** 83-91.

Singla M, Guzman G, Griffin AJ & Bharati S. (2008). Cardiomyopathy in multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a clinico-pathological correlation and review of literature. *Pediatric cardiology* **29,** 446-451.

Smithells RW, Sheppard S & Schorah CJ. (1976). Vitamin dificiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* **51,** 944-950.

Solini A, Santini E & Ferrannini E. (2006). Effect of short-term folic acid supplementation on insulin sensitivity and inflammatory markers in overweight subjects. *Int J Obes (Lond)* **30,** 1197-1202.

Spence JD, Bang H, Chambless LE & Stampfer MJ. (2005). Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke* **36,** 2404-2409.

Stanger O, Fowler B, Piertzik K, Huemer M, Haschke-Becher E, Semmler A, Lorenzl S & Linnebank M. (2009). Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* **9,** 1393-1412.

Stanislawska-Sachadyn A, Woodside JV, Sayers CM, Yarnell JW, Young IS, Evans AE, Mitchell LE & Whitehead AS. (2010). The transcobalamin (TCN2) 776C>G polymorphism affects homocysteine concentrations among subjects with low vitamin B(12) status. *Eur J Clin Nutr* **64,** 1338-1343.

Steed MM, Tyagi N, Sen U, Schuschke DA, Joshua IG & Tyagi SC. (2010). Functional consequences of the collagen/elastin switch in vascular remodeling in hyperhomocysteinemic wild-type, eNOS-/-, and iNOS-/- mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* **299,** L301-311.

Steed MM & Tyagi SC. (2011). Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Antioxidants & redox signaling* **15,** 1927-1943.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC & Witztum JL. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* **320,** 915-924.

Steinberg SE, Campbell CL & Hillman RS. (1979). Kinetics of the normal folate enterohepatic cycle. *J Clin Invest* **64,** 83-88.

Stevens VL, McCullough ML, Sun J & Gapstur SM. (2010). Folate and other one-carbon metabolism-related nutrients and risk of postmenopausal breast cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. *Am J Clin Nutr* **91,** 1708-1715.

Stopper H, Treutlein AT, Bahner U, Schupp N, Schmid U, Brink A, Perna A & Heidland A. (2008). Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **23,** 3272-3279.

Stover PJ. (2004). Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* **62,** S3-12; discussion S13.

Stroes ES, van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R & Rabelink TJ. (2000). Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* **86,** 1129-1134.

Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O & Cooke JP. (2003). Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **108,** 933-938.

Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF & Cooke JP. (2001). Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **104,** 2569-2575.

Suematsu N, Ojaimi C, Kinugawa S, Wang Z, Xu X, Koller A, Recchia FA & Hintze TH. (2007). Hyperhomocysteinemia alters cardiac substrate metabolism by impairing nitric oxide bioavailability through oxidative stress. *Circulation* **115,** 255-262.

Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-Boger SM, Tsikas D, Hornig B, Frolich JC & Boger RH. (2003). ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* **57,** 244-252.

Tamadon MR, Jamshidi L, Soliemani A, Ghorbani R, Malek F & Malek M. (2011). Effect of different doses of folic acid on serum homocysteine level in patients on hemodialysis. *Iranian journal of kidney diseases* **5,** 93-96.

Theiss AL, Idell RD, Srinivasan S, Klapproth JM, Jones DP, Merlin D & Sitaraman SV. (2007). Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells. *Faseb J* **21,** 197-206.

Theiss AL & Sitaraman SV. (2011). The role and therapeutic potential of prohibitin in disease. *Biochim Biophys Acta* **1813,** 1137-1143.

Thompson MD, Cole DE & Ray JG. (2009). Vitamin B-12 and neural tube defects: the Canadian experience. *Am J Clin Nutr* **89,** 697S-701S.

Tibbetts AS & Appling DR. (2010). Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu Rev Nutr* **30,** 57-81.

Truettner JS, Hu K, Liu CL, Dietrich WD & Hu B. (2009). Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. *Brain research* **1249,** 9-18.

Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R & Lee ME. (1994). Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91,** 6369-6373.

Tsuchiya M, Ji C, Kosyk O, Shymonyak S, Melnyk S, Kono H, Tryndyak V, Muskhelishvili L, Pogribny IP, Kaplowitz N & Rusyn I. (2012). Inter-strain differences in liver injury and one-carbon metabolism in alcohol-fed mice. *Hepatology*.

Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Sasaki Y, Takahama M & Konishi Y. (1999). Hypomethylation of CpG sites and c-myc gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Japanese journal of cancer research : Gann* **90,** 909-913.

Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, Shintani Y, Takashima S, Kato H, Liao Y, Okazaki H, Asai M, Hirata A, Fujita M, Asano Y, Yamazaki S, Asanuma H, Hori M & Kitakaze M. (2006). Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochem Biophys Res Commun* **340,** 1125-1133.

Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T & Koike K. (2009). Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* **50,** 378-386.

Tyagi N, Kandel M, Munjal C, Qipshidze N, Vacek JC, Pushpakumar SB, Metreveli N & Tyagi SC. (2011). Homocysteine mediated decrease in bone blood flow and remodeling: role of folic acid. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **29,** 1511-1516.

Tyagi N, Mishra PK & Tyagi SC. (2009). Homocysteine, hydrogen sulfide (H2S) and NMDA-receptor in heart failure. *Indian journal of biochemistry & biophysics* **46,** 441-446.

Tyagi N, Ovechkin AV, Lominadze D, Moshal KS & Tyagi SC. (2006). Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem* **98,** 1150-1162.

Tyagi N, Vacek JC, Givvimani S, Sen U & Tyagi SC. (2010). Cardiac specific deletion of N-methyl-d-aspartate receptor 1 ameliorates mtMMP-9 mediated autophagy/mitophagy in hyperhomocysteinemia. *Journal of receptor and signal transduction research* **30,** 78-87.

Tyagi SC, Smiley LM, Mujumdar VS, Clonts B & Parker JL. (1998). Reduction-oxidation (Redox) and vascular tissue level of homocyst(e)ine in human coronary atherosclerotic

lesions and role in extracellular matrix remodeling and vascular tone. *Mol Cell Biochem* **181,** 107-116.

Uchida K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research* **42,** 318-343.

Ueland PM. (2011). Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis* **34,** 3-15.

Ueland PM, Refsum H, Beresford SA & Vollset SE. (2000). The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* **72,** 324-332.

Undas A, Stepien E, Plicner D, Zielinski L & Tracz W. (2007). Elevated total homocysteine is associated with increased platelet activation at the site of microvascular injury: effects of folic acid administration. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5,** 1070-1072.

Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G & Koller A. (2003). Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23,** 418-424.

Urquhart BL, Gregor JC, Chande N, Knauer MJ, Tirona RG & Kim RB. (2010). The human proton-coupled folate transporter (hPCFT): modulation of intestinal expression and function by drugs. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **298,** G248-254.

Vacek TP, Vacek JC & Tyagi SC. (2012). Mitochondrial mitophagic mechanisms of myocardial matrix metabolism and remodelling. *Archives of physiology and biochemistry* **118,** 31-42.

van Asselt DZ, Blom HJ, Zuiderent R, Wevers RA, Jakobs C, van den Broek WJ, Lamers CB, Corstens FH & Hoefnagels WH. (2000). Clinical significance of low cobalamin levels in older hospital patients. *Neth J Med* **57,** 41-49.

Vanzin CS, Biancini GB, Sitta A, Wayhs CA, Pereira IN, Rockenbach F, Garcia SC, Wyse AT, Schwartz IV, Wajner M & Vargas CR. (2011). Experimental evidence of oxidative stress in plasma of homocystinuric patients: a possible role for homocysteine. *Mol Genet Metab* **104,** 112-117.

Vekich JA, Belmont PJ, Thuerauf DJ & Glembotski CC. (2012). Protein disulfide isomerase-associated 6 is an ATF6-inducible ER stress response protein that protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-mediated cell death. *J Mol Cell Cardiol*.

Venta R, Cruz E, Valcarcel G & Terrados N. (2009). Plasma vitamins, amino acids, and renal function in postexercise hyperhomocysteinemia. *Medicine and science in sports and exercise* **41,** 1645-1651.

Verkleij-Hagoort AC, de Vries JH, Ursem NT, de Jonge R, Hop WC & Steegers-Theunissen RP. (2006a). Dietary intake of B-vitamins in mothers born a child with a congenital heart defect. *Eur J Nutr* **45,** 478-486.

Verkleij-Hagoort AC, Verlinde M, Ursem NT, Lindemans J, Helbing WA, Ottenkamp J, Siebel FM, Gittenberger-de Groot AC, de Jonge R, Bartelings MM, Steegers EA & Steegers-Theunissen RP. (2006b). Maternal hyperhomocysteinaemia is a risk factor for congenital heart disease. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* **113,** 1412-1418.

Verschuure P, Croes Y, van den IPR, Quinlan RA, de Jong WW & Boelens WC. (2002). Translocation of small heat shock proteins to the actin cytoskeleton upon proteasomal inhibition. *J Mol Cell Cardiol* **34,** 117-128.

Vessal M, Mishra S, Moulik S & Murphy LJ. (2006). Prohibitin attenuates insulin-stimulated glucose and fatty acid oxidation in adipose tissue by inhibition of pyruvate carboxylase. *The FEBS journal* **273,** 568-576.

Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D & Fardeau M. (1998). A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature genetics* **20,** 92-95.

Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R & Negre-Salvayre A. (2000). Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *Faseb J* **14,** 532-542.

Villeneuve C, Caudrillier A, Ordener C, Pizzinat N, Parini A & Mialet-Perez J. (2009). Dose-dependent activation of distinct hypertrophic pathways by serotonin in cardiac cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297,** H821-828.

Virtanen JK, Voutilainen S, Alfthan G, Korhonen MJ, Rissanen TH, Mursu J, Kaplan GA & Salonen JT. (2005). Homocysteine as a risk factor for CVD mortality in men with other CVD risk factors: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *Journal of internal medicine* **257,** 255-262.

Vitamin Study Research Group V. (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. . *Lancet* **338,** 131-137.

Wang G, Siow YL & O K. (2001a). Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappaB in THP-1 macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280,** H2840-2847.

Wang G, Woo CW, Sung FL, Siow YL & O K. (2002). Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22,** 1777-1783.

Wang TC, Song YS, Wang H, Zhang J, Yu SF, Gu YE, Chen T, Wang Y, Shen HQ & Jia G. (2012a). Oxidative DNA damage and global DNA hypomethylation are related to folate deficiency in chromate manufacturing workers. *Journal of hazardous materials* **213-214,** 440-446.

Wang X, Cui L, Joseph J, Jiang B, Pimental D, Handy DE, Liao R & Loscalzo J. (2012b). Homocysteine induces cardiomyocyte dysfunction and apoptosis through p38 MAPK-mediated increase in oxidant stress. *J Mol Cell Cardiol* **52,** 753-760.

Wang X, Osinska H, Klevitsky R, Gerdes AM, Nieman M, Lorenz J, Hewett T & Robbins J. (2001b). Expression of R120G-alphaB-crystallin causes aberrant desmin and alphaB-crystallin aggregation and cardiomyopathy in mice. *Circ Res* **89,** 84-91.

Washio T, Nomoto K, Watanabe I, Tani S, Nagao K & Hirayama A. (2011). Relationship between plasma homocysteine levels and congestive heart failure in patients with acute myocardial infarction. Homocysteine and congestive heart failure. *Int Heart J* **52,** 224-228.

Wasson GR, McGlynn AP, McNulty H, O'Reilly SL, McKelvey-Martin VJ, McKerr G, Strain JJ, Scott J & Downes CS. (2006). Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *J Nutr* **136,** 2748-2753.

Watkins DK, Chiazze L, Jr., Fryar CD & Fayerweather W. (2002). A case control study of lung cancer and non-malignant respiratory disease among employees in asphalt roofing manufacturing and asphalt production. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* **44,** 551-558.

Wei YJ, Huang YX, Shen Y, Cui CJ, Zhang XL, Zhang H & Hu SS. (2009). Proteomic analysis reveals significant elevation of heat shock protein 70 in patients with chronic heart failure due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* **332,** 103-111.

Weiss N, Zhang YY, Heydrick S, Bierl C & Loscalzo J. (2001). Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98,** 12503-12508.

Weng LC, Yeh WT, Bai CH, Chen HJ, Chuang SY, Chang HY, Lin BF, Chen KJ & Pan WH. (2008). Is ischemic stroke risk related to folate status or other nutrients correlated with folate intake? *Stroke* **39,** 3152-3158.

Wien TN, Pike E, Wisloff T, Staff A, Smeland S & Klemp M. (2012). Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open* **2,** e000653.

Wilcken DE & Wilcken B. (1976). The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *J Clin Invest* **57,** 1079-1082.

Wilson KM, McCaw RB, Leo L, Arning E, Lhotak S, Bottiglieri T, Austin RC & Lentz SR. (2007). Prothrombotic effects of hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27,** 233-240.

Witte KK, Nikitin NP, Parker AC, von Haehling S, Volk HD, Anker SD, Clark AL & Cleland JG. (2005). The effect of micronutrient supplementation on quality-of-life and left

ventricular function in elderly patients with chronic heart failure. *European heart journal* **26,** 2238-2244.

Wonsey DR, Zeller KI & Dang CV. (2002). The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99,** 6649-6654.

Xiao G, Mao S, Baumgarten G, Serrano J, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC & MacLellan WR. (2001). Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. *Circ Res* **89,** 1122-1129.

Xiao Y, Zhang Y, Lv X, Su D, Li D, Xia M, Qiu J, Ling W & Ma J. (2011). Relationship between lipid profiles and plasma total homocysteine, cysteine and the risk of coronary artery disease in coronary angiographic subjects. *Lipids in health and disease* **10,** 137.

Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I & Iqbal MP. (2012). Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PloS one* **7,** e33222.

Yamanishi M, Kabil O, Sen S & Banerjee R. (2006). Structural insights into pathogenic mutations in heme-dependent cystathionine-beta-synthase. *Journal of inorganic biochemistry* **100,** 1988-1995.

Yan LJ, Christians ES, Liu L, Xiao X, Sohal RS & Benjamin IJ. (2002). Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *The EMBO journal* **21,** 5164-5172.

Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R & Meng QH. (2006). Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **351,** 485-491.

Yan TT, Li Q, Zhang XH, Wu WK, Sun J, Li L, Zhang Q & Tan HM. (2010). Homocysteine impaired endothelial function through compromised vascular endothelial growth factor/Akt/endothelial nitric oxide synthase signalling. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **37,** 1071-1077.

Yancey PG, Yu H, Linton MF & Fazio S. (2007). A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27,** 1123-1131.

Yang Q, Cogswell ME, Hamner HC, Carriquiry A, Bailey LB, Pfeiffer CM & Berry RJ. (2010). Folic acid source, usual intake, and folate and vitamin B-12 status in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006. *Am J Clin Nutr* **91,** 64-72.

Yetley EA & Johnson CL. (2011). Folate and vitamin B-12 biomarkers in NHANES: history of their measurement and use. *Am J Clin Nutr* **94,** 322S-331S.

Yoon HJ, Jeong MH, Cho SH, Kim KH, Lee MG, Park KH, Sim DS, Yoon NS, Hong YJ, Kim JH, Ahn Y, Cho JG, Park JC & Kang JC. (2012). Endothelial dysfunction and increased carotid intima-media thickness in the patients with slow coronary flow. *Journal of Korean medical science* **27,** 614-618.

Yun J, Kim JY, Kim OY, Jang Y, Chae JS, Kwak JH, Lim HH, Park HY, Lee SH & Lee JH. (2011). Associations of plasma homocysteine level with brachial-ankle pulse wave velocity, LDL atherogenicity, and inflammation profile in healthy men. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **21,** 136-143.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR & Griendling KK. (1998). Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* **32,** 488-495.

Zak R. (1973). Cell proliferation during cardiac growth. *The American journal of cardiology* **31,** 211-219.

Zeisel SH. (2006). Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annu Rev Nutr* **26,** 229-250.

Zeisel SH, Zola T, daCosta KA & Pomfret EA. (1989). Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. *The Biochemical journal* **259,** 725-729.

Zeng X, Dai J, Remick DG & Wang X. (2003). Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ Res* **93,** 311-320.

Zhang B, Qiu L, Fu M & Hu S. (2012a). Interference in mevalonate pathway ameliorates homocysteine-induced endothelium-dysfunction. *European journal of pharmacology* **692,** 61-68.

Zhang D, Fang P, Jiang X, Nelson J, Moore JK, Kruger WD, Berretta RM, Houser SR, Yang X & Wang H. (2012b). Severe hyperhomocysteinemia promotes bone marrow-derived and resident inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis in LDLr/CBS-deficient mice. *Circ Res* **111,** 37-49.

Zhang D, Jiang X, Fang P, Yan Y, Song J, Gupta S, Schafer AI, Durante W, Kruger WD, Yang X & Wang H. (2009a). Hyperhomocysteinemia promotes inflammatory monocyte generation and accelerates atherosclerosis in transgenic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circulation* **120,** 1893-1902.

Zhang D, Xie X, Chen Y, Hammock BD, Kong W & Zhu Y. (2012c). Homocysteine upregulates soluble epoxide hydrolase in vascular endothelium in vitro and in vivo. *Circ Res* **110,** 808-817.

Zhang JG, Liu JX, Li ZH, Wang LZ, Jiang YD & Wang SR. (2007). Dysfunction of endothelial NO system originated from homocysteine-induced aberrant methylation pattern in promoter region of DDAH2 gene. *Chinese medical journal* **120,** 2132-2137.

Zhang XM, Huang GW, Tian ZH, Ren DL & J XW. (2009b). Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **45,** 14-19.

Zhou J & Austin RC. (2009). Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: Causal relationship and potential mechanisms. *Biofactors* **35,** 120-129.

Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, de Koning AB, Sood SK, Hossain GS, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Falk E, Dayal S, Lentz SR & Austin RC. (2004). Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **110,** 207-213.

Zhou K, Zhao R, Geng Z, Jiang L, Cao Y, Xu D, Liu Y, Huang L & Zhou J. (2012). Association between B-group vitamins and venous thrombosis: systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Journal of thrombosis and thrombolysis*.

Zhou SG, Zhou SF, Huang HQ, Chen JW, Huang M & Liu PQ. (2006). Proteomic analysis of hypertrophied myocardial protein patterns in renovascularly hypertensive and spontaneously hypertensive rats. *J Proteome Res* **5,** 2901-2908.

Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, Deiana L, Talanas G, Terrosu P & Carru C. (2012). Low density lipoprotein S-homocysteinylation is increased in acute myocardial infarction patients. *Clinical biochemistry* **45,** 359-362.

Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, Pintus G, Posadino AM, Cossu A, Deiana L, Sengupta S & Carru C. (2009). S-homocysteinylated LDL apolipoprotein B adversely affects human endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis* **206,** 40-46.

Zinellu A, Zinellu E, Sotgia S, Formato M, Cherchi GM, Deiana L & Carru C. (2006). Factors affecting S-homocysteinylation of LDL apoprotein B. *Clin Chem* **52,** 2054-2059.

Zivkovic V, Jakovljevic V, Djordjevic D, Vuletic M, Barudzic N & Djuric D. (2012). The effects of homocysteine-related compounds on cardiac contractility, coronary flow, and oxidative stress markers in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem*.

Zou T, Yang W, Hou Z & Yang J. (2010). Homocysteine enhances cell proliferation in vascular smooth muscle cells: role of p38 MAPK and p47phox. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **42,** 908-915.

Zulli A & Hare DL. (2009). High dietary methionine plus cholesterol stimulates early atherosclerosis and late fibrous cap development which is associated with a decrease in GRP78 positive plaque cells. *International journal of experimental pathology* **90,** 311-320.

Sites internet:

✔ Agence Nationale de sécurité sanitaire (ANSES), 2012
http://www.anses.fr/index.htm *(consulté le 18.07.12)*

✔ *http://www.123bio.net/cours/* (consulté le 18.07.12)