



Association du statut en vitamine B12 et Folates avec les manifestations du syndrome métabolique liées à l'obésité morbide

Zhen Li

► To cite this version:

Zhen Li. Association du statut en vitamine B12 et Folates avec les manifestations du syndrome métabolique liées à l'obésité morbide. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0185 . tel-01976957

HAL Id: tel-01976957

<https://theses.hal.science/tel-01976957>

Submitted on 10 Jan 2019

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : "Science de la Vie et de la Santé"

Par

Zhen LI

***Association du statut en vitamine B12 et Folates avec les manifestations du
syndrome métabolique liées à l'obésité morbide***

Le 14 Décembre 2016

Membres du jury :

Examineurs :

Mme Rosa-Maria GUÉANT-RODRIGUEZ PU-PH, Laboratoire de Biochimie, CHU Brabois de Nancy,
Université de Lorraine (Directeur de thèse)

Mr Laurent BRUNAUD PU-PH, Service de Chirurgie Digestive et Générale, CHU Brabois de
Nancy, Université de Lorraine (Co-Directeur de thèse)

Mr Yves BOIRIE PU-PH, Service d'Endocrinologie et Nutrition, Hôpital de Clermont
Ferrand, Université d'Auvergne

Mr Jean-Louis GUÉANT PU-PH, Laboratoire de Biochimie, CHU Brabois de Nancy,
Université de Lorraine

Rapporteurs :

Mme Laurence DUVILLARD PU-PH, Laboratoire de Biochimie Spécialisée, Hôpital du Bocage de
Dijon, Université de Bourgogne

Mr Serge ROHR PU-PH, Service de Chirurgie Générale et Digestive, Hôpital de
Haute-pierre, Université de Strasbourg

Membre invité :

Mr Laurent BRESLER PU-PH, Service de Chirurgie Digestive et Générale, CHU Brabois de
Nancy, Université de Lorraine

Sommaire

Remerciements	9
Liste de communications et de publications	11
Liste des abréviations	13
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
2 NOTIONS ÉLÉMENTAIRES ET RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE	20
2.1 Partie I : L'obésité et ses pathologies associées	20
2.1.1 L'obésité	20
2.1.1.1 Épidémiologie de l'obésité	21
2.1.1.2 L'obésité et la distribution du tissu adipeux	24
2.1.1.3 Le tissu adipeux dans les maladies métaboliques.....	26
2.1.1.4 Complication de l'obésité.....	28
2.1.2 Le Syndrome Métabolique.....	31
2.1.2.1 Physiopathologie du Syndrome Métabolique.....	32
2.1.2.2 Mécanismes liés au syndrome métabolique	34
2.1.2.2.1 Résistance à l'insuline	34
2.1.2.2.2 Système Nerveux Sympathique.....	36
2.1.2.2.3 Mécanismes reliant l'intestin aux maladies métaboliques	37
2.1.3 Maladies associées à l'obésité et au Syndrome Métabolique.....	39
2.1.3.1 Syndrome Apnées Obstructives du Sommeil (SAOS)	39
2.1.3.2 La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD)	39
2.1.3.2.1 Introduction NAFLD	39
2.1.3.2.2 Épidémiologie.....	39
2.1.3.2.3 Physiopathologie	40
2.1.3.3 Cardiomyopathie	42
2.1.3.3.1 Introduction cardiomyopathie.....	42
2.1.3.3.2 Épidémiologie.....	43
2.1.3.3.3 Physiopathologie	43
2.1.3.3.3.1 Troubles métaboliques systémiques.....	43
2.1.3.3.3.2 Anomalies des composants subcellulaires	45
2.1.3.3.3.3 Microcirculation coronaire	45
2.1.3.3.3.4 Autres mécanismes.....	46
1.1 Partie II. Les donneurs de méthyles et le métabolisme des monocarbones, mécanismes épigénétiques/épigénomiques	47
1.1.1 Le métabolisme des monocarbones	47
1.1.1.1 Les folates.....	47
1.1.1.1.1 Définition et structure	47
1.1.1.1.2 Absorption et transport	48
1.1.1.1.3 Stockage et élimination	49

1.1.1.1.4 Son rôle.....	49
1.1.1.2 Vitamine B12.....	50
1.1.1.2.1 Définition et structure.....	50
1.1.1.2.2 Absorption et transport.....	52
1.1.1.2.3 Stockage et élimination.....	55
1.1.1.2.4 Son rôle.....	55
1.1.1.3 Le métabolisme de monocarbones.....	56
1.1.1.4 Les facteurs influençant le métabolisme de monocarbones.....	57
1.1.2 Mécanismes épigénomiques/épigénétiques.....	59
1.1.2.1 La méthylation de l'ADN.....	59
1.1.2.2 Les modifications des histones.....	60
1.2 Partie III. Influence du métabolisme de monocarbones sur les modifications épigénomiques/épigénétiques du "Fœtal programming", et syndrome métabolique.....	63
1.2.1 Le métabolisme des monocarbones participe à la programmation fœtale.....	63
1.2.2 Influence de l'état nutritionnel et le métabolisme de folates et vitamine B12 pendant la grossesse.....	64
1.2.3 Les donneurs de méthyles influencent la « <i>programmation fœtale</i> ».....	65
1.2.3.1 Évidences expérimentales.....	65
1.2.3.2 Faits épidémiologiques.....	67
1.2.4 Les donneurs de méthyles influencent l'épigénome dans la vie post-natal.....	68
1.2.5 Les changements dans l'Épigénome influencent le métabolisme et les traits du syndrome métabolique dans la vie adulte.....	69
1.2.6 Influence de l'épigénome sur le phénotype métabolique.....	69
2 OBJECTIFS ET HYPOTHESES.....	71
4. RÉSULTATS.....	74
4.1. Etude N°1 : Le statut en donneurs de méthyles a un impact significatif sur la résistance à l'insuline et sur la gravité du syndrome métabolique chez les patients avec une obésité morbide.....	74
4.1.1. Introduction.....	74
4.1.2. Population et Méthodes.....	75
4.1.2.1. La cohorte ALDEPI.....	75
4.1.2.2. Recueil des données cliniques et préparation des échantillons.....	75
4.1.3. Analyse biochimique.....	76
4.1.4. Analyse Statistique.....	77
4.1.5. Résultats.....	78
4.1.6. Discussion.....	85
4.2. Etude N°2 L'étude du profil des acylcarnitines dans le syndrome métabolique.....	89
4.2.1. Introduction.....	89
4.2.2. Matériel et Méthode.....	90
4.2.2.1. Population et recueil de données.....	90
4.2.2.2. Analyses biochimiques.....	91

4.2.2.3. Analyse statistique.....	91
4.2.3. Résultats.....	92
4.2.3.1. Caractéristiques cliniques et biologiques de la population Française	92
4.2.3.2. Concentrations en acylcarnitines:.....	92
4.2.4. Discussion.....	97
4.2.4.1. Les caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée	97
4.2.4.2. Acylcarnitines et les composants du syndrome métabolique	99
4.1. Etude N°3 La programmation fœtale par une carence en donneurs de méthyles produit une cardiomyopathie et défaillance cardiaque chez des rats exposés à un régime alimentaire riche en lipide.....	102
4.1.1. Approches expérimentales (Modèle animal et traitements)	102
4.1.2. Méthodes d'analyse	103
4.1.2.1. Composition du corps entier en utilisant l'analyse DEXA. (Dual-Energy X-ray Absorptiometry).....	103
4.1.2.2. L'exploitation fonctionnelle du myocarde	104
4.1.2.3. Analyses biochimiques.....	105
4.1.2.4. Analyses histopathologiques.....	105
4.1.2.5. Western Blot : Immuno-détection sur membrane.....	106
4.1.2.6. Analyses statistiques.....	109
4.1.3. Résultats.....	110
4.1.3.1. Anomalies métaboliques, fonctionnelles et histologiques.....	110
4.1.3.2. Marqueurs de fibrose dans le cœur des rats iMDD et iMDD/HF.....	118
4.1.3.3. L'activation de la fibrose était liée à l'inflammasome et à l'angiotensinogène.....	119
4.1.3.4. Les rats iMDD/HF présentaient une altération de l'expression des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique.....	123
4.1.4. Discussion.....	126
4.2. Etude n°4 : La programmation fœtale par une carence en donneurs de méthyles produit une stéatohépatite chez des rats exposés à un régime alimentaire riche en lipides	130
4.2.1. Résumé.....	130
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVE GÉNÉRALE.....	131
6. BIBLIOGRAPHIE.....	134
7. Annexes	154
7.1. Annexe 1. Prévalence de l'obésité par région et son évolution depuis 1997. (Modifié d'après ObEpi 2012).....	154
7.2. Annexe 2. Apports nutritionnels journalières en folates.....	155
7.3. Annexe 3. Apports nutritionnels journalières en Vitamine B12.....	156
7.4. Annexe 4. Protocole enregistré à clinicaltrials.gov	157
7.5. Annexe 5. Publication de l'étude n°4	160
8. FICHES TECHNIQUES.....	174
8.1. Fiche technique n°1 : Protocole animal	174
8.2. Fiche technique n°2 : Prélèvement des échantillons.....	176

8.3. Fiche technique n°3 : Absorption bi-photonique à rayons X: méthode DXA	177
8.4. Fiche technique n°4 : La tomographie par émission de positons (TEP).....	180
8.5. Fiche technique n°5 : Mesure de la tension artérielle par la méthode du manchon caudal «Tail cuff method».....	182
8.6. Fiche technique n°6 : Dosage des vitamines B9 et B12	184
8.7. Fiche technique n°7 : Principe et utilisation de spectromètre de masse	186
8.8. Fiche technique n°8. Analyse de profil des acylcarnitines	189
8.9. Fiche technique n°9 : Dosage de l’homocystéine et de l’acide méthylmalonique	191
8.10. Fiche technique n°10 : Dosage des marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)	194
8.11. Fiche technique n°11 : Dosage du glucose	196
8.12. Fiche technique n°12 : Dosage de l'Insuline	197
8.13. Fiche technique n°13 : Calcul du HOMA-IR	199
8.14. Fiche technique n°14 : Dosage de l'Angiotensine II.....	200
8.15. Fiche technique n°15 Traitement des échantillons tissulaires pour l'analyse histologique	202
8.16. Fiche technique n°16 : Réalisation de la coloration HES	203
8.17. Fiche technique n°17 : Réalisation de la coloration Rouge Sirius.....	204
8.18. Fiche technique n°18 : Réalisation de la coloration Trichrome de Masson	205
8.19. Fiche technique n°19 : Extraction des protéines totales à partir de tissus	206
8.20. Fiche technique n°20 : Dosage des protéines par la méthode de l’acide bicinchoninique (BCA).....	208
8.21. Fiche technique n°21 : Western Blotting.....	209
8.22. Fiche technique n°22 : Déshybridation de membrane après western blotting (stripping).	216
8.23. Fiche technique n°23 : Analyses statistiques.....	217
8.24. Fiche technique n°24 : Transformation des unités équivalents pour certains paramètres.	218

Table des figures

Figure 1.	Les cytokines liées au T2DM et obésité.	27
Figure 2.	Physiopathologie de NAFLD.	42
Figure 3.	Insuline Résistance et le diabète de type 2 conduisent à des troubles métaboliques systémiques dans le cardiomyocyte.	44
Figure 4.	Le développement et la progression de la myocardiopathie diabétique.	46
Figure 5.	Structure chimique de folates.	48
Figure 6.	L'absorption de folates et sa distribution dans le foie et dans les tissus périphériques.	49
Figure 7.	Les folates et le cycle de la méthionine.	50
Figure 8.	Structure chimique de la vitamine B12.	52
Figure 9.	Processus d'absorption et transportation de la vitamine B12.	54
Figure 10.	Transport et métabolisme de la Cobalamine.	55
Figure 11.	Mécanisme de méthylation de l'ADN sur les résidus cytosine par AND méthyltransférase (DNMT).	60
Figure 12.	Le nucléosome et les modifications des histones.	61
Figure 13.	Le nucléosome et les modifications des histones.	66
Figure 14.	Effets de la carence maternelle en donneurs de méthyles sur le cœur et le foie de nouveaux nés.	72
Figure 15.	Corrélations entre homocystéine et NT-pro-BNP, NT-pro-BNP et acylcarnitines à chaînes courtes, moyennes et longues.	73
Figure 16.	Schéma de l'étude ALDEPI.	76
Figure 17.	Interaction de la vitamine B12 et folates sur HOMA-IR.	80
Figure 18.	Interaction de la vitamine B12 - folates sur MMA et relation entre MMA et HOMA-IR.	82
Figure 19.	Les analyses du profile d'acylcarnitines en fonction de la présence ou absence du syndrome métabolique.	94
Figure 20.	Les analyses du profile d'acylcarnitines en fonction de la présence ou absence du syndrome métabolique.	95
Figure 21.	Le schéma du protocole du modèle animal.	102
Figure 22.	Examen de DEXA (Dual Energy X-ray ABSormetry).	104
Figure 23.	Examen de l'exploitation fonctionnelle myocardique (miniPET).	105
Figure 24.	Le principe de western blot. Le substrat chimiluminescence qui a été utilisé est ECL.	106
Figure 25.	Le principe de transfert sur un support membranaire.	108

Figure 26.	Adiposité abdominale chez les rats de 50 jours et 185 jours.	110
Figure 27.	L'index HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) selon dosages plasmatiques du glucose et de l'insuline chez les rats à J400.....	110
Figure 28.	Dosages d'angiotensine plasmatique chez les rats à J50, J185 et J400.	111
Figure 29.	Dosages du peptide natriurétique de type B (BNP) chez les rats à J50 et J185.....	112
Figure 30.	L'exploitation fonctionnelle myocardique chez les rats à J185.....	113
Figure 31.	Mesure de la tension artérielle chez les rats de 365 jours.....	113
Figure 32.	Les analyses anatomopathologique du cœur avec les colorations HES et Rouge Sirius et Trichrome Masson à J50.....	114
Figure 33.	Les analyses anatomopathologique du cœur avec les colorations HES et Rouge Sirius et Trichrome Masson chez les rats à J185.	114
Figure 34.	Les analyses anatomopathologique du cœur avec les colorations HES et Rouge Sirius et Trichrome Masson chez les rats à J400.	115
Figure 35.	Le ratio du poids cardiaque/corporelle chez les rats à J400.....	115
Figure 36.	Expression du transporteur de glucose de type 4 (GLUT 4) dans le cœur des rats à J50, J185, et J400.	117
Figure 37.	Expression des protéines matricielles α -SMA, Col 1A1, Col 1A2 et MMP2 dans le cœur du rat à J50 et J185.	118
Figure 38.	L'expression de NOX2 et NOX4 dans le cœur du rat à J50, J185, et J400.....	120
Figure 39.	L'expression de BMP7, TGF β 1, l'angiotensinogène (AGT), récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT1) et de type 2 (AT2) dans le cœur du rat à J50, J185, et J400.....	121
Figure 41.	Expression de PGC1- α , PPAR α , PPAR γ , SIRT1 dans le cœur des rats au J50, J185, et J400.....	124
Figure 42.	Expression d'ER α et ERR α dans le cœur des rats à J50, J185, et J400.....	125
Figure 43.	Photographie prise lors de l'examen d'un rat au DXA.	179
Figure 44.	Exemple d'image obtenue après analyse au DXA où les différentes régions nous intéressant ont été délimitées.....	179
Figure 45.	Schéma du processus d'acquisition d'une TEP.	181
Figure 46.	Schéma du montage pour les mesures de pression artérielle des rats.....	182
Figure 47.	Visualisation du signal recueilli par l'enregistreur.	183
Figure 48.	L'équipement et le principe de spectromètre de masse.	187
Figure 49.	Le mode de quantification de spectromètre de masse par Précurseur Ion Scan.	190

Table des illustrations

Tableau 1.	Les critères du diagnostic du syndrome métabolique.....	32
Tableau 2.	Caractéristiques cliniques et biologiques des 278 patients obèses au période 1 et 2.....	78
Tableau 3.	Les composants du syndrome métabolique et les autres caractéristiques chez 278 patients obèses en fonction de la définition des critères IDF 2009.....	79
Tableau 4.	Déterminants de HOMA-IR dans l'analyse univariée et multivariée à deux périodes.....	80
Tableau 5.	Les nombres des composantes du syndrome métabolique des 278 patients.....	83
Tableau 6.	Analyse multivariate sur nombre des composantes du syndrome métabolique en regardant les marqueurs du métabolisme mono carbone avec ceux qui ont la valeur $P < 0.2$ dans l'analyse univariate.	84
Tableau 7.	Caractéristiques cliniques et biologique des patients femmes obèses sans ou avec le syndrome métabolique.....	93
Tableau 8.	Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine Acrylamide 40 %.....	210
Tableau 9.	Conditions et anticorps primaires de western-blot pour chaque protéine (22 protéines).	214
Tableau 10.	Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.....	215

Remerciements

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

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur **Jean-Louis GUÉANT**, directeur de l'unité INSERM U954, pour son accueil, sa direction avisée, consciencieuse et fidèle. Vous étiez le premier français que j'ai rencontré dans la vie. Je me rappelle encore le moment où vous nous donniez un cours de biochimie en français en 2003 à Wuhan, et spécialement le métabolisme du cuivre, car c'était difficile pour nous. De mon point de vue, vous êtes un professeur élégant, clairvoyant et un homme érudit.

Je remercie chaleureusement Madame la Professeure **Rosa-Maria GUÉANT-RODRIGUEZ**, ma directrice de thèse. Je vous remercie de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de cette thèse. Je suis tellement stupéfié et admiratif de vos connaissances en tant que cardiologue, biologiste, professeure de biochimie et aussi chercheuse !

Je remercie sincèrement Monsieur le professeur **Laurent BRESLER**, mon premier professeur de chirurgie qui m'a guidé dans la chirurgie, depuis la salle de staff lors de mon stage d'externe en chirurgie dans votre service en 2005. Vous êtes un professeur à la fois sérieux et sympathique, mais surtout un très bon chirurgien qui placez toujours le patient au centre de votre travail. Je vous remercie beaucoup pour toute l'aide que vous m'avez apportée et c'est aussi grâce à vous que j'ai décidé de faire de la chirurgie.

Je remercie profondément Monsieur le professeur **Laurent BRUNAUD**, mon co-directeur de thèse, pour son aide et sa disponibilité. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous car vous m'avez beaucoup appris en chirurgie, et vous êtes un professeur qui a beaucoup d'humour.

Je remercie **Jean-Marc ALBERTO** pour son soutien. Il est comme mon grand frère qui est toujours là pour m'apprendre ou m'écouter. C'est toi qui m'as appris la première fois comment tenir une pipette au lieu de bistouri, et c'est toujours toi qui me rassure quand je ne m'en sors plus.

Je remercie **Déborah HELLE** pour son apprentissage de la plupart des manipulations pendant ma thèse.

Je remercie Madame **Natacha DREUMONT-SCHULLER** pour ses conseils, sa patience, sa disponibilité tout au cours de ma thèse. Tu m'as tellement appris.

Je remercie **Philippe GÉRARD** pour sa disponibilité et son aide aux manipulations à n'importe quel moment que j'ai besoin. Je ne vais jamais oublier que je t'ai fait quitter ta maison pour venir au laboratoire à 21h ! Et je me souviens bien des moments où l'on rigolait tous les deux. Tu me manqueras mon ami !

Je remercie **Carole ARNOLD** qui m’a enseigné beaucoup de choses sur les souris transgéniques, merci pour tous les moments où l’on a discuté ensemble.

Merci **Rémy UMORET**, car c’est toi qui m’as appris comment travailler avec les animaux, toujours dans la bonne humeur. Merci pour les discussions, scientifiques ou pas, que nous avons eu ensemble.

Un grand merci pour tous mes amis au labo Shyue-Fang, Gaili, Lu, Céline CHERY, Rémi HOULGATTE, Isabelle KOSCINSKI, Aline CAZÉ, Dominique GUILLAUME, Catherine TAVERA, Catherine MASSON, Pierre ROUYER, Pierre FIHLINE, Sébastien, Pédro, Julien, Christine, Rose, Racha, Fereshteh, Jérémie, Jérôme, Zeinab, Khalid, Andréa, Eva, Sophie, Aurélie R, Aurélie S, David, Suzie, Justine, Elise, Brigitte, Véronique, Anaïs, pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et leur soutien.

Merci mon copain **Cyril PERRENOT**, on s’est connus depuis 2009 à Wuhan. Tu m’as vraiment beaucoup aidé dans tous les sens, le travail, la vie, l’émotion etc.

Un grand merci pour tous mes amis à CHU Brabois pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et leur soutien.

Je remercie les Professeurs **Zhisu LIU, Qun QIAN, Yufeng YUAN et Congqing JIANG** pour leur apprentissage et leur soutien !

Un grand merci pour tous mes amis à l’hôpital ZHONGNAN de l’Université de WUHAN pour tous les bons moments passés ensemble, leur bonne humeur et leur soutien.

Enfin, ma famille, Papa, Maman, ma femme Daisy, mes beaux-parents, beau-frère et sa femme et leur petit, je vous dédie cette thèse. Vous êtes mon bonheur. Je remercie pour votre grande présence malgré la distance qui nous sépare. Je vous aime énormément.

Un grand merci pour ‘China Scholarship Council (CSC)’ qui a financé ma thèse de doctorat. Le numéro de ma bourse est le 201308070048.

Liste de communications et de publications

Communications affichées :

1. **Methyl donor deficiency during gestation and lactation produces hypertension in rats subsequently exposed to high fat diet**
Gained BEST POSTER in ESC 2016 Rome, Annual Congress of EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY (cf. Certificat dans la page suivante)
2. **Methionine synthase (*Mtr*) promote the development of cardiac hypertrophy and heart failure.**
ESC 2016 Rome, Annual Congress of EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY

Publications :

1. **Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet.**
Anaïs Bison, Aude Bressenot, **Zhen Li**, Illef Elamouri, Eva Feigerlova, Lu Peng, Remi Houlgatte, Bernard Beck, Gregory Pourié, Jean-Marc Alberto, Remy Umoret, Guillaume Conroy, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant¹, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez
Scientific report. 2016
2. **Endoscopic and robotic parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism.**
Laurent Brunaud, **Zhen Li**, Klaas Van Den Heede, Thomas Cuny, Sam Van Slycke
Gland Surg. 2016 Jun;5(3):352-60. doi: 10.21037/gs.2016.01.06



BEST POSTER

RESEARCH ENTITLED

*Methyl donor deficiency during gestation and lactation produces hypertension in rats
subsequently exposed to high fat diet*

IS AWARDED AS ONE OF THE TOP SCORE ABSTRACTS IN THE TOPIC

Hypertension, other

CONGRATULATIONS TO

Zhen Li

PRESENTER OF THIS POSTER AT ESC CONGRESS 2016 IN ROME, ITALY

Fausto Pinto

FAUSTO PINTO
PRESIDENT
EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY



G. Derumeaux
GENEVIÈVE DERUMEAUX
CHAIRPERSON
ESC CONGRESS PROGRAMME COMMITTEE

Liste des abréviations

ADA	l'Association American du Diabètes
ADN	A cide D ésoxyribo n ucléique
AF/TBF	Abdominal Fat/Total Body Fat
AG	Acides Gras
AGL	Acides Gras Libres
AGT	Angiotensinogène
AHCY	Adénosyl-homocysteinase
ALDEPI	Adiposité Lipide Dystrophie EPIdemiologie
ANCOVA	ANalysis Of COVAriance
ANOVA	ANalysis Of VAriance
ANOVA	ANalysis of VAriance
AT1R	Angiotensin II receptor, vascular type 1
AT2R	Angiotensin II receptor, vascular type 2
ATP	Adénosine Triphosphate
ATP III	Adult Treatment Panel II
APRI	Aspartate aminotransférase-to-Platelet Ratio Index
BCA	BiCinchonique Acide
BHMT	betaïne homocysteine methyltransferase
BMI	Body Masse Index
BMP7	Protéine Morphogénétique osseuse(Bone)-7
BSA	Bovine Serum Albumin
CBS	Cystathionine- β -Synthase
CBS	Cystathionine beta-synthase
CD	les Clusters de Différenciation
CHEB0	Control Hyper Energétique vitamine B Zéro
CRP	Protéine C-Réactive
CT	Cholestérol Total
CTH	cystathionine gamma-lyase
DBP	Diastolic Blood Pressure
DEXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
DHF	Di-Hydro-Folate
DHFR	dihydrofolate reductase
DMR	Differentially methylated region,
DNMTs	ADN méthyltransférases

DOHaD	D evelopmental O rigins of H ealth and D isease,
DS	Dérivation Standard
dTMP	Désoxythymidylate monophosphate
dUMP	Désoxyuridilate monophosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ERR α	Estrogen Related Receptor α
ER α	Estrogen Receptor α
EWAS	Epigenome-Wide Association Study
FC	Femelle Control
FC_HE	Femelle Control Hyper-Energétique
FFAs	Free Fatty Acides
FMG	Monoglutamates de folate
FPG	Polyglutamates de folate
FPGS	Folypoly-gamma-glutamine synthétase
GCN5	General control nondepressible (ubiquitous histone acetyltransferase)
GCPII	Glutamate carboxypeptidase II
GGH	Gamma-glutamyl hydrolase
GIM	Metabotypes Influencé Génétiquement
GLUT	Glucose Transportor
GWAS	Genome-Wide Association Study
HbA1c	L'hémoglobine glyquée (fraction HbA1c)
Hcy	Homocystéine
HDL	High-Density Lipoprotein Cholesterol
HE	Hyper-Energétique
HES	Hématoxyline Eosine Safran
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance
IAP	particule A intracisternale
ICD-9	9th revision of the <i>International statistical classification of diseases and related health problems</i>
ID	Indice de Disposition d'insuline
IDF	International Diabetes Federation
IHTG	TriGlycérides IntraHépatique
IMC	Indice de Masse Corporelle
iMDD	initialement Méthyl Donor Déficient
IR	Insuline Résistance
IL1 β	Interleukine 1-bêta

J	Jour
LDL	Low-Density Lipoprotein Cholesterol
LINE1	Les longs éléments nucléaires intercalés-1
MAT	Méthionine Adénosyl Transférase
MMA	Acide méthylmalonique
MBP	Mean Blood Pressure
MC	Male Control
MC_HE	Male Control Hyper-Energétique
MDD	Déficiences de Donneurs Méthyle alimentaires
Me	Méthyle
Met	Méthionine
MetS	Metabolic syndrome
MHO	Metabolically Healthy Obese
MI	Microbiote Intestinal
MS	Méthionine Synthase
MTHFD	MéthylèneTetraHydroFolate Déshydrogénase
MTHFR	MéthylèneTetraHydroFolate Réductase
MTHFR	Méthylène Tétra-Hydro-Folate Réductase
MUO	Metabolically Unhealthy Obese
NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease (In English)
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NCEP	National Cholesterol Education Program
NFkB	Facteur Nucléaire chaîne-légère-kappa-activateur des cellules B activées
Nitro	Nitrocellulose
NOX2	le Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate oxydase (NADPH) oxydase 2
NOX4	le Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate oxydase (NADPH) oxydase 4
OMS	L'Organisation mondiale de la santé (En Français)
PAF	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate buffered saline
PCFT1	Transporteur du folate de protons couplés
PGC1- α	Proliferator activated receptor γ -Coactivator- α
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenyl-Methyl-SulFonyl
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PRMT1	P roteine arginine N- M ethyl t ransferase
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride

RAAS	Système Rénine Angiotensine Aldostérone
RCIU	Retard de la Croissance Intra-Utérine
RIA	Radio-ImmunoAssay
RIPA	Radio-ImmunoPrecipitation Assay
ROS	L'espèces réactives de l'oxygène (en français)
Rpm	Rotations Par Minute
SAH	S-Adénosyl-Homocystéine
SAM	S-Adénosyl-Méthionine
SAOS	Syndrome d'Apnée Obstructive du Sommeil
SBP	Systolic Blood Pressure
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophorese
SHMT	Sérine Hydroxy-Methylase
SHMT1	Sérine HydroxyMéthylTransférase 1
SIRT1	Silent Information Regulator 1
SM	Syndrome Métabolique
SNS	Système Nerveux Sympathique
T2DM	Diabète Mellitus Type 2
TAS	Tissue Adieux Sous-cutanée
TAV	Tissue Adieux Visceral
TBS-T	Tris Buffered Saline Tween
TCII	Trans-Cobalamine II
THF	Tétra-Hydro-Folate
TGFβ1	Le Facteur Transformant de croissance (Growth)-bêta 1
TMDS/TS	Thymidylate synthase
WHO	World Health Organisation (In English)

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'obésité morbide est souvent associée à une variété de complications métaboliques comme le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, les maladies cardio-vasculaires, et la stéatose hépatique. D'autres comorbidités graves associées peuvent aussi être présentes comme un syndrome d'apnée obstructive du sommeil, une démence, ou une incidence augmentée de cancer. La prévalence de l'obésité morbide et de ses complications a augmenté de façon significative depuis les années 1970. L'obésité est actuellement considérée comme ayant un impact négatif grave sur la santé des populations et est devenue une pandémie au niveau mondial.

L'obésité concerne aujourd'hui la quasi-totalité de la planète, y compris les nombreux pays émergents. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 35 % des adultes dans le monde sont actuellement atteints d'obésité ou de surpoids. Dans quasiment tous les pays de l'Union européenne, la durée de vie s'allonge et les écarts de survie entre hommes et femmes se réduisent. En 2050, un habitant sur trois serait âgé de 60 ans ou plus, contre un sur cinq en 2005. Un facteur important de cette augmentation de survie est la baisse de la mortalité par maladies cardio-vasculaires. Cette amélioration de la survie est probablement contrebalancée par l'augmentation spectaculaire des comorbidités liées à l'obésité, y compris le syndrome métabolique et ses composantes (Yusuf and Anand 2011). Les complications associées, en particulier le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, entraînent le décès d'au moins 2,8 millions personnes chaque année. En France, l'obésité concernait 15 % des adultes en 2012, contre seulement 6,1% en 1980. L'obésité entraîne des complications métaboliques dont les principales sont le diabète de type 2 (dans 80 % des cas, la maladie est associée à une obésité), l'hypertension artérielle, dyslipidémie, les atteintes cardiovasculaires, le syndrome d'apnée du sommeil et d'autres maladies respiratoires, ainsi que des maladies articulaires telles que l'arthrose. L'obésité entraîne aussi un risque accru de stéatohépatite non alcoolique (NASH).

L'obésité résulte d'un fort déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Il existe de différences individuelles qui font qu'à une alimentation similaire le métabolisme énergétique est différent. Les pathomécanismes de l'obésité et le rôle sur ses complications sont complexes et impliquent des dérèglements métaboliques et dysbiose intestinale, qui déclenchent une inflammation, un stress cellulaire et un remodelage des tissus cibles. Ces effets sont modulés par les prédictors génétiques et épigénomiques. Cependant, les origines de l'obésité sont multiples, y compris environnementaux et génétiques, et l'identification des facteurs impliqués dans son développement et son installation est loin d'être achevée.

De nombreuses études soutiennent le fait d'un rôle majeur de l'accumulation de graisse intra-abdominale (tissu adipeux viscéral, TVA) est la survenue plus fréquente des complications liées à l'obésité. De même, l'obésité centrale est fortement associée au risque de stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD); La NAFLD englobe un spectre qui va de la simple stéatose à la stéato-hépatite, avec une prévalence de 3-16% dans les populations européennes. Elle est présente dans 25 à 30% des patients atteints d'obésité et peut évoluer vers une cirrhose et un carcinome hépatocellulaire. Le TAV, qui est assez active au niveau lipolyse, draine directement au foie par la circulation portale, ainsi les hépatocytes sont exposés à des niveaux élevés de circulation des acides gras libres (AGL). Les AGL induisent une résistance à l'insuline en augmentant la production de glucose hépatique, et cet effet est destiné à disséminer dans le corps entier. Un autre facteur associé à ces anomalies est la dysbiose, celle-ci produit des endotoxines bactériennes, qui peuvent traverser la barrière intestinale pour se diriger vers le foie à travers de la circulation portale. En effet, une étude a montré que les toxines bactériennes provoquent un relargage des cytokines pro-inflammatoires, et contribuent à la NASH (Fontana et al. 2016).

A côté des facteurs métaboliques ci-dessus, la survenue d'un NASH est due à des facteurs génétiques dans 30 % des cas. Durant les 5 dernières années, plusieurs études d'association (genome-wide association study–GWAS–) ont cherché à identifier des facteurs génétiques associés à l'incidence de la stéatose hépatique non alcoolique. Plusieurs gènes candidats ont été identifiés. Parmi ces gènes, le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR- γ), l'adiponectine, la leptine et son récepteur, et le facteur de nécrose tumorale- α ont été rapportés (M. Li et al. 2012)(Rantalainen et al. 2011). Malgré ces résultats, en pratique courante il existe une variabilité génétique importante, et il est difficile d'arriver à faire des conclusions générales et il faut continuer à évaluer les patients au cas par cas(Stahl et al. 2012). En plus des études d'association de type GWAS, il est possible d'étudier l'état de méthylation de l'ADN à travers des études d'association de l'épigénome (epigenome-wide association studies –EWAS–) (Rakyan et al. 2011). Une récente étude EWAS a étudiée des sujets obèses avec 479 individus d'origine européenne et a montré une association entre l'augmentation de l'IMC et la méthylation accrue au niveau du locus HIF3A dans les cellules de sang et dans les tissus adipeux (Dick et al. 2014). De nombreux mécanismes d'interactions et des facteurs de confusion participent au lien entre la méthylation de l'ADN, l'expression des gènes et le métabolisme. De ce fait, il est impératif d'utiliser plusieurs approches génétiques pour arriver à des conclusions plus puissantes. Nous nous proposons d'utiliser une stratégie similaire pour l'analyse de EWAS / GWAS / et des facteurs métaboliques (Petersen et al. 2014).

Parallèlement, la survenue de l'obésité et ses complications sont aussi due à des facteurs environnementaux. Barker et al. fut le premier à mettre en évidence l'influence des facteurs environnementaux pendant le développement précoce sur la survenue de ces maladies dans l'âge adulte (Barker 1997)(Dolinoy et al. 2007). Le terme «programmation fœtale» est né pour illustrer cette hypothèse. Le retard de la croissance intra-utérine et le faible poids de naissance, sont souvent associés à la malnutrition protéique, et sont des facteurs de risque du diabète et du syndrome métabolique plus tard à l'âge adulte. Cette hypothèse a été soulevée par une série d'études épidémiologies. Alors, afin d'étudier son mécanisme, de nombreux chercheurs ont utilisés différentes méthodes de modèle animal avec retard de croissance intra-utérin pour étudier le mécanisme du développement et l'installation des maladies métaboliques. Cependant, peu d'études ont évalué les effets des carences en micronutriments sur l'incidence et la sévérité des comorbidités de l'obésité (García, Long, and Rosado 2009).

2 NOTIONS ÉLÉMENTAIRES ET RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Partie I : L'obésité et ses pathologies associées

2.1.1 L'obésité

D'après l'OMS, l'obésité est une accumulation anormale ou excessive de masse grasse qui a pour conséquence de nuire à la santé.

L'obésité est caractérisée par l'Indice de Masse Corporelle (IMC) qui a été défini par l'OMS comme un standard pour évaluer les risques liés au surpoids.

La formule de l'IMC est :

$$\text{IMC} = \frac{\text{Poids (kg)}}{\text{Taille}^2 \text{ (m)}}$$

Les valeurs

- Entre 18,5 et 24,9 correspondent à une corpulence normale
- 25-29,9 : surpoids
- 30-34,9 : obésité modérée (grade 1)
- 35-39,9 : obésité sévère (grade 2)
- > ou = 40 : obésité morbide (grade 3)

Chez les adultes l'IMC ne prend pas en compte l'âge et le sexe, ce qui n'est pas le cas chez les enfants. Le calcul reste le même mais les résultats doivent être interprétés en fonction du sexe à un diagramme de croissance pour les filles ou un diagramme de croissance pour les garçons.

Cet outil ne différencie pas la masse grasse et la masse maigre et n'identifie pas la distribution des graisses dans l'organisme.

C'est pour cela qu'on mesure un autre paramètre complétant l'IMC : c'est la mesure du tour de taille qui permet l'évaluation de la distribution de graisse corporelle. En effet, un excès de graisse au niveau de l'abdomen est souvent lié à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires, indépendamment de l'IMC.

L'obésité abdominale est définie lorsque le tour de taille est supérieur à 102cm chez l'homme et 88cm chez la femme (non enceinte). (Genser et al. 2016)

Il existe différents types d'obésité :

❖ L'obésité gynoïde

Dans cette situation l'excès de masse grasseuse et de tissu adipeux est surtout localisé au niveau du fessier, des cuisses et au niveau du bas des hanches. Ce type d'obésité concerne notamment les femmes. Il entraîne des problèmes articulaires comme l'arthrose ou des insuffisances veineuses comme des varices.

❖ L'obésité androïde

L'accumulation de graisse se fait au niveau du tronc et de l'abdomen. On l'apprécie par la mesure du tour de taille. Cette forme d'obésité est la plus dangereuse, en effet elle est directement liée à l'hypertension, le diabète et les maladies cardio-vasculaires.

L'obésité viscérale s'inclut dans cette catégorie, dans ce type d'obésité le gras s'accumule à l'intérieur de la cavité abdominale, autour des viscères plus particulièrement. La mesure du ratio du tour de taille/tour de hanche s'est introduit pour évaluer la distribution de graisse au niveau abdominal et de graisse au niveau du bas des hanches.

❖ L'obésité mixte

Cette forme d'obésité mélange les caractéristiques des deux autres types. Elle apparaît notamment lorsque l'IMC dépasse 40.

Des preuves croissantes indiquent que les définitions de l'Organisation Mondiale de la Santé du surpoids ($IMC > 25$) et l'obésité ($IMC > 30$) peuvent sous-estimer le véritable impact de la maladie. Ces seuils d'IMC sont dérivés de la population blanche et donc ne sont pas applicables directement aux patients asiatiques. Sur la base d'une méta-analyse des associations d'IMC présentant des facteurs de risque de maladie cardiovasculaire chez 240 000 adultes chinois, le Groupe de travail sur l'obésité en Chine a recommandé qu'un IMC de 18,5 à 23,9 devrait être considérée comme optimale, de 24,0 à 27,9 en surpoids, et 28,0 et au dessus comme obèses. Ces recommandations ont été utilisées dans les lignes directrices pour la prévention et le contrôle du surpoids et de l'obésité chez les adultes chinois. Ces critères sont également adaptés pour les asiatiques. (Y. Wu 2006)

2.1.1.1 Epidémiologie de l'obésité

L'obésité est devenue une pandémie mondiale et a fait l'objet de plus d'attention dans des dernières décennies en raison des nombreuses maladies chroniques associées. Pendant les 30 ans passés, l'IMC moyen a augmenté avec un taux de $0.4 \text{ kg} / \text{m}^2$ par décennie dans le monde entier (Finucane et al. 2011). La prévalence de l'obésité morbide (définie par un indice de masse corporelle $[IMC] > 40 \text{ kg} / \text{m}^2$) a presque doublé depuis 1980 (WHO fact Sheet 2013). Parmi les pays développés, les États-Unis ont la prévalence de l'obésité la plus importante, avec un tiers de la population ayant un IMC supérieur à 30 (Roland Sturm 2003). Même si la prévalence de l'obésité aux États-Unis a une tendance à se stabiliser après 2005, l'incidence de l'obésité sévère ($IMC > 35 \text{ kg} / \text{m}^2$) et morbide ($IMC > 40 \text{ kg} / \text{m}^2$) a continué d'augmenter. De 1986 à 2000, la prévalence des sujets avec un IMC supérieur à 40 a quadruplé et celle ayant un IMC supérieur à

50 a quintuplé (R Sturm and Hattori 2013)(R Sturm and Hattori 2013). En 2014, on estime que 1,9 milliard d'adultes étaient considérés en surpoids et plus de 600 millions étaient obèses, ce qui correspondait à une prévalence de plus de 13% de la population adulte dans le monde entier(Ng et al. 2014).

Parallèlement, cette prévalence augmentait aussi dans les pays européens, y compris la France. D'après l'enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité ObEpi-Roche 2012, 32,3 % des français de 18 ans et plus étaient en surpoids, 15 % étaient obèses dont 1,2 % présentaient une obésité morbide (IMC > 40 kg/m²) (cf annexe 1). La prévalence de l'obésité d'après cette étude était en augmentation depuis 1997 (8.5 % en 1997 et 15 % en 2012). Cela correspondait à une augmentation relative de 76 %.(ObEpi-Roche 2012)

En Chine, la prévalence de surpoids et d'obésité étaient de 24,1 % et de 2,8 % chez les hommes et 26,1 % et 5,0 % chez les femmes, respectivement. La prévalence de l'obésité centrale était de 16,1% chez les hommes et 37,6 % chez les femmes. Les prévalences de surpoids, d'obésité, et d'obésité centrale étaient plus élevées chez les résidents dans le nord de la Chine par rapport à leurs homologues du sud de la Chine. Il existait aussi un gradient entre les zones urbaines par rapport aux habitants des zones rurales. Bien que la prévalence de l'obésité en Chine soit relativement faible par rapport aux pays occidentaux tels que les Etats-Unis, où plus de la moitié des adultes sont en surpoids ou obèses, cette prévalence est en augmentation rapide, en particulier parmi les enfants, ce qui est particulièrement alarmant. Les données des enquêtes nationales chinoises sur la santé des enfants allant à l'école (7-18 ans) ont montré que la prévalence du surpoids et de l'obésité a augmenté respectivement de 28 fois et quatre fois entre 1985 et 2000, une tendance qui a été particulièrement marquée chez les garçons. (Y. Wu 2006)(Reynolds et al. 2007).

Cette augmentation de la prévalence de l'obésité et l'obésité morbide est probablement liée à une variété de facteurs comprenant le mode de vie sédentaire, l'apport calorique disproportionné, le stress, le statut socio-économique, qui sont associés à l'origine ethnique et sa susceptibilité génétique.

En fait, l'obésité représente l'une des principales causes de décès évitables. Les hommes et les femmes obèses ont un risque significativement plus élevé de développer le diabète de type 2 (T2DM) (S E Kahn 2001)(Chan et al. 1994). En fait, la prévalence du T2DM a augmenté en parallèle avec la prévalence élevée de l'obésité. Actuellement, le T2DM affecte environ 285 millions de personnes dans le monde, et ce chiffre sera probablement doublé en 2030 (Unwin, Gan, and Whiting 2010). D'ailleurs, le syndrome métabolique engendre également un plus grand

risque de développer le T2DM et les maladies cardiovasculaires, deux principales causes de décès dans le monde entier (O'Neill and O'Driscoll 2015).

2.1.1.2 L'obésité et la distribution du tissu adipeux

L'obésité est une maladie caractérisée par un excès d'adiposité corporelle et pour des raisons pratiques il est communément quantifié par l'indice de masse corporelle (IMC). L'IMC est une expression du poids corporel en tant que fonction non linéaire de la taille du sujet. Un IMC de $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ indique la présence d'une obésité et un IMC $\geq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$ permet de définir une obèse morbide (Tchernof and Després 2013).

Cependant, l'utilisation de l'IMC comme une mesure globale et objective suppose que le tissu adipeux des sujets aient une distribution uniforme dans tout le corps. En effet, l'IMC ne tient pas compte de la diversité topographique des dépôts de graisse dans le corps des individus différents. Ainsi, l'IMC n'est pas une mesure du tissu adipeux dysfonctionnel, ni une métrique précise de la maladie métabolique. En fait, une accumulation excessive et préférentielle des dépôts de graisse viscérale peuvent ne pas être nécessairement associés à un IMC élevé. Néanmoins, les dépôts de graisse viscérale sont fortement corrélés avec les perturbations métaboliques qui augmentent le risque des maladies cardio-vasculaires (Lapidus et al. 1984). Ainsi, de nombreuses personnes présentent une hyperglycémie, une insulino-résistance avec hyperinsulinémie, une dyslipidémie et une hypertension en dépit d'un corps de type maigre et un IMC normal. Ce phénotype est souvent dénommé "sujets métaboliquement obèses mais de poids normal" (N. B. Ruderman, Schneider, and Berchtold 1981)(N. Ruderman et al. 1998). Inversement, beaucoup d'individus sont classés comme obèses car leur IMC est supérieur à 35 mais ils ne présentent aucune des caractéristiques du syndrome métabolique. Ces patients ont un risque moyen de maladie cardiovasculaire équivalent à celui de la population générale et ce groupe de sujets a été appelé "Obèses Métaboliquement Sains." (Samocha-Bonet et al. 2014).

Par ailleurs, il a été démontré que la distribution du tissu adipeux dans la région sous-cutanée (TAS) est fréquente chez les femmes. Cette distribution correspond à une protection métabolique à l'inverse de l'obésité centrale ou intra-abdominale, qui est typique des hommes, et qui accompagne fréquemment le syndrome métabolique (Wajchenberg 2000)(Snijder et al. 2005). L'accumulation de graisse ectopique dans des organes tels que le foie, les muscles squelettiques, le cœur, les reins, le pancréas est associée à une augmentation des comorbidités métaboliques (Castro et al. 2014). Compte tenu de l'importance de la distribution des dépôts ectopiques de graisses dans les maladies métaboliques, le tour de taille est actuellement considéré comme un facteur prédictif plus fiable que l'IMC seul pour évaluer le risque cardiométabolique. Un tour de taille $\geq 88 \text{ cm}$ chez les femmes et $\geq 102 \text{ cm}$ chez les hommes est considéré comme un facteur de risque indépendant de développer une maladie cardiovasculaire et la dyslipidémie athérogène, et est aussi une mesure approximative du degré de résistance à l'insuline (Tchernof and Després

2013). Les raisons exactes qui expliquent l'impact des dépôts ectopiques du tissu adipeux dans les différentes régions du corps ne sont pas claires actuellement. Il existe des facteurs modifiables (par exemple, l'activité physique, l'état nutritionnel, l'hormone de croissance, les glucocorticoïdes, stéroïdes sexuels) et des facteurs non modifiables (tels que le sexe, l'âge, l'ethnicité et la susceptibilité génétique) qui semblent jouer un rôle (Tchernof and Després 2013).

Le tissu adipeux n'est plus considéré seulement comme un organe passif pour le stockage des triglycérides et en tant que source d'acides gras libres (AGL). Durant le développement des pré-adipocytes vers les adipocytes matures, les cellules acquièrent la capacité de sécréter des protéines, dont la plupart sont libérées comme des cytokines. Les adipocytes matures agissent comme un système endocrinien actif et paracrine, sécrétant toujours un nombre important de facteurs de croissance qui participent à divers processus métaboliques, en particulier la résistance à l'insuline. Les composés qui influencent les processus métaboliques et vasculaires sont la lipoprotéine lipase, la CETP, l'angiotensinogène, les facteurs du complément (adiposine ou complément D), l'adiponectine, la protéine stimulant l'acylation (ASP), l'IL-6, les prostaglandines, le TNF- α , une protéine/cytokine nouvellement identifiée connue comme facteur de différenciation des adipocytes, et comme récemment découvert, l'oxyde nitrique (Matsuzawa 2006).

Le tissu adipeux exerce des fonctions métaboliques et endocriniennes et se caractérise par une grande souplesse et de flexibilité. A l'inverse des adipocytes du tissu sous-cutané qui peuvent devenir à la fois hyperplasique et hypertrophique, le tissu adipeux viscéral (TAV) semble avoir lui une capacité limite de recrutement et de différenciation des nouvelles cellules adipeuses et semble plus enclin à développer des adipocytes hypertrophiques en dysfonctionnement (Jo et al. 2009). Ces adipocytes en dysfonctionnement provoquent une sécrétion altérée d'adipocytokines (ie, adipokines) et une libération élevée d'acides gras libres (AGL) dans la circulation qui conduit finalement à l'apparition d'une insulino-résistance liées à l'obésité qui reste le dénominateur commun du syndrome métabolique et d'autres troubles métabolique (Tchernof and Després 2013)(Björntorp 2016)(Virtue and Vidal-Puig 2010).

Un autre facteur essentiel impliqué dans les maladies métaboliques et l'insulino-résistance est la distribution de la graisse corporelle. L'obésité est souvent associée à l'IR ; cependant, la sensibilité à l'insuline varie considérablement chez les personnes maigres et chez les sujets obèses en raison de distribution différente de graisse corporelle (Tchernof and Després 2013). Les individus maigres avec un phénotype de distribution des graisses périphérique (c'est-à-dire TAS ou tissu adipeux sous-cutané) sont plus sensibles à l'insuline que les sujets obèses qui ont

une distribution des graisses principalement central (c'est-à-dire TAV ou tissu adipeux viscéral)(Kahn SE et al, Nature 2006). La distribution du tissu adipeux de type TAV est associée à une résistance plus importante à l'action antilipolytique de l'insuline, ce qui peut expliquer l'association entre la TAV, IR, et T2DM (Roden et al. 1996)(Fain et al. 2004).

2.1.1.3 Le tissu adipeux dans les maladies métaboliques

Le tissu adipeux affecte le métabolisme en libérant les AGL et les adipocytokines. La sécrétion excessive de certaines de ces cytokines peut agir comme un médiateur potentiel de l'inflammation conduisant à une insulino-résistance. (Figure 1)

Les facteurs ayant des effets délétères sur le métabolisme :

Les acides gras libres sont augmentés chez les patients présentant une obésité et un T2DM et ils sont fortement corrélés avec le niveau d'insulino-résistance (Steven E Kahn, Hull, and Utzschneider 2006)(Boden 2011). Les AGL ont une action anti-insuline et sont produits au cours du métabolisme des lipides. En atteignant les tissus sensibles à l'insuline, les concentrations élevées d'AGL engendrent une production accrue de glucose dans le foie et augmentent le stockage des lipides musculaires, qui conduisent à l'état d'insulino-résistance chez les T2DM patients (Boden 2011)(Robert H Eckel, Grundy, and Zimmet 2005). Chez l'obèse, qui est considéré comme un état inflammatoire de bas grade, la concentration circulants d'AGL élevée semble être positivement corrélé avec les taux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires, qui sont connus pour être associés à une IR et un T2DM (Boden 2011).

Une étude a démontré que l'obésité et le T2DM sont associés à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), et l'interleukine-6(IL-6) (Chakraborti 2015). Ces cytokines sont produites par les adipocytes parmi beaucoup d'autres types cellulaires et inhibent la signalisation de la sécrétion d'insuline qui à son tour favorise l'insulino-résistance. Le TNF- α peut également avoir un effet néfaste direct sur les cellules- β par une inhibition de la sécrétion d'insuline et en favorisant l'apoptose des cellules- β (Chakraborti 2015). Une association a été démontrée entre la voie de signalisation de l'IL-6 dans le tissu adipeux et IR, avec une corrélation positive entre les taux sériques d'IL-6 et le niveau d'IR (Bastard et al. 2006)(Hajer, van Haften, and Visseren 2008). Les autres cytokines comme l'IL-1 β , Résistine, Rétinol binding Protein-4, Visfatine, Plasminogen Activator-1 (PAI-1), Monocytes Chemoattractant Protein-1, fibrinogène et angiotensine sont produites de façon plus importante par le tissu adipeux chez l'obèse que chez les patients ayant un T2DM. Ces cytokines contribuent à l'inflammation, l'accumulation de lipides et participent au développement des

dysfonctionnements endothéliaux et donc de l'infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et des cardiomyopathies (Chakraborti 2015).

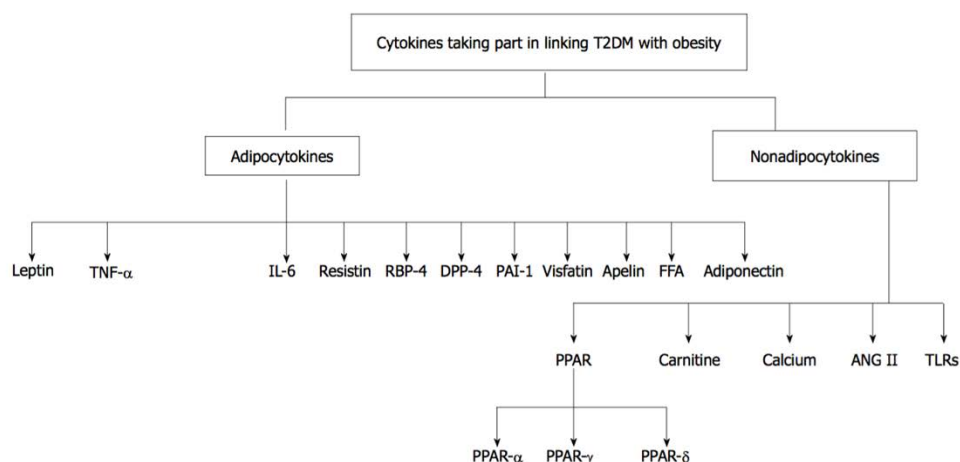


Figure 1. Les cytokines liées au T2DM et obésité.

(Modifié d'après Chakraborti 2015)

Les facteurs ayant des effets protecteurs sur le métabolisme :

La leptine est une adipocytokine qui réduit l'appétit et l'insulinorésistance ainsi que l'amélioration des troubles métaboliques associés à T2DM. L'augmentation de la sensibilité de l'insuline dans le tissu par la leptine peut être due à son action sur l'oxydation des AGL, conduisant à une diminution d'AGL dans la circulation(Hajer, van Haeften, and Visseren 2008). Contrairement à d'autres adipocytokines, les niveaux d'adiponectine sérique sont diminués chez l'obèse et chez T2DM. Cette cytokine a pour action de sensibiliser l'insuline et les anti-atherogéniques. Chez l'obèse et T2DM, cette adipocytokine stimule l'oxydation des AGL, et donc diminuent les concentrations des AGL plasmatiques, et réduisent l'accumulation de lipides en augmentant la sensibilité à l'insuline. L'adiponectine réduit la dysfonction endothéliale en augmentant la synthèse de l'oxyde nitrique et de diminue l'expression des molécules d'adhésion et empêche également l'athérosclérose en inhibant la LDL oxidation (Leon and Maddox 2015)(Shoelson, Lee, and Goldfine 2006). D'autres adipocytokines, tels que Apéline, semblent avoir des actions anti-obésité et antidiabétique, en raison de leurs éventuel rôles positifs dans le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline (Hajer, van Haeften, and Visseren 2008) .

2.1.1.4 Complication de l'obésité

Les complications de l'obésité sont de plusieurs types : métabolique, vasculaires, inflammatoire, néoplasiques, mécanique, psychologique, sociales. Un même organe peut être atteint par des mécanismes différents (par exemple, le cœur avec les troubles du rythme favorisés par une apnée du sommeil, avec l'insuffisance ventriculaire gauche liée à une inflation adipeuse, avec l'insuffisance coronaire en rapport avec les facteurs de risque cardiovasculaire). (C. Buffet et C. Vatier, Cahiers des ECN 2010)

Complications respiratoires

L'anomalie respiratoire principale des patients obèses est une diminution des volumes pulmonaire, principalement expiratoire (volume de réserve expiratoire et capacité résiduelle fonctionnelle) ; il existe également une diminution de la compliance thoracique, une diminution de l'efficacité des muscles respiratoires, une augmentation des résistances des voies aériennes, une augmentation du travail respiratoire (par augmentation de la consommation en O₂ et de la production de CO₂) et des anomalies de la commande ventilatoire.

- Dyspnée d'effort, secondaire :
 - à un syndrome restrictif ;
 - à un syndrome obésité-hypoventilation.
- Syndrome d'apnée du sommeil,
 - retrouvé dans plus de 25% des cas d'obésité sévère, responsable d'importantes répercussions sociales, facteur favorisant l'hypertension artérielle et l'hypertension artérielle pulmonaire ;
 - diagnostiqué par polysomnographie.
- Asthme
 - anomalies possible en spirométrie ;
 - anomalies gazométriques possible.

Complications cardiovasculaires

- Insuffisance coronarienne.
- Hypertrophie ventriculaire gauche.
- Insuffisance cardiaque.
- Accidents vasculaires cérébraux.
- Thromboses veineuses profondes, embolie pulmonaire.
- Insuffisance veineuse chronique et insuffisance lymphatique.

Complication hépatodigestives

- Lithiasse biliaire (plus fréquente chez la femme obèse).
- Stéatose hépatique (quasi constante dans l'obésité abdominale, exposant aux complications évolutives hépatiques) : NASH.
- Reflux gastro-oesophagien (fréquence).

Complications ostéoarticulaires

- Ces complications mécaniques sont dominées par :
 - la gonarthrose ;
 - les lombalgies.
- Elles sont responsables d'une altération de la qualité de vie et d'un handicap.
- Elles sont d'autant plus sévères que l'obésité est sévère.

Complication endocriniennes

- Hyperoestrogénie avec hyperplasie des seins et de l'endomètre.
- Dysovulation et hypofertilité, indépendamment du syndrome des ovaires polykystique.

Cancer

- Cancer du sein, de l'endomètre, des ovaires.
- Cancer colorectal.
- Cancer de la prostate.
- Cancer des voies biliaire.

Autres

- Risque anesthésique et péri-opératoire.
- Troubles de la circulation de retour avec incidents veinolymphatiques et répercussions dermatologiques à type de dermoépidermite.
- Problèmes cutanés : intertrigo, macération des plis, lésions des pieds, surinfections.
- Complication rénales avec glomérulosclérose segmentaire et focale.
- Complications urinaires à type d'incontinence.
- Hypertension intracrânienne.

Complications psychosociales

Ces complications sont considérables puisqu'elles contribuent à l'altération de la qualité de la vie, la gêne fonctionnelle, la discrimination sociale et aboutissent à la mésestime de soi et l'altération de l'image du corps.

L'invalidité est plus fréquente chez les obèses pour raison médicale.

Complications métaboliques (syndrome métabolique)

- Diabète de type 2 :
 - l'insulinorésistance est marquée dans l'obésité abdominale même modérée ; elle favorise le diabète.
 - La prévalence du diabète est multipliée par 3 chez les sujets obèses ;
 - 80% des diabétiques de type 2 sont obèses.
- Dyslipidémie : elles sont fréquentes dans l'obésité abdominale avec hypertriglycémie ou dyslipidémie mixte (baisse du HDL-cholestérol et augmentation des LDL, petites et denses, particulièrement athérogènes).
- Hypertension artérielle.
- Hyperuricémie.

2.1.2 Le Syndrome Métabolique

L'obésité est le critère principal du syndrome métabolique, terme proposé à la fin des années 1970, pour identifier un ensemble de facteurs interdépendants, comprenant l'obésité viscérale, la résistance à l'insuline (IR), l'hypertension et la dyslipidémie, qui ont été associés à un risque augmenté de développer un T2DM et des maladies cardiovasculaires (R. Kahn et al. 2005). Dans les années 1980, Reaven et al. a proposé que IR pourrait être le principal critère du syndrome, en argumentant que les sujets insulino-résistants pourraient développer un syndrome métabolique même si elles ne sont pas obèses (Reaven 1988). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Association American de Cardiologie ont ensuite reconnu le syndrome métabolique comme une entité clinique distincte avec son propre code (277,7) dans la classification ICD-9 de l'OMS (WHO 2013)(Grundy et al. 2004). Cependant, dans les années suivantes, d'autres scientifiques et les cliniciens ont contesté l'idée du syndrome métabolique comme entité clinique distincte. En 2012, une déclaration conjointe par l'Association American du Diabète (ADA) et l'Association Européenne pour l'Étude du Diabète a été particulièrement critique sur l'idée de considérer le syndrome métabolique comme une entité clinique distincte(R. Kahn et al. 2005). En particulier, cette déclaration a fait valoir que les définitions concernant le syndrome métabolique étaient en fait fondées sur des critères ambigus ou peu claires. Ainsi, les seuils utilisés pour définir les niveaux anormaux des composants individuels ne tiennent pas compte du continuum de risque associé avec les variations continues de glucose plasmatique, de la pression artérielle et des dyslipidémies. Cette déclaration a également remis en cause le syndrome métabolique dans son ensemble car il majorait la prédiction des maladies cardiovasculaires au-delà de la contribution des facteurs de risque des composants individuels.

Malgré cela, le syndrome métabolique continue d'être considéré comme une entité distincte par de nombreux chercheurs qui révèle le lien entre les maladies métaboliques et la résistance à l'insuline. Par ailleurs, les cliniciens et les cardiologues cliniques comptent de leur côté sur le syndrome métabolique pour l'évaluation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire chez les patients de façon individuelle. L'une des définitions les plus couramment utilisée du syndrome métabolique a été proposé en 2001 par le Programme National Cholesterol Education (NCEP)- Adult Treatment Panel III (ATP III) et comprend des critères tels que : tour de taille (waist circumference), triglycérides, HDL-cholestérol, la pression artérielle et la glycémie à jeun. La présence de niveaux anormaux de 3 parmi ces 5 variables est utilisée pour le diagnostic de syndrome métabolique (Grundy et al. 2005)(Genser et al. 2016)(Tableau 1).

La définition du syndrome métabolique par la Fédération Internationale du Diabète (IDF) diffère légèrement de celle de NCEP-ATP III parce qu'elle recommande l'examen d'un seuil

différent pour le tour de taille selon l'appartenance ethnique de l'individu. Ceci est basé sur le fait que les personnes d'origine asiatique peuvent avoir une obésité abdominale et un risque élevé de maladie cardiovasculaire à des niveaux d'IMC inférieurs par rapport aux personnes d'autres ethnicités. (International Diabetes Federation 2006) En utilisant la définition NCEP-ATP III, la prévalence du syndrome métabolique chez les adultes américains a été estimée entre 22 % à 34 % et jusqu'à 39 % en utilisant les critères d'IDF (Ford, Giles, and Dietz 2002) (Ford 2005).

Tableau 1. Les critères du diagnostic du syndrome métabolique.
(Modifié d'après le consensus définitions du SM : NCEOP/ATP III, IDF 2009)

Table 1 Criteria for diagnosis of metabolic syndrome according to National Cholesterol Education Program–Third Adult Treatment Panel, International Diabetes Federation, World Health Organization			
	NCEP: ATP III	IDF	WHO
Criteria	Three of the Following:	Central Obesity (as WC Gender/Ethnicity-Specific) + 2 of the Following:	Hyperinsulinemia + 2 of the Following:
waist circumference (cm/inches)	>102/40 in men >88/35 in women	>94/37 in men >80/31.5 in women	>94/37 in men and/or BMI >30 kg/m ²
Triglycerides	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL
Cholesterol-HDL	<40 mg/dL men <50 mg/dL women	<40 mg/dL men <50 mg/dL women	<35 mg/dL men <39 mg/dL women
Blood pressure	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥140/90 mm Hg
Fasting plasma glucose	≥110 mg/dL	FPG ≥5.6 mmol/L or T2DM	—
Microalbuminuria	—	—	>30 mg/g

2.1.2.1 Physiopathologie du Syndrome Métabolique

Des études prospectives ont montré que le risque relatif de développer des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques chez des patients atteints du syndrome métabolique est deux fois plus élevée que dans la population générale. Le risque de développer un T2DM est environ 5 fois plus élevée (Lakka et al. 2002)(Isomaa et al. 2001)(Hu et al. 2004)(Alexander et al. 2003)(Ford 2004)(R. Kahn et al. 2005). Une alimentation riche en lipides et glucides contribue à l'émergence de 2 des facteurs essentiels pour le diagnostic du syndrome métabolique: l'obésité viscérale et une résistance à l'insuline (IR). Le tissu adipeux viscéral (TAV) contient des adipocytes hypertrophique et dysfonctionnelles qui déclenchent une activité lipolytique augmentée et cela peut entraîner une forte libération d'acide gras libre (AGL) dans la circulation splanchnique, atteignant ainsi directement le foie (R H Eckel 1989). Par ailleurs, il peut y avoir aussi des adipocytes périphériques qui ont dépassé leur capacité et ne sont plus capables de stocker les triglycérides. Les triglycérides sont alors déposés dans d'autres tissus en dehors du

tissu adipeux (principalement dans le foie et le muscle squelettique) favorisant ainsi la résistance à l'insuline hépatique et périphérique.

L'augmentation du flux d'AGL vers le foie provoque une augmentation de néoglucogenèse hépatique contribuant au développement d'une hyperglycémie et d'une résistance à l'insuline (Jensen et al. 1989)(Y.-B. Kim, Shulman, and Kahn 2002). En dehors de ce mécanisme, les taux circulants élevés d'AGL induisent la synthèse des triglycérides hépatiques conduisant à une hypertriglycémie et une surproduction de lipoprotéines de très faible densité (LDL), riches en Apo B et triglycerides (Manzato et al. 1993). Dans le cadre de l'hypertriglycémie, LDL et HDL cholestérol subissent des altérations de leur composition. Le LDL cholestérol et les triglycérides augmentent la consommation des phospholipides, et du cholestérol estérifié et non estérifié. Par conséquent, les particules de LDL deviennent plus petites et plus denses, et potentiellement de plus en plus athérogène (Halle et al. 1999)(Kwiterovich 2002)(Robert H. Eckel et al. 2010). En fait, les taux sériques réduits d'HDL cholestérol, des taux élevés de triglycérides et de petites particules denses de LDL cholestérol représentent le profil lipidique typiquement observé dans la dyslipidémie associée au syndrome métabolique.

L'hypertension est aussi l'un des composants du syndrome métabolique. Les adipocytes sont capables de produire plusieurs peptides biologiquement actifs, y compris l'angiotensinogène, l'enzyme de conversion de l'angiotensine et cathepsines. Le tissu adipeux étendu pourrait ainsi entraîner une augmentation de la production de l'angiotensinogène, qui à son tour pourrait conduire à l'apparition d'une hypertension artérielle associée à l'obésité. En outre, l'insulinorésistance pourrait également contribuer au développement de l'hypertension artérielle en raison de la réduction de la stimulation de l'oxyde nitrique, ce qui provoquerait une diminution de la vasodilatation (Egan, Greene, and Goodfriend 2001)(Higashi et al. 2001).

Le syndrome métabolique est considéré comme la conséquence d'un statut inflammatoire systémique et chronique. Des études ont démontré que l'obésité, le T2DM et le syndrome métabolique sont associés à l'inflammation tissulaire et systémique de bas grade dans le tissu adipeux, le foie, le pancréas, et l'intestin (Poitou et al. 2011)(Magalhaes et al. 2015)(Monteiro-Sepulveda et al. 2015)(Dalmas et al. 2014)(Esser et al. 2014). L'infiltration de cellules immunitaires y compris par les macrophages, les mastocytes, et les lymphocytes, a été trouvé dans les tissus ayant un profil pro-inflammatoire. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires qui interfèrent avec la signalisation de l'insuline dans les tissus sensibles à l'insuline, causant le dysfonctionnement des cellules- β , et par conséquent, un déficit d'insulino-sécrétion. Les patients obèses et ayant un T2DM montrent une augmentation de

nombre de globules blancs dans le sang, des taux plasmatiques de facteurs de coagulation (fibrinogène et PAI-1), de la protéine C-réactive (CRP), du sérum amyloïde A, et des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , et IL -6) (Hajer, van Haefen, and Visseren 2008). La surexpression de ces cytokines, et surtout la CRP, contribuent à l'inflammation systémique et à l'accumulation de lipides, qui à leur tour ont des effets délétères sur les vaisseaux sanguins, conduisant à un dysfonctionnement endothélial, l'infarctus du myocarde, la cardiomyopathie, et le décès dans la population générale ainsi que chez les patients présentant un syndrome métabolique (Leon and Maddox 2015). Ces marqueurs sont fortement associés à l'adiposité centrale, l'insulinorésistance et le syndrome métabolique (Esser et al. 2014)(Cox, West, and Cripps 2015).

2.1.2.2 Mécanismes liés au syndrome métabolique

2.1.2.2.1 Résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline est la base pathogénique qui pourrait induire les pathologies liées au syndrome métabolique. L'obésité est souvent accompagnée de composants du syndrome métabolique, c'est-à-dire de maladies métaboliques, qui sont souvent un T2DM ou une intolérance au glucose, une hypertension artérielle, des cardiomyopathies, une dyslipidémie, une NALFD, un risque de cancer etc... L'obésité, le T2DM, et les troubles cardiométaboliques sont associés à la résistance à l'insuline (Reaven 1988). Néanmoins, les sujets les plus obèses avec une résistance à l'insuline ne développent pas toujours une hyperglycémie. Physiologiquement, les cellules- β des îlots pancréatiques présentent des caractéristiques adaptatives permettant initialement une libération d'insuline accrue pour surmonter la résistance à l'insuline et de maintenir une glycémie normale. Cependant chez les patients atteints de T2DM, l'insulinorésistance n'est plus complètement compensée par les cellules- β (Taniguchi, Emanuelli, and Kahn 2006)(S E Kahn 2001).

La résistance à l'insuline est une perte de réaction de l'insuline dans les tissus normalement sensibles à l'insuline et caractérisé par un accès diminué de glucose dans les muscles et une néoglucogenèse augmenté dans le foie, entraînant une hyperglycémie à la fois à jeun et en postprandial. La résistance à l'insuline est considérée comme le plus important mécanisme physiopathologique reliant l'obésité et les maladies cardiométaboliques (Reaven 1988)(Taniguchi, Emanuelli, and Kahn 2006). La résistance à l'insuline a un impact systémique causant la dysfonction endothéliale artérielle, l'athérosclérose, l'augmentation de la lipolyse, la sarcopénie, une diminution de la masse osseuse, et la masse de cellule- β des îlots pancréatiques (Jo et al. 2009)(Genser et al. 2016).

Des études ont montré que le taux de sécrétion d'insuline basale et la production d'insuline en réponse à un test de tolérance au glucose par voie orale augmentait de manière linéaire avec un IMC augmenté (Ferrannini and Mari 2014). Une corrélation hyperbolique a été trouvée entre la fonction des cellules- β et de la sensibilité à l'insuline (S E Kahn et al. 1993). Par conséquent, chez le sujet ayant une insulino-résistance, la cellule- β doit initialement accroître sa libération d'insuline pour compenser et maintenir un état d'euglycémie (Porte 1996). Une défaillance des cellules- β est une condition essentielle pour le développement d'un diabète de type 2, alors que l'insulino-résistance dans le muscle squelettique est observée des décennies avant la défaillance des cellules- β et la présence de l'hyperglycémie (Lillioja et al. 1988). Les individus à haut risque d'insulino-résistance qui ont la tendance à développer un diabète montrent finalement une détérioration progressivement de la fonction des cellules- β au fil du temps, alors que les obèses "nonprogressors" peuvent maintenir une sécrétion d'insuline élevée qui compense l'insulino-résistance (sensibilité à l'insuline détériorée) (Warram et al. 1990). Cette capacité des cellules- β pour ajuster leur sécrétion en fonction du degré de résistance à l'insuline est évaluée par un indice de disposition (ID). L'ID est calculé par la production des cellules- β multipliée par la sensibilité de l'insuline. La courbe de disposition suit généralement une fonction hyperbolique; ceci implique que le produit de la sensibilité à l'insuline et la sécrétion devrait donner une constante pour un degré donné de la tolérance au glucose et à fournir ainsi une mesure de la fonction des cellules- β (S E Kahn et al. 1993).

La progression de la tolérance au glucose normale à une altération de la glycémie à jeun, puis une intolérance au glucose, et enfin, un T2DM, est probablement la conséquence de différents facteurs, y compris d'un régime hypercalorique, une insuffisance d'activité physique, et une prédisposition génétique. Dans une première phase de compensation, la résistance à l'insuline provoque une augmentation du taux global de sécrétion d'insuline induisant un hyperinsulinisme (Butler et al. 2003). Durant cette étape, une sécrétion d'insuline plus importante est principalement due à l'hyperplasie des cellules- β et dans une moindre mesure à une hypertrophie, contribuant à une masse d'îlots augmentée (Bonner-Weir 2000)(Maclean, Ch, and Ogilvie 1955). Par la suite, en raison de l'augmentation des taux de glucose, une perte de l'hyperinsulinisme stimulé par le glucose se développe, ce qui entraîne une incapacité à répondre rapidement aux incréments glycémiques. L'exposition prolongée à une hyperglycémie et une augmentation d'AGL circulaires favorisent alors une inflammation constante de bas grade qui conduit au stress du réticulum endoplasmique, une altération de la fonction mitochondriale, une libération accrue d'espèces oxygène réactives, et en fin un stress oxydatif dans les cellules- β . Le stress oxydatif dans les cellules- β est à son tour responsable des modifications observées dans le phénotype des

cellules- β , la différenciation et l'expression des gènes qui pourraient être responsables de la perte de ces sécrétions actions aiguës (Weir et al. 2001)(Prentki and Corkey 1996)(Jonas et al. 1999)(Ross Laybutt et al. 2002). Par ailleurs, une demande d'insuline élevée, causée par l'insulinorésistance, conduit à augmenter la co-sécrétion de l'insuline et du polypeptide amyloïde des îlots. La présence de polypeptide amyloïde avec une concentration élevée est toxique et contribue aussi à induire une apoptose des cellules- β (J. W. M. Höppener et al. 2008). Enfin, l'hyperglycémie chronique et l'aggravation d'IR provoque une diminution critique de la masse des cellules- β , puis conduit finalement au diabète de type 2 (Jo W M Höppener and Lips 2006).

A l'intérieur des cellules- β , les granules d'insuline prêtes pour la sécrétion sont ancrées à la membrane cellulaire. Lorsque le glucose se lie au transporteur de glucose isoforme GLUT2, ils fusionnent avec la membrane et sécrètent des granules d'insuline. Les sujets diabétiques perdent la capacité à sécréter rapidement de tels granules d'insuline déjà synthétisés et manquent donc de manière caractéristique la première phase de la sécrétion d'insuline en réponse à une charge de glucose. Bien que la perte de la sécrétion d'insuline soit plutôt considérée comme un déficit irréversible, la chirurgie bariatrique métabolique (BMS) a été montrée efficace pour restaurer rapidement la première phase de la sécrétion d'insuline en quelques semaines après l'opération (parfois en quelques heures), ce qui suggère que ce défaut est plutôt un phénomène réversible plutôt que d'un défaut structurel des cellules- β (S Salinari, Bertuzzi, and Asnaghi 2009)(Serenella Salinari et al. 2013).

2.1.2.2.2 Système Nerveux Sympathique

Des données récentes provenant d'études expérimentales et humaines ont relié l'obésité, le T2DM, et d'autres comorbidités métaboliques à une activation chronique du système nerveux sympathique (SNS). Ceci peut-être causée par différents types de stimulation (par exemple, l'apport alimentaire, l'hyperinsulinémie, la consommation de glucose, l'augmentation de l'adiposité, et l'hyperleptinémie). L'activation chronique du SNS conduit à une augmentation des sorties adrénergiques avec des niveaux de catécholamines et de glucocorticoïdes circulants élevés qui induisent une insulinorésistance. L'activation du SNS augmente la libération de glucose dans le foie, réduit l'insuline et augmente la libération de glucagon par le pancréas, et enfin augmente la lipolyse dans le tissu adipeux. Ces effets sont associés à la vasoconstriction des artères périphériques, ce qui entraîne également une diminution d'absorption au glucose dans muscle squelettique (Schlaich et al. 2015). Les effets de l'activation du SNS chronique peuvent donc prédisposer à l'IR, l'hypertension, une maladie rénale, et des dysfonctionnements

cardiaques (ie, dysfonction diastolique, l'hypertrophie du ventricule gauche) (Mancia G et al, J Hypertens 2007)(Mancia et al. 2007).

2.1.2.2.3 Mécanismes reliant l'intestin aux maladies métaboliques

Un nombre croissant de preuves se sont accumulées, en particulier dans la dernière décennie, pour soutenir le rôle de l'intestin dans les mécanismes de la régulation métabolique et dans la physiopathologie des troubles cardiométaboliques. Ces preuves proviennent d'études physiologiques ainsi que des enquêtes sur les mécanismes de perte de poids et l'amélioration de la glycémie après chirurgie bariatrique / métabolique. Le microbiote intestinal humain (MI) est une entité complexe composée de plus de 1000 espèces de micro-organismes comensaux, y compris bactéries, levures, champignons, virus, etc... (Palm, de Zoete, and Flavell 2015). Le microbiote intestinal est présent dans le tractus gastro-intestinal avec une concentration plus élevée dans l'iléon et du côlon. Dans des conditions physiologiques, le MI contribue à la maturation du système intestinal, à la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, la dégradation des polysaccharides non digestibles, et à jouer un rôle important dans la distribution des graisses corporelles et le contrôle de l'énergie homéostatique (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau 2010). Le MI est influencé par l'alimentation, le mode de vie, l'exercice physique, les antibiotiques, et le déterminisme génétique (J. Chen et al. 2015). Le microbiote intestinal module la récupération d'énergie à partir des fibres alimentaires, le stockage des graisses et des lipopolysaccharides (LPS), et la production d'acides gras à chaîne courte qui à son tour régule l'apport alimentaire, la signalisation de l'insuline et génère l'inflammation de bas grade chez l'hôte (Cox, West, and Cripps 2015)(Miele et al. 2015)(Tremaroli and Bäckhed 2012)(Caesar et al. 2015). Il est intéressant d'observer que les souris sans microbiote semblent être protégées de l'obésité et des altérations métaboliques induites par l'alimentation riche en graisses (Bäckhed et al. 2007). De plus, les souris transplantées avec MI isolés à partir de donneurs obèses développent aussi de la graisse corporelle et de l'IR (Turnbaugh et al. 2006)(Turnbaugh et al. 2008). L'administration de metformine chez les souris qui sont associée à la présence élevée d'*Akkermansia muciniphila* (bactérie mucine) (Everard et al. 2011) améliore la perte de poids, le contrôle glycémique et réduit l'inflammation systémique(Shin et al. 2014)(Everard et al. 2013). Chez humain, l'obésité et le T2DM ont été associés à une composition modifiée du MI avec plutôt une réduction de la diversité des germes et de la diversité des gènes présents (Le Chatelier et al. 2013)(Qin et al. 2012). Récemment, des études métabolomiques du plasma humain ont pu identifier des produits du MI, comme la triméthylamine-N-oxyde, impliqué dans l'athérogénèse et donc liée au risque cardiovasculaire (Z. Wang et al. 2011).

La perméabilité intestinale, une caractéristique de la barrière intestinale, régule le passage des molécules de la lumière dans l'interstitium. Cette fonction est finement régulée par le MI et d'autres facteurs locaux (Bischoff et al. 2014) . Dans les modèles de rongeurs avec obésité induite par l'alimentation (i.e., régime hyper gras), les modifications du MI sont associées à une altération de la perméabilité intestinale caractérisée par une expression réduite des protéines de jonctions (i.e., zonula occludens-1, occludines, Claudins) dans les cellules épithéliales intestinales et une augmentation du passage des nutriments et/ou des composants bactériens (par exemple, LPS) responsables de l'inflammation systémique et de l'IR (Cani et al. 2008). Conformément à ce modèle, la composition du MI modulée par des antibiotiques ou des prébiotiques/probiotiques chez les rongeurs améliore la perméabilité intestinale et réduit l'endotoxémie métabolique et la tolérance au glucose (Everard et al. 2011). Cependant, malgré ces résultats encourageants sur les modifications de la perméabilité intestinale et son impact sur l'inflammation systémique et tissulaire, le rôle du MI est encore mal caractérisé chez les patients ayant une obésité morbide (Vors et al. 2015).

2.1.3 Maladies associées à l'obésité et au Syndrome Métabolique

2.1.3.1 Syndrome Apnées Obstructives du Sommeil (SAOS)

L'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est liée à l'obésité et affecte 15% des hommes et 6% des femmes (Peppard et al. 2013). Le SAOS est caractérisée par une obstruction des voies aériennes pendant le sommeil, responsable d'une hypoxie chronique; ce qui conduit à l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et provoque un stress oxydatif, une inflammation systémique et tissulaire (tissu adipeux et le foie), et une sécrétion accrue d'adipocytokines pro-inflammatoires (Résistine, TNF- α , IL-6, Activateur du plasminogène-1). Ces perturbations se traduisent par une détérioration de la sensibilité à l'insuline et une dysfonction des cellules- β des îlots pancréatiques. Le SAOS est connu comme un facteur de risque indépendant important de maladies cardiovasculaires, de l'hypertension, du SM, et de T2DM (Foster et al. 2009)(Rajan and Greenberg 2015).

2.1.3.2 La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD)

2.1.3.2.1 Introduction NAFLD

L'obésité est très souvent associée à un spectre d'anormalités du foie reconnu sous le nom générique de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD : Nonalcoholic Fatty Liver Disease). Ces anomalies hépatiques se caractérisent par une augmentation des triglycérides intrahépatiques (IHTG) avec ou sans inflammation et/ou fibrose (NASH : Nonalcoholic Stéatohépatitis). Ce état peut évoluer à termes potentiellement vers la cirrhose (Elisabetta Bugianesi et al. 2002). Ce processus est la résultante du développement d'interactions complexes entre l'obésité, la résistance à l'insuline et l'inflammation. Par conséquent, la présence de NAFLD est associée à un risque élevé de développer un T2DM, une dyslipidémie (hyper triglycérides/hypo HDL-cholestérol) et une hypertension artérielle (Adams et al. 2005) (Fabbrini, Sullivan, and Klein 2010). (Figure 2)

2.1.3.2.2 Epidémiologie

Chez les sujets non obèses, la prévalence de la stéatose hépatique non alcoolique est très faible, généralement inférieure à 3 %)(Wanless and Lentz 1990). Toutefois, la stéatose hépatique chez les obèses et surtout les obésités morbides est significative. De grandes études suggèrent que NAFLD affecte plus de 80 % des patients obèses morbides. Encore plus significatif est que près de 15 % des patients obèses démontrent une maladie grave du foie, y compris avec une NASH ou une fibrose mise en évidence histologiquement (Subichin et al. 2015). Au cours des 20

dernières années, la NAFLD est devenue la maladie du foie la plus courante dans le monde occidental, dépassant les maladies du foie alcoolique et virale (Clark 2006).

2.1.3.2.3 Physiopathologie

La caractéristique de NAFLD est initialement une stéatose. L'augmentation des triglycérides intrahépatiques (IHTG) ou stéatose, a été défini histologiquement comme un contenu d'IHTG >5% du volume du foie ou du poids du foie (5% ou plus des hépatocytes contiennent des triglycérides intracellulaires visibles) (Hoyumpa et al. 1975)(Hoyumpa AM Jr, Greene HL, Dunn GD 2010)(Kleiner et al. 2005). La stéatose se développe lorsque le taux d'entrée d'AGL est supérieure à la vitesse de sortie d'AGL (oxydation et la sécrétion). Par conséquent, la quantité de triglycérides dans les hépatocytes représente une interaction complexe entre: (1) absorption d'acide gras hépatique, dérivé des AGL plasmatiques; (2) synthèse de novo d'acides gras (lipogenèse de novo); (3) Oxydation des acides gras; et (4) l'exportation d'acides gras avec lipoprotéines de très basse densité (VLDL)-TG (Fabbrini, Sullivan, and Klein 2010).

Bien que de nombreux patients soient asymptomatiques, la NAFLD a le potentiel de progresser vers la NASH, la cirrhose, et même en phase terminale vers l'hépatocarcinome. En outre, la plupart des patients atteints de NAFLD ont des enzymes hépatiques normales, même dans le cadre de la NASH ou de la cirrhose (Uchil et al. 2009). Ces facteurs font qu'il est difficile de déterminer quels patients sont à risque de développer une maladie du foie progressive. Il est important de classer précisément ces patients parce que ceux avec NAFLD ont une mortalité accrue par rapport à ceux ayant un foie normal, même lorsque d'autres comorbidités sont contrôlées (Dam-Larsen et al. 2004)(Dunn et al. 2008). Il est maintenant reconnu que de nombreuses personnes déjà diagnostiquées avec une cirrhose sans étiologie correspondent en fait à une NASH progressive (Caldwell and Crespo 2004). Il n'est pas surprenant de voir que la NASH soit en pleine expansion comme indication de transplantation hépatique et puisse même dépasser l'hépatite virale avant 2030 (Agopian et al. 2012).

La NAFLD est de plus en plus considérée comme la manifestation hépatique de la résistance à l'insuline et du syndrome métabolique (Gastaldelli 2010)(McCullough 2006). La résistance à l'insuline est extrêmement fréquente chez les obèses morbides, car l'indice de masse corporelle (IMC) est directement corrélé à l'IR (Bays et al. 2007). Dans le tissu adipeux périphérique, l'insuline entraîne une lipogenèse et empêche la lipolyse. Comme ces tissus deviennent résistants à l'insuline, l'effet anti-lipolytique de l'insuline diminue, ce qui entraîne une lipolyse et la libération d'acides gras (Arner 2002). L'augmentation des acides gras libres, ramené par le flux

de la veine porte, conduit à un dépôt d'acide gras hépatique et d'autres dépôt de graisse ectopique (Machado et al. 2012).

Le foie est aussi un organe clé dans la réponse inflammatoire aiguë. Le dépôt de lipides dans le foie et la toxicité de ces lipides provoquent un stress oxydatif systémique (E Bugianesi et al. 2005). Non seulement le tissu adipeux en excès est une source de cytokines inflammatoires, mais également le stress oxydatif systémique conduit à la libération hépatique de protéines inflammatoires, y compris la protéine C réactive, la fétuine A, l'interleukine (IL) -6, et le facteur de nécrose tumorale (TNF)-alpha (Park et al. 2004). Ces protéines provoquent un état inflammatoire à long terme qui ont des effets systémiques, y compris l'augmentation du taux de maladie coronarienne et d'AVC chez les patients atteints de syndrome métabolique (Weikert et al. 2008).

La surproduction de TNF-alpha en elle-même a aussi été associée au développement de NAFLD (Ahmed MH 2011). Le tissu adipeux des patients atteints de NAFLD et NASH présente une sécrétion accrue de ces cytokines inflammatoires et une sus-expression de gènes qui régulent l'inflammation par rapport aux tissus adipeux de sujets contrôles (Du Plessis et al. 2015). A l'inverse, l'adiponectine qui est une protéine anti-inflammatoire et antifibrosante a été retrouvée à des taux très bas et directement associée à la stéatose et à la NASH, indépendamment de l'insulino-résistance (Gatselis et al. 2014)(Lemoine et al. 2009).

Cet état inflammatoire est probablement responsable de la progression de la NAFLD vers la NASH et même la cirrhose. L'inflammation et sa progression induit une inflammation lobulaire, des hépatocytes ballonnés, une apoptose, et des tissus de remodelage (fibrose) finalement. La plupart des patients atteints de NAFLD semblent seulement développer une stéatose simple et non progressive. Cependant, une fois l'inflammation hépatique constatée par une biopsie du foie, il y a une grande chance de voir un développement de NASH (Argo et al. 2009). Le déclencheur spécifique qui prédispose certains patients à NASH tandis que d'autres restent avec seulement avec une NAFLD modérée reste largement inconnu actuellement.

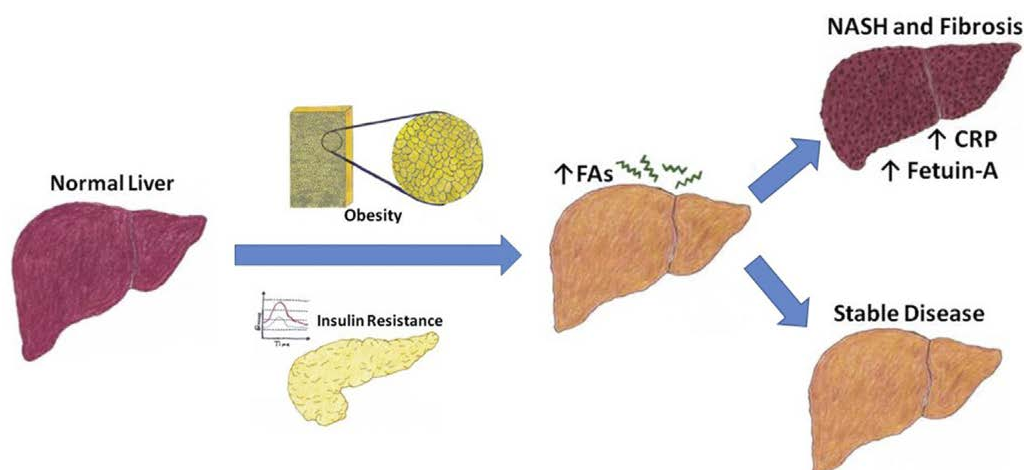


Figure 2. Physiopathologie de NAFLD.

(Le foie normal, après une exposition prolongée à des cytokines inflammatoires du tissu adipeux excessif et IR, commence à évoluer le dépôt de gras, ballonnement hépatocellulaire, et l'inflammation lobulaire). (Modifié d'après Jesse Clanton et al 2016)

2.1.3.3 Cardiomyopathie

2.1.3.3.1 Introduction cardiomyopathie

Les cardiomyopathies correspondent à un groupe de maladies dans lesquelles la caractéristique dominante est l'atteinte du muscle cardiaque lui-même. Dans des conditions physiologiques, l'insuline stimule l'absorption du glucose dans le muscle cardiaque, le muscle squelettique, le foie, le tissu adipeux et d'autres tissus métabolique pour maintenir le métabolisme du glucose (Isfort et al. 2014)(Adeghate and Singh 2014). L'insuline résistance et l'hyperinsulinémie sont souvent associés au syndrome métabolique cardio-rénal qui comprend une constellation de troubles cardiaques, rénaux et métaboliques (Jia et al. 2014). La première description clinique de la cardiomyopathie associée au T2DM a été publié en 1972 et a impliqué quatre patients atteints de diabète qui étaient morts de défaillance cardiaque (Rubler et al. 1972). La dissection anatomique a révélé une forme de cardiomyopathie caractérisée par une structure anormale du myocarde, mais aucun signe de maladie coronarienne, d'hypertension ou d'autres facteurs connus pour induire une défaillance cardiaque (Maisch, Alter, and Pankuweit 2011)(Voulgari, Papadogiannis, and Tentolouris 2010). Le terme « cardiomyopathie diabétique » a été proposé pour distinguer les changements physiopathologiques observés chez ces patients avec d'autres formes de cardiomyopathies (Factor, Minase, and Sonnenblick 1980)(Adeghate and Singh 2014). La cardiomyopathie diabétique a été définie comme une dysfonction ventriculaire gauche indépendamment des facteurs de risque reconnus, tels que la maladie coronaire ou l'hypertension (Falcão-Pires and Leite-Moreira 2012). Ce type de cardiomyopathie est le sujet de cette thèse car lié à l'obésité et au syndrome métabolique.

2.1.3.3.2Épidémiologie

La prévalence de l'insuffisance cardiaque est estimée à 22 % des patients atteints de diabète de type 2 (T2DM) (Roberts, Clark, and Witte 2009). Ces deux conditions ont tendance à coexister et l'impact de chacune sur l'autre correspond à un effet bidirectionnel en termes de causalité et de résultats (Wong et al. 2008)(Aroor, Mandavia, and Sowers 2012). L'étude cardiaque de Framingham a rapporté que 19 % des patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont un T2DM et que le risque d'insuffisance cardiaque augmente de deux à huit fois en présence d'un T2DM (Maisch, Alter, and Pankuweit 2011). En outre, une augmentation de 1 % de la valeur d'HbA_{1c} est associée à une augmentation de 8 % du risque d'insuffisance cardiaque, indépendamment de la pression artérielle, de l'IMC, de l'âge et de la présence d'une maladie coronaire (Witteles and Fowler 2008). A l'inverse, une réduction de valeur HbA_{1c} de 1 % est associée à un risque réduit de 16% pour développer une insuffisance cardiaque (Wong et al. 2008) .

2.1.3.3.3Physiopathologie

2.1.3.3.3.1 Troubles métaboliques systémiques

Dans les conditions physiologiques, le cœur peut utiliser à la fois des acides gras et du glucose comme substrats énergétiques, fournissant ainsi une flexibilité métabolique. L'absorption d'acides gras est médiée par le cluster de différenciation 36 (CD36) et translocase d'acide gras (FAT), tandis que la consommation de glucose se produit à travers le transport du glucose stimulé par l'insuline médiée par le transporteur de glucose 4 (GLUT4) (Dhalla et al. 1998)(Schaffer 1991). Les nutriments augmentent les taux plasmatiques d'insuline et de signalisation de l'insuline du myocarde, ce qui facilite la translocation de GLUT4 et CD36 au niveau du sarcolemme des myocytes pour fournir substrates énergétique du myocarde. (Aroor AR et al, Heart Fail. Clin. 2012). En revanche, dans les états d'IR et / ou T2DM, CD36 devient préférentiellement localisée à la sarcolemme, alors que GLUT4 est internalisé et retourne à son location intracellulaire (figure 3). (Mytas et al. 2009)

Le positionnement réciproque de GLUT4 et CD36 influence le développement d'anomalies métaboliques cardiaques caractérisées par inflexibilité métabolique (Battiprolu et al. 2013). Ainsi, l'absorption de glucose réduite en raison d'une IR cardiaque et systémique facilite un shift du substrat vers l'oxydation d'AGL entraînant une efficacité cardiaque réduite (Harmancey et al. 2012)(Aroor, Mandavia, and Sowers 2012). Au cours du stade avancé de la myocardiopathie diabétique, des molécules de transduction de signal impliquées dans la régulation de β -oxydation des acides gras (par exemple, proliférateur peroxysomes activateur récepteur- α (PPAR α) et proliférateur peroxysomes activateur récepteur gamma co-activateur 1 α (PGC-1 α)) sont

également diminués, ce qui amortit davantage l'efficacité métabolique du myocarde (Bugger and Abel 2014) (figure 3). La diminution de l'utilisation du glucose et une augmentation de la néoglucogenèse sont tous les deux associés au développement de la cardiomyopathie diabétique. L'hyperglycémie chronique altère la structure et la fonction cardiaque, par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui conduit à des lésions d'ADN et l'inhibition de l'activité de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) et la formation de produits terminaux de glycation (Jia et al. 2014). Ces produits terminaux de glycation pourraient avoir un rôle important dans le développement et la progression de cardiomyopathie diabétique, en stimulant l'expression du collagène et de l'accumulation et en favorisant la réticulation du collagène, ce qui conduit à une augmentation de la fibrose myocardique et la conformité réduite. (Regan 1983)

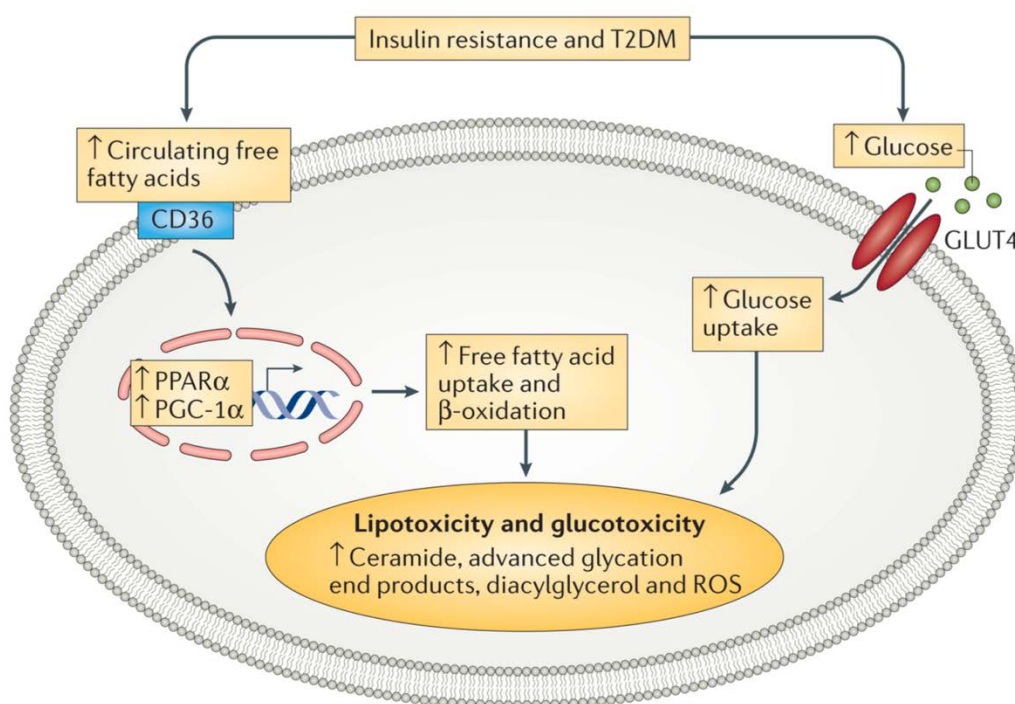


Figure 3. Insuline Résistance et le diabète de type 2 conduisent à des troubles métaboliques systémiques dans le cardiomyocyte. (Modifié d'après Jia G et al, 2016)

La combinaison de l'augmentation de la synthèse des lipides dans les hépatocytes et l'augmentation de la lipolyse des adipocytes élèvent la concentration d'AGL et de triglycérides circulants chez les patients présentant une IR et / ou T2DM (DeMarco, Aroor, and Sowers 2014). L'accumulation de lipides (lipotoxicité) peut directement entraver le métabolisme des myocytes et peut également favoriser l'apoptose des cardiomyocytes via une production accrue de ROS et du stress du réticulum endoplasmique. (J. Wang et al. 2006)

2.1.3.3.2 Anomalies des composants subcellulaires

Dans des conditions de consommation excessive de glucides et de matières grasses et avec une IR associée, le débordement des nutriments favorise un état d'augmentation de ROS, ce qui conduit potentiellement à des dommages oxydatifs mitochondriaux (J. Liu et al. 2009). Par conséquent, en présence de ROS générées à partir des mitochondries, les protéines, l'ADN et la membrane lipidique des composants sont endommagés et la fibrose modulée par l'accumulation de ROS favorise le dysfonctionnement diastolique qui peut évoluer vers l'insuffisance cardiaque. La production excessive de ROS exerce également des effets délétères sur le réticulum endoplasmique en altérant le repliement des protéines et d'autres modifications post-traductionnelles qui se produisent dans le réticulum endoplasmique rugueux (Factor et al. 1984). Le stress du réticulum endoplasmique résulte d'une réponse adaptative, appelée la réponse de la protéine dépliée, qui se traduit par une dégradation accrue par protéasome de protéines incorrectement pliées (Dhalla et al. 1998). À l'inverse, le stress du réticulum endoplasmique contribue également à un stress oxydatif du myocarde et la réduction de signalisation d'insuline par l'activation des kinases dépendant de l'état d'oxydo-réduction cellulaire (Hotamisligil 2008)(Henstridge, Whitham, and Febbraio 2014).

Le stress oxydatif et le stress réticulum endoplasmique peuvent induire des anomalies du métabolisme du calcium, ce qui conduit par la suite à une cardiomyopathie diabétique et la dysfonction diastolique. Les acylcarnitines à chaîne longue, ROS et le contenu anormal des lipides membranaires dans la membrane mitochondriale, tels que la cardiolipine, peuvent modifier le métabolisme de calcium en affectant différentes protéines de transport, ce qui conduit à une altération de l'absorption du calcium intracellulaire et une relaxation diastolique retardée (Falcão-Pires and Leite-Moreira 2012)(Fang, Prins, and Marwick 2004)(Jain et al. 2014). L'interaction de ROS, le stress du réticulum endoplasmique et le métabolisme anormal de calcium peut promouvoir un dysfonctionnement des composants subcellulaires et finalement provoquer une apoptose, une nécrose et de l'autophagie. (Adameova and Dhalla 2014)

2.1.3.3.3 Microcirculation coronaire

La microcirculation coronaire avec facultés affaiblies est fréquemment observée chez les patients présentant une IR, un T2DM et une cardiomyopathie diabétique (Factor et al. 1984). Cette altération est entraînée par des taux réduits de l'oxyde nitrique biodisponible (Paulus and Tschöpe 2013)(X. Zhou et al. 2010). Dans des conditions de sensibilité d'insuline réduite, à la fois la production d'oxyde nitrique se réduit et une augmentation de la dégradation de l'oxyde nitrique se produisent. L'oxyde nitrique induit habituellement une relaxation vasculaire.

2.1.3.3.4 Autres mécanismes

Comme indiqué dans le texte précédent, l'activation chronique du système nerveux sympathique lié à l'IR augmente l'expression et la signalisation β 1-adrénergiques, ce qui favorise l'hypertrophie des myocytes, la fibrose interstitielle et la fonction contractile réduite accompagnée d'une augmentation de l'apoptose des myocytes. D'ailleurs, l'augmentation de l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone dans les états d'IR ou de l'hyper-insulinémie a un rôle important dans la pathogenèse de diverses maladies cardio-vasculaires aussi, y compris la maladie coronarienne et l'insuffisance cardiaque (DeMarco, Aroor, and Sowers 2014) (Nistala and Sowers 2013). En outre, la suralimentation chronique induit des réponses immunitaires qui contribuent à l'inflammation de bas grade dans le tissu adipeux (Schaffer 1991). Des niveaux accrus de stockage d'acide gras libre et du tissu adipeux viscéral favorise l'expression de cytokines inflammatoires systémiques et cardiovasculaires.

Tous les mécanismes physiopathologiques présentés précédemment sont assemblés dans le figure au-dessous (figure 4).

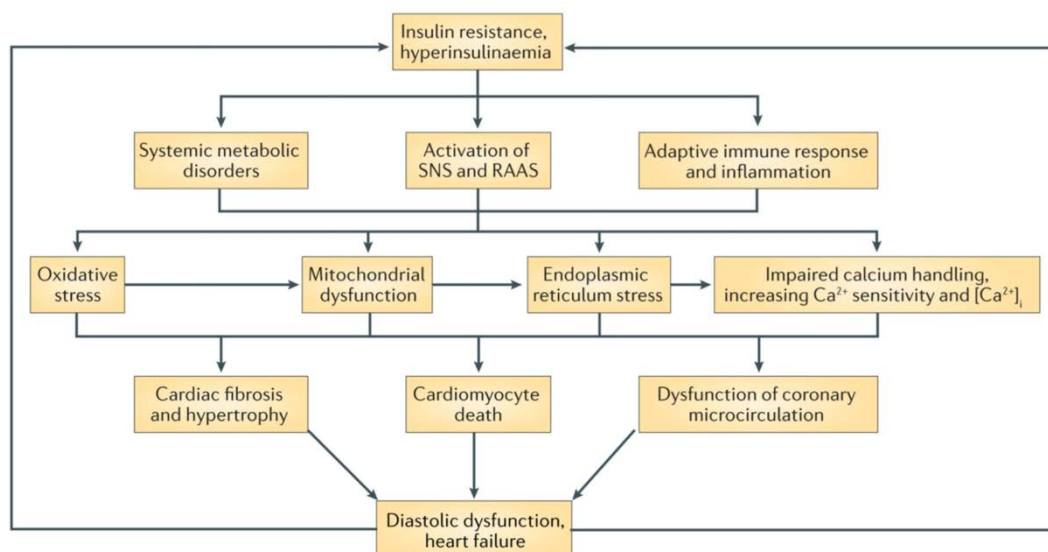


Figure 4. Le développement et la progression de la myocardiopathie diabétique. (Modifié d'après Jia G et al, 2016)

1.1 Partie II. Les donneurs de méthyles et le métabolisme des monocarbones, mécanismes épigénétiques/épigénomiques

1.1.1 Le métabolisme des monocarbones

1.1.1.1 Les folates

1.1.1.1.1 Définition et structure

Le terme «folates» est le nom générique pour la vitamine B9, nommée aussi acide ptéroylglutamique, elle est présente en majorité dans les végétaux foliacés, les haricots secs, les pois, la levure de boulanger, le foie, le jaune d'œuf, le jus d'orange, le pain complet, etc. Cependant, la teneur de cette vitamine diminue en cas de cuisson dépassant les 15 minutes, congélation et mise en conserve. Leur apport alimentaire est essentiel car l'organisme n'est pas capable de la synthétiser. Les apports nutritionnels conseillés journaliers (ANCI) en France varient dans la population selon l'âge, le sexe et le statut physiologique (grossesse), les valeurs sont détaillées dans le tableau supplémentaire 1 de l'annexe.

L'acide folique est une molécule conjuguée constituée d'une base de ptéridine attachée à l'acide para-amino-benzoïque et à un résidu d'acide glutamique (Figure 5). Les formes biologiquement actives sont les formes réduites : dihydrofolate (DHF) et acide tétrahydrofolate (THF). La fonction du tétrahydrofolate est le transport et le transfert de diverses formes d'unités monocarbone à des autres composés. Les groupes monocarbones peuvent être transportés sur les positions N5, N10 (voir les flèches) des folates réduits (voir l'exemple de 5-méthyltétrahydrofolate), ou bien, ils forment un pont entre ces deux molécules d'azote (voir l'exemple de 5,10-méthylènetétrahydrofolate). Les unités mono-carbone sont les suivantes : méthyle (CH₃), méthylène (-CH₂-), méthoxy (= CH-), formyle (-CHO-), ou des groupes formimino (CH = NH) (Guéant, Namour, et al. 2013).

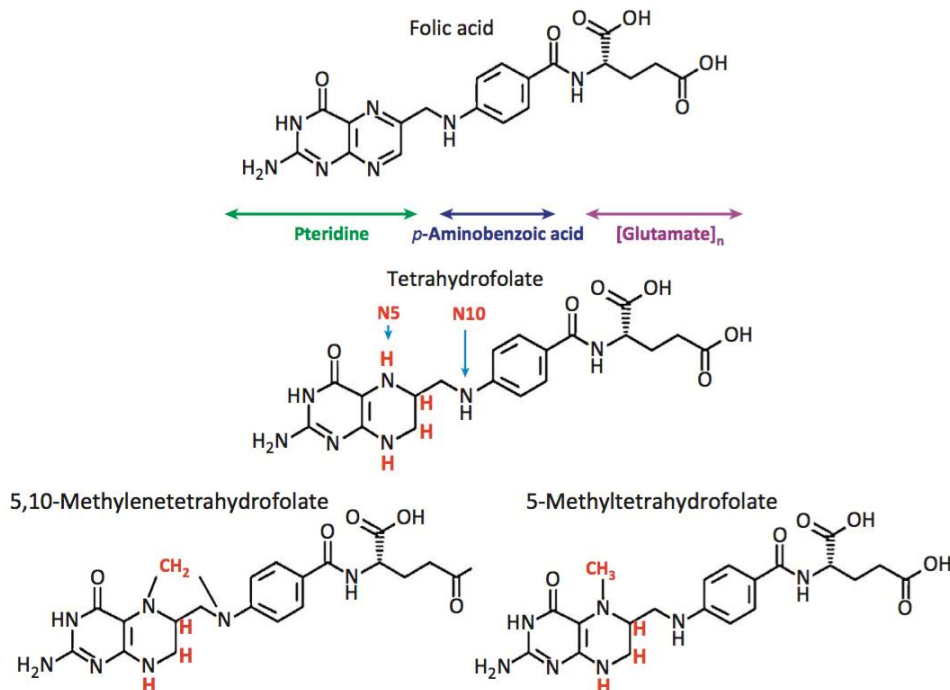


Figure 5. Structure chimique de folates.

(Modifié d'après JL Guéant et al, Trends in endocrinology and metabolism 2013)

1.1.1.1.2 Absorption et transport

La plus grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates (entre 1 et 7 résidus glutamates reliés au glutamyl). L'absorption se fait au niveau du duodénum et du jéjunum, après hydrolyse en mono glutamate. Il s'agit d'un processus actif saturable très dépendant du pH et du sodium. Le flux sanguin de la veine portale achemine l'acide ptéroylglutamique au foie où il est méthylé (Guilland and Lequeu 1992).

Les polyglutamates (FPG) sont hydrolysés en mono glutamates (FMG) par la glutamate carboxypeptidase II (GCPII), une enzyme spécifique présente dans la bordure en brosse de l'intestin grêle. Les mono glutamates sont ainsi absorbés grâce à leur liaison à son récepteur «proton-coupled folate transporter» (PCFT) au niveau de jéjunum proximal de l'intestin grêle en traversant la barrière intestinale. (Zhao et al, 2009) Trois systèmes de protéines de transport de folates sont impliqués dans l'absorption de folates dans le foie et dans les tissus périphériques : le RFC (Reduced Folate Carriers en anglais), le récepteur de folates (FRs) et le PCFT1 (Proton-Coupled folate Carrier). La polyglutamylation de folates est catalysée par l'folylpoly-gamma-glutamine synthétase (FPGS). A l'inverse, FPG peut être hydrolysé en FMG par la gamma-glutamyl hydrolase (GGH). Pour être métaboliquement active, la molécule ptéroylglutamate doit être réduite en deux étapes grâce à la dihydrofolate réductase, pour obtenir dans la première étape, le dihydrofolate, et ensuite le tétrahydrofolate (THF). (Guéant, Namour, et al. 2013) (Figure 6)

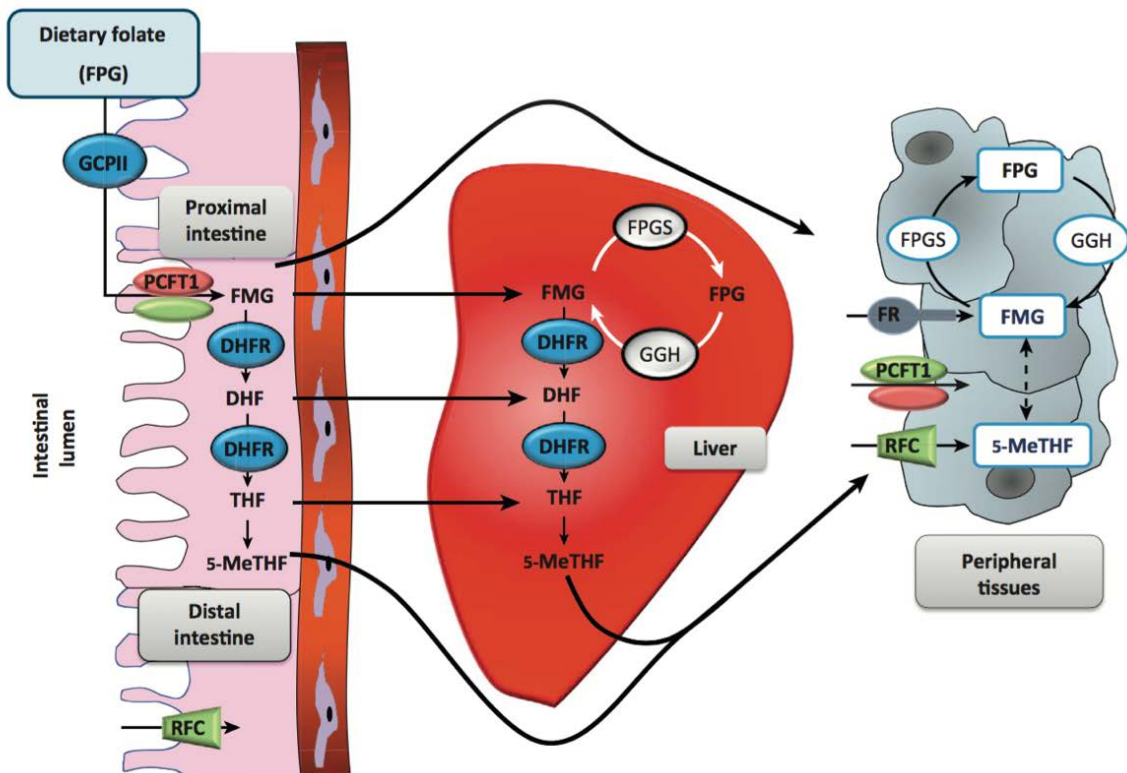


Figure 6. L'absorption de folates et sa distribution dans le foie et dans les tissus périphériques. (Modifié d'après JL Guéant et al, Trends in endocrinology and metabolism 2013)

1.1.1.1.3 Stockage et élimination

Les folates sont stockés principalement dans le foie, le reste est essentiellement contenu dans les érythrocytes et peut être récupéré lors de leur destruction (HERBERT 1962). Le foie contient la moitié des réserves en folates dans l'organisme (10 à 15mg), principalement sous forme 5-méthylTHF. Au premier passage, le foie capte entre 10 à 20 % des folates absorbés, tandis que le reste est distribué aux autres tissus, dites «à renouvellement rapide», essentiellement la moelle osseuse et les épithéliums (buccal, digestif et vaginal).

La concentration normale de folates sériques doit être supérieur à 7 nmol/L et la valeur normale de folates érythrocytaire doit être supérieur à 272 nmol/L, cette valeur varie légèrement en fonction de différentes techniques de dosage.

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

1.1.1.1.4 Son rôle

Leur rôle principal est d'apporter des groupements méthyles. En effet, le N⁵-méthylTHF transforme, dans le cycle de la transméthylation, l'homocystéine en méthionine grâce à l'action

de la méthionine synthase, dont le cofacteur est la vitamine B12. La transformation de la méthionine en S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) se fait grâce à l'addition d'une molécule d'ATP sous l'influence de la Méthionine-Adénosyl-Transférase (MAT). La SAM, principal donneur de groupements méthyles de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner naissance à la S-Adénosine-L-Homocystéine (SAH). Cette molécule est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la S-Adénosyl-L-Homocystéine Hydrolase (SAHH).

Les folates sont également impliqués dans la conversion de l'histidine en acide glutamique, et dans la conversion de sérine en glycine. Ces deux réactions s'effectuent dans le cytoplasme et nécessitent le THF qui sera lui-même transformé en N5,10-méthénylTHF ou N5,10-méthylèneTHF. Puis, ils sont impliqués dans la synthèse des bases pyrimidiques et puriques, celles-ci indispensables à la synthèse d'ADN. (Figure 7)

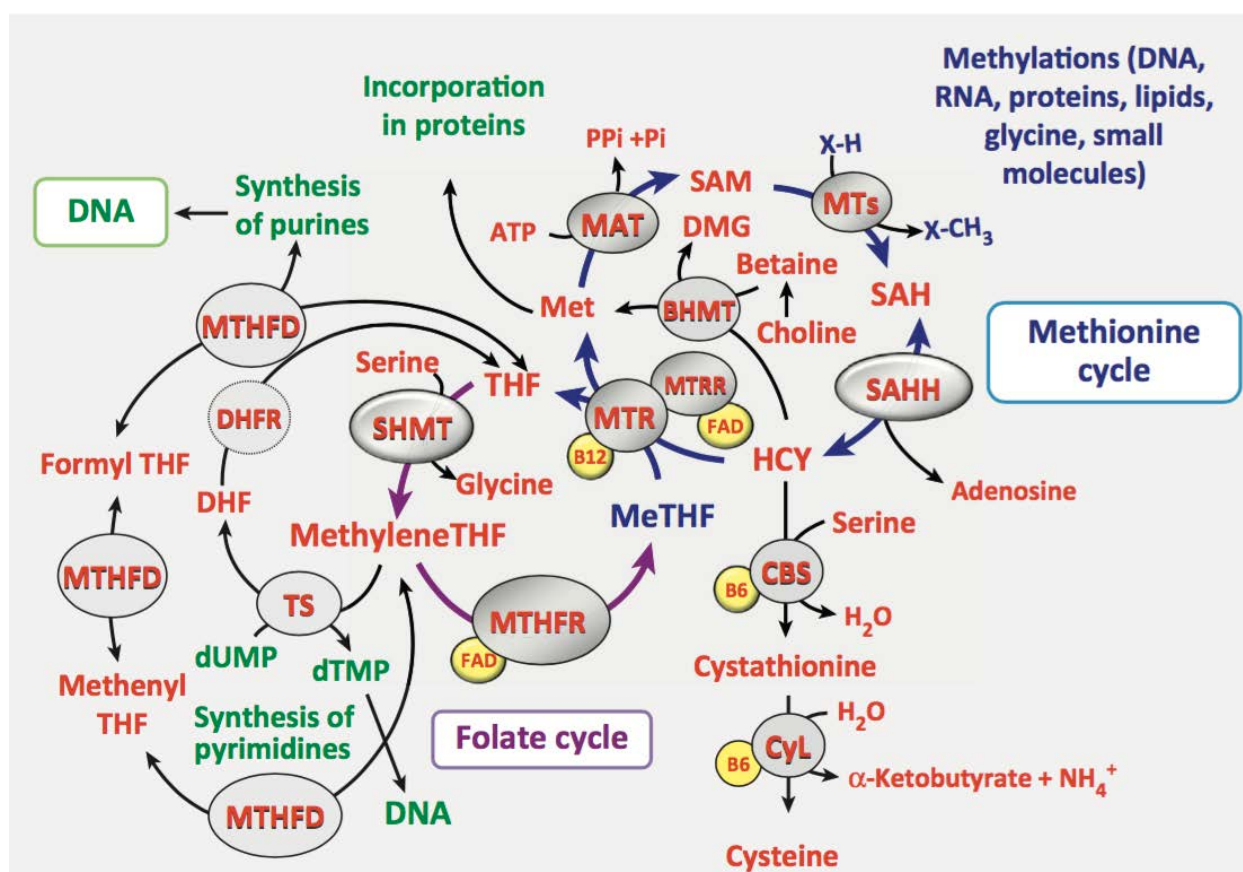


Figure 7. Les folates et le cycle de la méthionine.
(Modifié d'après JL Guéant et al, 2013)

1.1.1.2 Vitamine B12

1.1.1.2.1 Définition et structure

La vitamine B12 (Cobalamine/Cbl) est une vitamine hydrosoluble.. L'apport alimentaire est indispensable car l'organisme humain ne synthétise pas la vitamine B12. Cette vitamine est

présente principalement dans les aliments d'origine animale comme le foie, la viande, les volailles, le jaune d'œuf, les poissons, les crustacés, et les laitages. Les besoins physiologiques de vitamine B12 sont très faibles, et variables selon les périodes de la vie. Le tableau supplémentaire 2 détaille les apports nutritionnels conseillés journalière en vitamine B12 pour la population française.

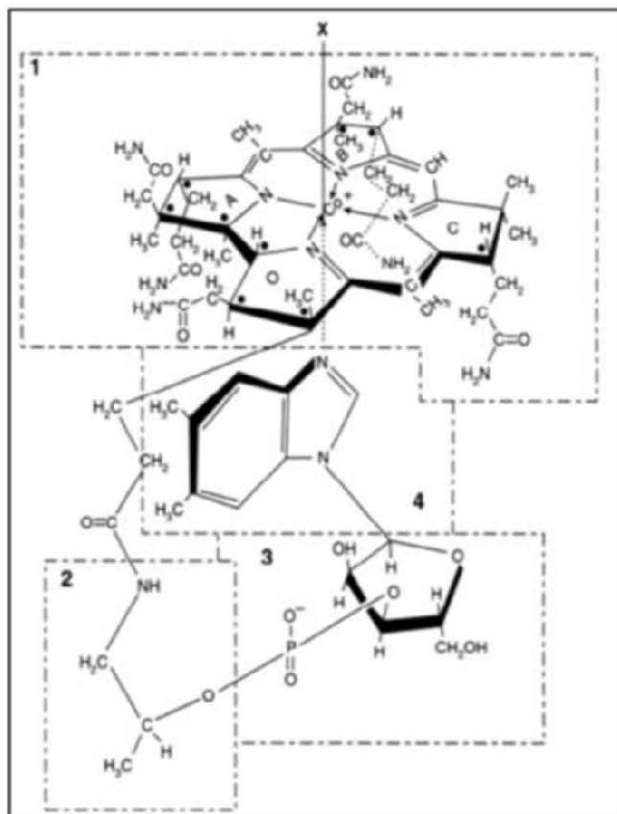
La vitamine B12 appartient à la famille des corrinoïdes. Elle est constituée d'un noyau corrine et d'un ribonucléotide reliés entre eux par un pont amino2- propanol Elle a une structure chimique proche de l'hème, ici l'atome de fer est remplacé par un atome de cobalt, d'où son nom : cobalamine. (Figure 8)

-Le ribonucléotide : il résulte de la condensation de la 5,6 - diméthylbenzimidazole (= base azotée) avec un sucre, le Ribose 3' phosphate. (Structure 3 et 4 dans la figure ci-dessous)

-Le noyau corrine : il est formé d'un atome central de Cobalt relié à 4 noyaux pyrroles ainsi qu'à un radical anionique variable (-R) lié sur Cobalt, dont la nature permettra de définir :

* La cyanocobalamine (-R = -CN), l'hydroxocobalamine (- R = -OH) : ces 2 composés sont à Co³⁺, forme circulent, stables et utilisés en thérapeutique.

* La méthylcobalamine/MeCbl (-R = -CH₃), et la 5'-désoxyadenosyl cobalamine/AdoCbl (- R = -5'd Ado) sont les formes actives, elles sont les coenzymes pour la méthionine synthase et la méthylmalonyl CoA mutase respectivement (avec Co¹⁺).



(1) Groupe tétrapyrrole, (2) amino-1-propanol-2, (3) Groupe ribose-3'-phosphate, (4) Groupe 5,6-diméthylbenzimidazole.

Figure 8. Structure chimique de la vitamine B12.
(Modifié d'après Guéant & Namour, 2003)

Le degré d'oxydation de l'atome de Cobalt, en 3 niveaux (tri-, bi-, ou monovalent), détermine les Cobalamines : Cob(I)alamine, Cob(II)alamine, Cob(III)alamine.

A l'état naturel, la vitamine B12 existe sous forme de cristaux ou de poudre cristalline de couleur rouge foncée, cette couleur provient du cobalt.

1.1.1.2.2 Absorption et transport

Dès son ingestion jusqu'à son internalisation dans les cellules, les cobalamines (Cbl) sont liées aux différentes protéines.

Lors de l'ingestion des aliments (au niveau de la bouche), la majorité des Cbl restent attachées aux protéines alimentaires, et on les trouve principalement sous forme d'AdoCbl et MeCbl. Au niveau de l'estomac, les Cbl sont libérées à partir des protéines alimentaires grâce à la sécrétion de chlorohydropepsines, et sont prises en charge par les haptocorrines salivaires (protéine R) en raison du pH acide du suc gastrique (Allen et al. 1978). L'haptocorrine aussi connue sous le nom de transcobalamine-1 (TCI) est codée par le gène TCN1. Il s'agit d'une glycoprotéine produite par les glandes salivaires. Sa fonction essentielle est protéger la vitamine B12 (cobalamine) de l'acidité lors de son passage dans l'estomac. Au niveau duodénal, le pH est plus neutre, permet la

séparation du complexe haptocorrine-cobalamine, grâce à l'action de protéases pancréatiques qui dégradent l'haptocorrine, et libèrent la cobalamine, cette dernière se lie, alors au facteur intrinsèque (FI) jusqu'à l'iléon où elle sera absorbée. L'FI est une glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac, qui va permettre à la cobalamine de franchir la barrière intestinale au niveau de l'iléon (Nicolas and Guéant 1995). Dans l'iléon distal, les complexes Cbl-FI se fixent à la cubiline, et la cobalamine se lie à la transcobalamine II (TCII) nécessaire au transport via le système porte. Il est nécessaire de mentionner que les cobalamines transportées vers le foie peuvent être sécrétées dans la bile sous forme de haptocorrine-cobalamine (Cbl protéine-R), ce qui est connu comme le cycle entéro-hépatique. (Figure 9) (El Kholty et al. 1991). Ce cycle représente 1.3ug de vitamine B12 par jour.

Au niveau sanguin la Cbl est liée à la transcobalamine II, cette protéine est la plus importante car elle fixe plus de 80 % de la vitamine B12 absorbée. Elle délivre la vitamine B12 aux cellules utilisatrices (moelle osseuse, foie, glandes endocrines) par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant. L'internalisation intracellulaire dans les tissus cibles est réalisée par endocytose, médiée par des récepteurs membranaires (Transcobalamine Receptor). Il s'agit du récepteur mégaline pour les reins et du récepteur CD320 pour le foie et les autres tissus. (W. Jiang et al. 2013) (Nielsen et al. 2012)

Dans les cellules périphériques, les complexes Cbl-TCII sont internalisés par endocytose et la Cbl libérée dans le compartiment lysosomal est transformée en MeCbl et AdoCbl. (Andrès et al. 2005)(Nielsen et al. 2012) (Figure 10) Pour traverser la membrane lysosomale, deux protéines sont impliquées – LMBD1 et ABCD4 (ATP-binding cassette transporter D4). (Coelho et al. 2012)(Guéant, Coelho, and Nicolas; 2014)

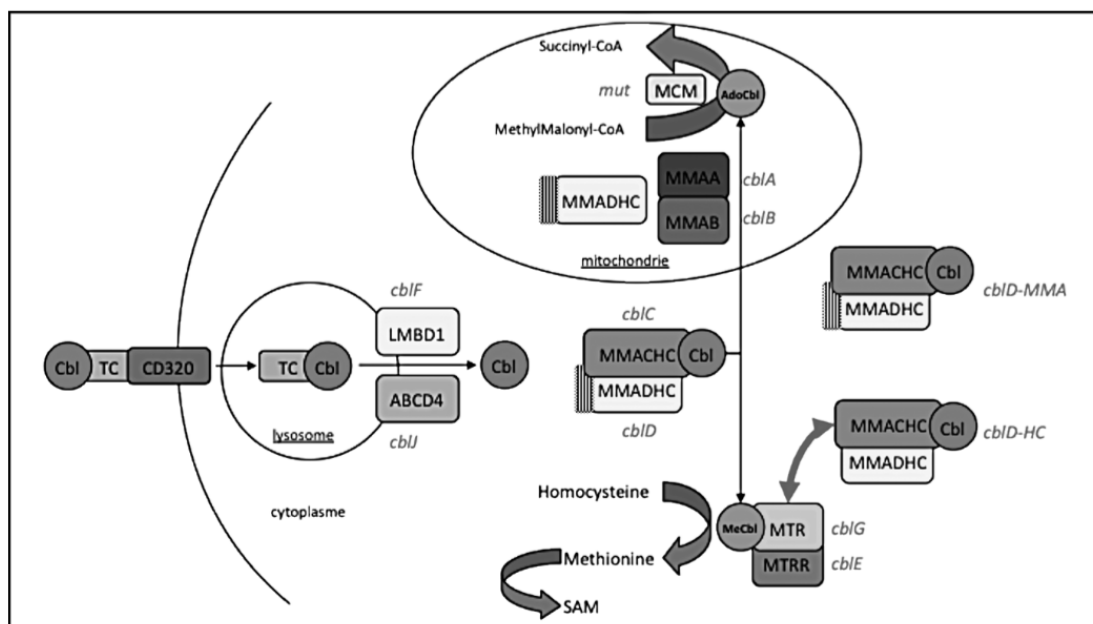
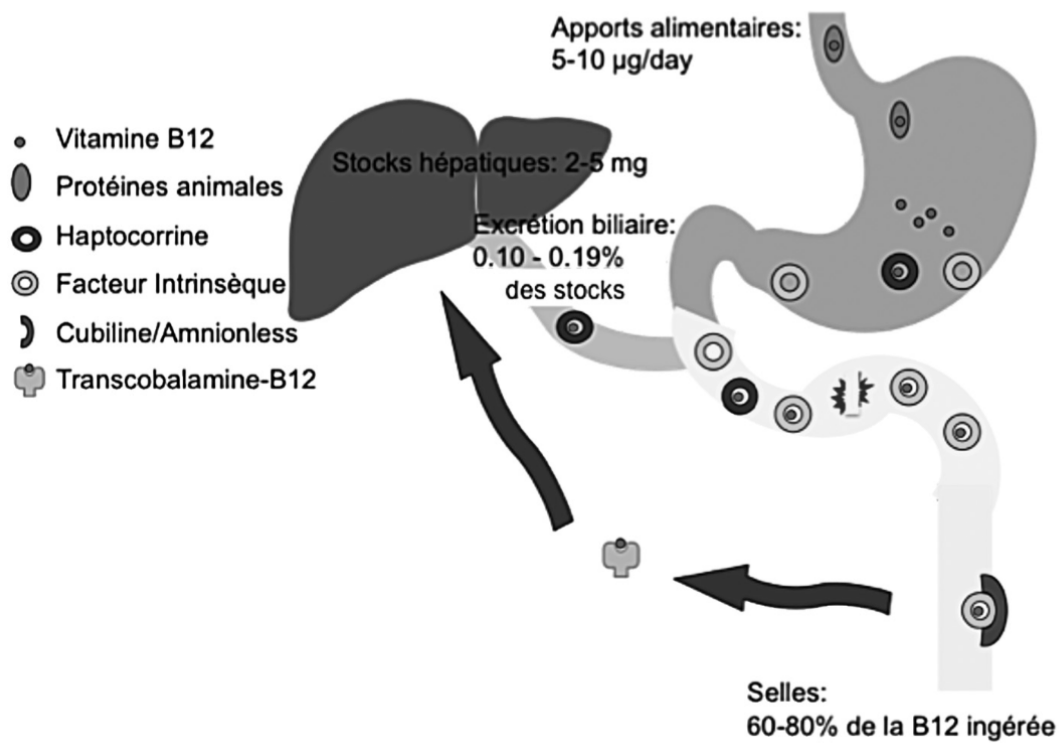


Figure 9. Processus d'absorption et transportation de la vitamine B12.
(Modifié d'après Jean-Louis Guéant et al, Bull Acad Natle Méd. 2014)

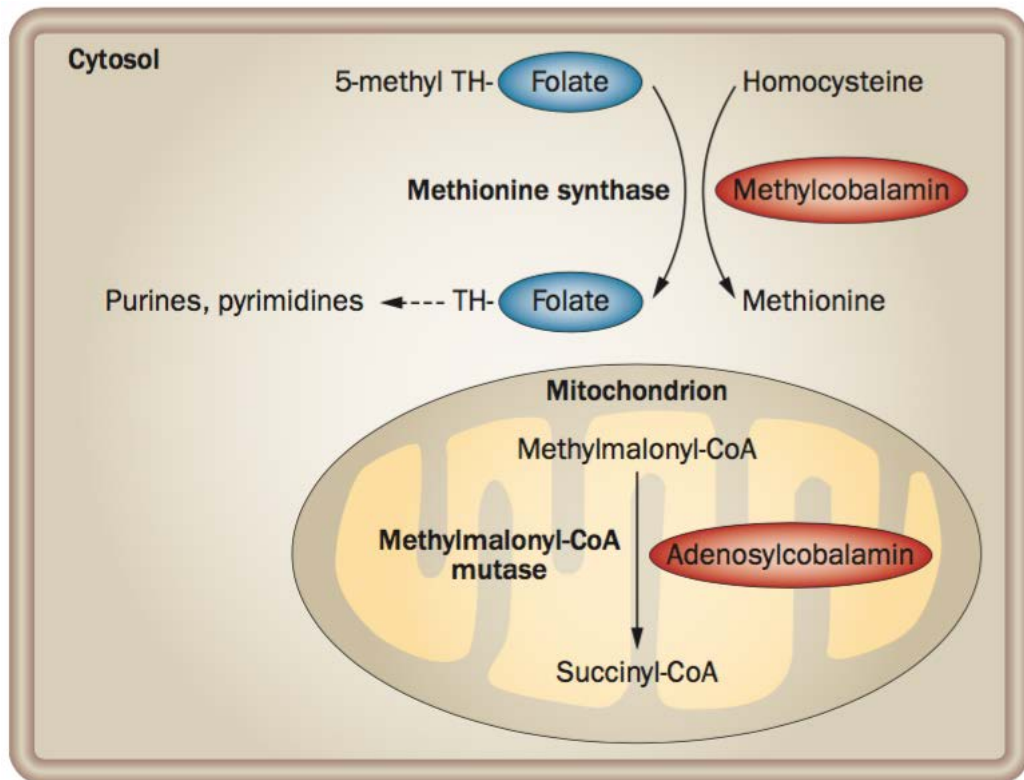


Figure 10. Transport et métabolisme de la Cobalamine.
(Modifié d'après Nielsen Marianne J et al, Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012)

1.1.1.2.3 Stockage et élimination

Les cobalamines sont stockées principalement dans le foie, le cœur et la rate. Chez l'homme, la réserve moyenne en Cbl est de 3 et 4 mg environ. Et, c'est le foie qui contient près de la moitié du stock. (El Kholty et al. 1991).

Les besoins physiologiques en vitamine B12 sont largement assurés (environ 3 à 4 ug/jour) car les apports quotidiens sont importants lors d'une alimentation normale. Une carence en vitamine B12 ne se manifesterait qu'après plusieurs années (3 à 4 ans) si l'apport de cette vitamine cesse brutalement (suite à une chirurgie bariatrique par exemple) car les réserves étant de 3 à 4 mg. La concentration en vitamine B12 sérique normale doit être supérieure à 150 pmol/L.

L'élimination quotidienne de la vitamine B12 est de 2 et 5 ug chez l'homme. Elle est assurée par la bile, les selles, les urines et la sueur.

1.1.1.2.4 Son rôle

Une fois cobalamine est transportée dans les cellules et libérée à partir de TCII, il prend son rôle dans deux réactions.

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

Au niveau mitochondrial, la cobalamine est réduite par la cobalamine adénosyltransférase en AdoCbl, grâce à une cobalamine réductase. L'AdoCbl est la coenzyme de la méthylmalonyl-CoA mutase, L'AdoCbl permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA, ce dernier intègre le cycle de Krebs et participe à la néoglucogénèse. (Kräutler 2005)

1.1.1.3 Le métabolisme de monocarbones

Les groupements monocarbonés, y compris méthyl-, méthylène- et formyle- sont générés par le cycle de folates. Cependant, ils ne peuvent pas être utilisés directement. Ils sont acheminés vers le cycle de la méthionine. Alors, deux cycles sont donc impliqués dans le métabolisme de monocarbones : le cycle des folates et le cycle de la méthionine (ou de l'homocystéine). Nous avons décrit précédemment le cycle de folates.

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

L'homocystéine est un acide aminé soufré dont le métabolisme se situe à l'intersection des deux voies : la voie de la reméthylation, vitamine B9 (N5-MeTHF) et vitamine B12 dépendant, et la voie de la transsulfuration, vitamine B6 (pyridoxal-5'-phosphate) dépendant.(J Selhub 1999) La voie de la reméthylation se croise avec le cycle des folates qui apportent un groupement méthyle, le N5-MeTHF. L'homocystéine formée à partir de la méthionine participe en amont à de nombreuses réactions de transméthylation S-adenosyl-méthionine dépendantes. (Refsum et al. 1998) En effet, la méthionine adénosyltransférase (MAT) transfère un groupement adénosyl à la méthionine (à partir de l'ATP) pour former la S-adenosyl-méthionine (SAM). La S-adenosyl-méthionine est le donneur universel de groupements méthyles dans l'organisme. Elle est libérée dans le cytosol des cellules. La réaction de transméthylation est catalysée par une méthyltransférase, la SAM apporte son groupement méthyle à une grande variété de molécules (protéines, lipides, ADN, histone, etc..) formant ainsi la SAH (S-adenosyl-homocystéine). La S-adenosyl-homocystéine est ensuite hydrolysée par la SAH-hydrolase (SAHH) pour former l'homocystéine (Hcy) et l'adénosine. Cette réaction est la seule réversible dans ce cycle. Le rapport SAM/SAH est un indicateur de la capacité de méthylation de la cellule.

L'homocystéine peut être métabolisée par trois enzymes en fonction de l'état d'équilibre de la méthionine. Lorsque la méthionine est en excès, l'homocystéine est irréversiblement convertie en cystéine dans la voie de trans-sulfuration, catalysée par la cystathionine β -synthase (CBS),

enzyme vitamine B6-dépendante. (Refsum et al. 1998) Dans le cas d'un équilibre en méthionine négatif, l'homocystéine est convertie en méthionine par deux voies afin de conserver le pool en méthionine. Tout d'abord, la voie bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) dans le foie et les reins,. Cette voie utilise la bétaine en tant que donneur de méthyle. Une grande partie de la bétaine dérive de la choline, puis, dans certains cas, elle est apportée par une supplémentation. La bétaine est un donneur de groupements méthyles, ces groupes sont transférés à la méthionine grâce à une méthyl –transférase, la BHMT. (Van den Veyver 2002) Cependant, la voie méthionine est la voie la plus importante, et présente dans la plupart des tissus, elle convertie la méthionine en homocystéine, grâce à la méthionine synthase (MS) en utilisant la vitamine B12 en tant que cofacteur et N5-MeTHF comme substrat. La production de N5-MeTHF est catalysée par la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR). (Oussalah, Guéant, and Peyrin-Biroulet 2011)

Il est bien établi que la régulation du métabolisme de l'homocystéine est modulée par l'état nutritionnel. Une diminution d'apport en méthionine alimentaire peut augmenter le nombre de cycles de transméthylation, alors qu'une augmentation de l'apport en méthionine alimentaire peut diminuer le cycle de la transméthylation et favoriser la voie de la trans-sulfuration. Cette capacité d'établir une discrimination entre les voies reméthylation et trans-sulfuration est un moyen d'adaptation cellulaire à des quantités variables de méthionine alimentaire, ceci implique fortement l'existence d'une régulation coordonnée entre ces deux voies. Des études suggèrent que cette coordination est assurée par au moins deux mécanismes. Le premier mécanisme est la capacité de la SAM d'agir à la fois comme un inhibiteur allostérique de la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), et comme un activateur de la cystathionine β -synthase. En tant que tel effecteur, un excès en SAM conduit à la suppression de la synthèse d'un substrat important, le N5-méthylTHF nécessaire pour la voie reméthylation et favorise la réaction initiale de trans-sulfuration. Le deuxième mécanisme par lequel la méthylation et trans-sulfuration sont coordonnés consiste en la régulation de la concentration intracellulaire des concentrations de SAM. (J Selhub 1999)

1.1.1.4 Les facteurs influençant le métabolisme de monocarbones

D'après le texte précédent, il est important de signaler que les folates, la vitamine B12, la méthionine, la bétaine et la choline sont de substances essentielles pour le maintien du métabolisme de monocarbones, et dont la biodisponibilité en monocarbones dépend d'un apport alimentaire suffisant en vitamines. Tous les événements aboutissant à une déficience ou à une

carence en donneurs de méthyles, y compris malabsorption, peuvent avoir un impact sur le métabolisme de monocarbone.

Les facteurs intrinsèques

L'âge et le sexe sont les facteurs intrinsèques qui peuvent influencer le métabolisme de monocarbone, et ainsi la concentration d'homocystéine. En effet, les personnes âgées ont des concentrations en Hcy plus élevées. (J Selhub et al. 1993) Les hommes ont une concentration en Hcy plus élevée comparée à celle de femmes. (Andersson et al. 1992)(Jacobsen et al. 1994)(De Bree et al. 2002)

Les facteurs liés au mode de vie et les facteurs liés à un état pathologique

La consommation régulière de nicotine, du café, et d'alcool favoriserait l'apparition d'une hyperhomocystéinémie (De Bree et al. 2002). Des études ont montré que l'alcool provoque une altération du métabolisme des monocarbone via une réduction de l'activité de la méthionine synthase et une modification de la voie de reméthylation (Barak and Beckenhauer 1988)(Kenyon, Nicolaou, and Gibbons 1998). Chez le rat, la consommation chronique d'alcool provoque également une baisse de l'hydroxycobalamine et de l'activité de la méthionine synthase (Waly, Kharbanda, and Deth 2011).

Certains médicaments peuvent également interagir avec le métabolisme de monocarbone et provoquer une hyperhomocystéinémie: le phénobarbital, des contraceptifs oraux (Shojania, Hornady, and Barnes 1968), des antibiotiques (Bactrim®), des hypoglycémifiants (sulfamides) et des médicaments anti-folates comme le méthotrexate (inhibiteur de la dihydrofolate réductase) (Jolivet, Faucher, and Pinard 1987).

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

Les facteurs environnementaux

L'exposition à certains cénobiotiques comme le plomb entraîne une hyperhomocystéinémie. (Iqbal 2012) Par ailleurs, l'exposition à la fumonisine B1, une mycotoxine alimentaire contaminant les céréales, combinée à un régime carencé en donneurs de méthyles, provoque une augmentation de la concentration d'Hcy plasmatique (Pellanda et al. 2012). D'autres mycotoxines

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

Les facteurs génétiques

Toutes les mutations affectant l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de monocarbones peuvent induire à une perturbation de ce métabolisme. Les polymorphismes (SNP) ou variantes génétiques de certains gènes ont comme conséquence une altération du métabolisme des monocarbones. En effet, les SNP les plus étudiés, sont ceux de gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme de monocarbones: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTHFR T1317C, MTR A2756G, MTRR A66G; (J Selhub 1999)(Martin et al. 2006)(Akar et al. 2000)(L. H. Chen et al. 1997)(Laraqui et al. 2007). Et ceux du métabolisme de la vitamine B12 : TCN2 C776G. (Namour et al. 2001).

A côté des variantes génétiques, il existe également de mutations ponctuelles avec de conséquences graves dans plusieurs tissus, la mutation la plus connue, est celle du gène CBS. Cependant, des études récentes ont décrit de mutations touchant le transport ou le métabolisme de la vitamine B12: CblA, CblB, CblC, CblD, CblE, CblF (ou CblJ), CblG, CblH et Mut. (Coelho et al. 2008)

Au total, tous les facteurs cités ci-dessus peuvent jouer un rôle important dans le métabolisme de monocarbones et la méthylation, un des mécanismes majeurs de l'épigénétique.

1.1.2 Mécanismes épigénomiques/épigénétiques

Le terme épigénétique a été proposé pour la première fois par Conrad Waddington dans les années 1940 comme “la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, qui font apparaître le phénotype”. Aujourd'hui, la définition la plus courante de l'épigénétique est “l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence de l'ADN”. Ces changements sont donc reconnus comme les mécanismes épigénétiques qui comprennent des modifications de la méthylation de l'ADN, des histones, l'interférence de l'ARN, le remodelage de la chromatine et le système polycomb-trithorax. (Waterland and Michels 2007)

1.1.2.1 La méthylation de l'ADN

Il s'agit d'un mécanisme épigénétique le mieux caractérisé. La méthylation s'effectue sur les cytosines des dinucléotides cytosine-guanine souvent présents dans les îlots CpG. Cette réaction

méthylation est catalysée par toute une famille d'ADN méthyltransférases (DNMTs). Les groupements méthyles, provenant de la S-adénosyl-méthionine(SAM), sont transférés sur la position N5 des cytosines. (Robertson 2001)(Jair et al. 2006) (Figure 11)

La notation « CpG » est une abréviation de cytosine–phosphate–guanine destinée à être clairement distinguée de la notation « CG » qui peut également désigner une paire de bases sur deux brins d'ADN distincts et non la séquence d'un seul brin d'ADN donné. Dans le génome, les dinucléotides CpG ont une distribution différente de celle d'autres dinucléotides comme GpC, ApT ou TpA, car ils définissent des îlots CpG dans lesquels leur concentration est bien plus élevée et qui jouent un rôle dans la régulation de l'expression génétique. Dans la plus part de cas, la méthylation des îlots CpG engendre une sous-expression du gène car il empêche y accéder à l'ARN polymérase.

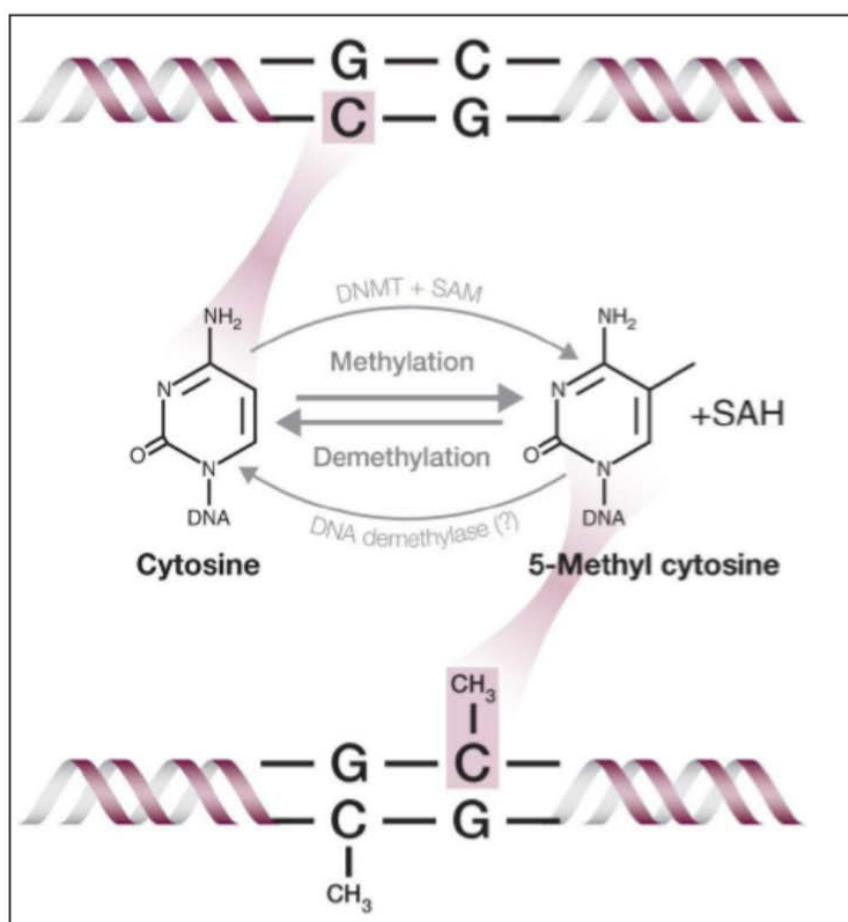


Figure 11. Mécanisme de méthylation de l'ADN sur les résidus cytosine par AND méthyltransférase (DNMT).

(Modifié d'après May, DNA methylation : Fingerprints of the (epi)genome, www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2153).

1.1.2.2 Les modifications des histones.

Les modifications des histones jouent un rôle important dans la structure de la chromatine et peuvent influencer l'expression des gènes. Le nucléosome est formé d'environ 147 paires de

bases d'ADN enroulées deux fois autour d'un octamère d'histone, il est l'unité de base de la chromatine. Cet octamère est composé de deux dimères d'histones H2A-H2B et de deux autres, H3-H4. L'histone H1 effectue la liaison entre chaque nucléosome en se liant à l'ADN. Différents acides aminés constituant les « queues » des histones sont représentés avec leurs différentes modifications covalentes spécifiques liés à la partie terminal N. (Sawan and Herceg 2010). Il peut y avoir plusieurs modifications, méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, ADP-ribosylation, sumoylation, propionylation et isomérisation de proline etc. (Kouzarides 2007)(B. Liu et al. 2009)(Biancotto, Frigè, and Minucci 2010)(Sawan and Herceg 2010) (Figure 12)

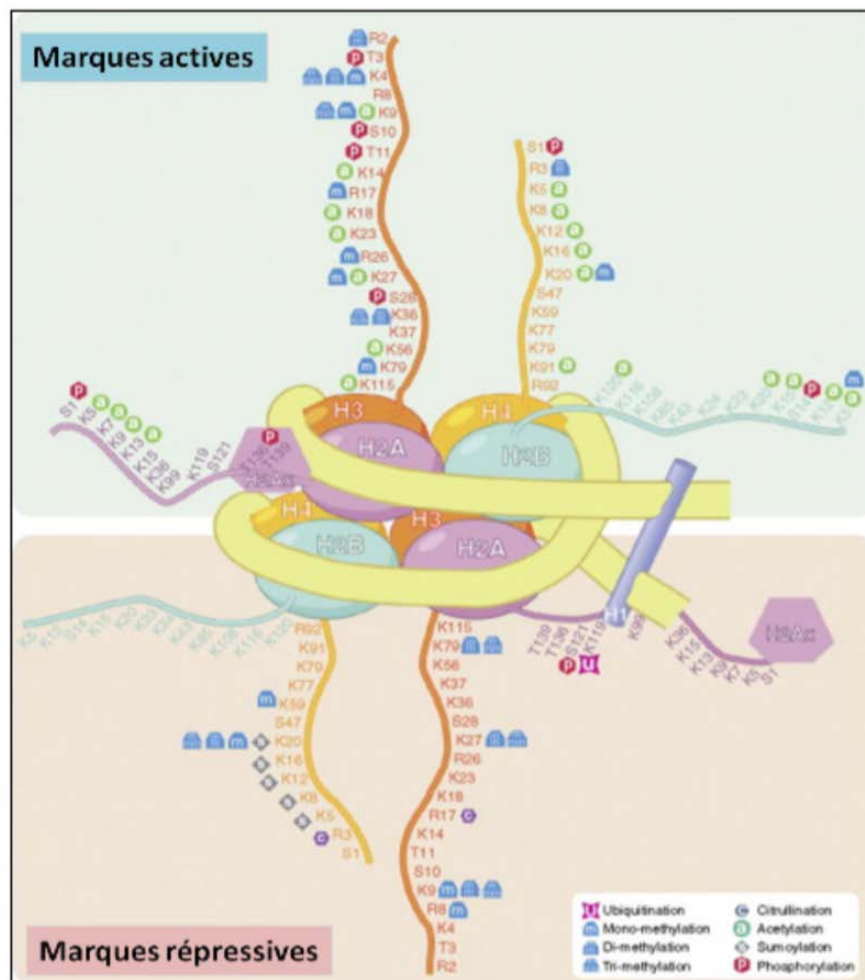


Figure 12. Le nucléosome et les modifications des histones.
(Modifié d'après Sawan et Herceg, 2010).

Toutes les modifications pouvant impacter l'activité transcriptionnelle. Par exemple, l'hyperacétylation des histones est considérée comme un marqueur de transcription actif de la chromatine en facilitant l'accès à l'ADN pour de nombreux facteurs de transcription. Enfin, il existe des interactions entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. La méthylation de l'ADN peut influencer les modifications des histones. Inversement, les modifications des histones peuvent également affecter le profil de méthylation de l'ADN. (Yang

and Schwartz 2011) Ainsi, c'est pour ce vue là que l'on propose un statu de donneur méthyl peut modifier l'épigénétiques individuel.

1.2 Partie III. Influence du métabolisme de monocarbones sur les modifications épigénomiques/épigénétiques du “Fœtal programming”, et syndrome métabolique

En 1989 un médecin épidémiologiste britannique, David Barker, a observé que des individus nés avec un petit poids de naissance présentaient un risque élevé de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Cette observation a donné naissance à l'hypothèse de Barker (ou « foetal programming »). Cette hypothèse s'est révolue ensuite à la notion des origines développementales de la santé et de la maladie (DOHaD), cette notion considère que les événements du développement et l'influence de l'environnement pendant les étapes précoces de la vie (conception, vie fœtale, enfance et petite enfance) peuvent avoir un impact à long terme sur la santé et l'apparition des pathologies. (Nagapoornima et al. 2007) Les interactions négatives gène-environnement peuvent avoir des conséquences sur la grossesse avec un risque accru de complications, comme le retard de croissance intra-utérin et provoquer également des altérations de type « programmation fœtale" qui vont se manifester ultérieurement, telles que l'obésité, la résistance accrue à l'insuline et le développement cognitif chez les enfants. Ces conditions sont également connues pour prédire le développement à la vie adulte de maladies chroniques liées à l'âge, comme le syndrome métabolique, le diabète et le déclin cognitif. Le message principal de cette théorie est qu'au cours du développement fœtal et postnatal, les tissus et les organes sont progressivement modelés, sous le contrôle des programmes génétiques et épigénétiques.

Des études expérimentales et chez l'homme ont établi des liens entre la déficience de donneurs de méthyles alimentaires impliqués dans le métabolisme de monocarbones et la programmation fœtale sur la progéniture pendant la petite enfance ou la vie adulte.

1.2.1 Le métabolisme des monocarbones participe à la programmation fœtale.

Le métabolisme des monocarbones influencé par des facteurs métaboliques et nutritionnels joue un rôle central sur la méthylation de l'ADN et la régulation de l'expression génique. Ce réseau métabolique complexe est régi par un nombre de gènes et nécessite des micronutriments tels que les folates, les vitamines B12, B6, B2 entre autres pour fonctionner correctement. Parmi ces micronutriments, les folates, la vitamine B12 et la choline sont des donneurs de méthyle, ils sont impliqués dans la synthèse de la S-adenosyl-méthionine, donneur universel de groupements méthyles nécessaires pour la méthylation d'ADN. Ainsi la dysrégulation épigénomique dans l'un des composants du métabolisme de monocarbones (nutritionnel, métabolique ou génétiques) peut modifier l'expression génique.

Dans les 20 dernières années, de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont montré une association entre l'homocystéine et les manifestations de la programmation fœtale. La carence en folates et vitamine B12 a comme conséquence une diminution de la concentration cellulaire de SAM, et une augmentation de la concentration de la S-adénosyl-homocystéine (SAH), et par conséquent un ratio SAM/SAH diminué, ceci illustre leur importance dans le maintien de l'homéostasie de la transméthylation. La diminution du ratio SAM/SAH réduit la capacité des cellules à assurer la méthylation d'ADN, d'ARN, des histones et les co-régulateurs des récepteurs nucléaires, dont tous jouent un rôle essentiel dans les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Guéant, Caillerez-Fofou, et al. 2013) .

1.2.2 Influence de l'état nutritionnel et le métabolisme de folates et vitamine B12 pendant la grossesse.

La prévalence de la carence en folates et vitamine B12 pendant la grossesse varie dans le monde. Elle est élevée en Inde. En Europe, la prévalence de la déficience en vitamine B12 est inférieure à celle de folates, cette déficience suit un gradient nord-sud. En effet, elle est plus élevée dans le Nord que dans le Sud en Europe. Par contre, en Amérique du Nord, la fortification systématique en folates dans les céréales a été mise en place depuis presque deux décennies, même s'il existe un débat sur les effets néfastes possibles de la supplémentation et / ou l'enrichissement des aliments en folates en cas de déficience en vitamine B12 (Jacob Selhub and Rosenberg 2016). Il est bien établi que les donneurs de méthyles alimentaires, y compris les folates et la vitamine B12 sont des éléments vitaux pour l'embryon, le fœtus et le développement pendant l'enfance. Un déséquilibre en folates et B12 a été associé à un risque accru de complications pendant la grossesse (Solé-Navais et al. 2016).

La fertilité féminine et masculine est influencée par les folates et la vitamine B12. En effet, une déficience en folates est associée à une altération de la spermatogenèse et la réserve ovarienne (Forges et al. 2016). Des études réalisées lors de la procréation médicale assistée ont montré que les embryons pré-implantation exprimaient presque toutes les enzymes qui participent dans le métabolisme de monocarbone. (Kwong et al. 2010)(Ikeda et al. 2012). Les folates sont cruciales pour le développement du fœtus et leur carence est associée au syndrome de Down et aux anomalies de fermeture du tube neural par des mécanismes qui peuvent impliquer des défauts de méthylation de l'ADN (K. Kim, Friso, and Choi 2009). Il est bien établi qu'une supplémentation en folates pendant la période la période péri-conceptionnelle a des effets bénéfiques sur la diminution des anomalies de fermeture du tube neural. Alors que, la supplémentation pendant toute la durée de la grossesse reste controversée. . Une méta-analyse récente, a conclu que,

l'augmentation de l'apport en folates après le premier trimestre est associée à un poids de naissance plus élevé, mais n'a aucun effet sur la durée de la gestation (Fekete et al. 2012). D'autre part, une supplémentation en choline pendant le troisième trimestre de la gestation supprime l'expression placentaire de sFlt1, ceci peut améliorer l'angiogenèse placentaire et atténuer certains des antécédents pathologiques de pré-éclampsie. (X. Jiang et al. 2013). Les mécanismes de la disponibilité de la vitamine B12 pendant la vie fœtale sont complexes. En effet, pendant la grossesse, il existe une diminution progressive de holo-transcobalamine et transcobalamine libre dans le plasma maternelle et le liquide amniotique (Guéant et al. 1989) (Greibe et al. 2011), ceci est associé à une concentration plus élevée dans le sang de cordon (Amarin and Obeidat 2010). Toutefois, malgré un déficit en transcobalamine congénital, le fœtus ne présente pas de déficience en vitamine B12 et se développe normalement jusqu'au à terme, ce qui suggère qu'il existe des voies alternatives de transport de vitamine B12. La transcobalamine et le facteur intrinsèque du liquide amniotique ont principalement une origine fœtale. La vitamine B12 liée au facteur intrinsèque peut être une source pour le fœtus *in-utero*, par l'intermédiaire du liquide amniotique avalé par le fœtus (Aimone-Gastin et al. 1999). Il y a une certaine spécificité du métabolisme de monocarbones au cours de la vie fœtale en ce qui concerne l'absence de la voie de la trans-sulfuration. (Kalhan 2016) .

1.2.3 Les donneurs de méthyles influencent la « *programmation fœtale* »

1.2.3.1 Évidences expérimentales

La déficience en donneurs de méthyles chez le rongeur est un modèle approprié pour étudier la méthylation des histones, l'expression des gènes, et les effets tissu-spécifiques (McCabe and Caudill 2005)(Ghoshal et al. 2006). La supplémentation alimentaire maternelle en folates provoque des effets épigénétiques dans la descendance du modèle de souris agouti. Il a été montré que la mutation A^{vy} c est provoquée par la rétro-transposition d'une particule A intra-cisternale contenant un îlot CpG (IAP) en amont du site d'initiation de la transcription du gène xxx chez l'agouti de type sauvage. Le locus affiche l'héritage épigénétique avec une transmission maternelle mais pas paternelle (Wolff et al. 1998). La supplémentation maternelle en folates, vitamine B12, choline et bêtaïne induit la méthylation d'IAP et transforme la distribution du phénotype en augmentant la proportion de la coloration du pelage. La progéniture est aussi plus maigre, plus saine et a une durée de vie plus longue (Waterland and Jirtle 2003). Une alimentation péri-conceptionnelle déficiente en folates, vitamine B12 et en méthionine chez le mouton conduit à une masse grasse plus importante, à une insulino-résistance et hypertension, avec des variations épigénétiques au niveau moléculaire (Sinclair et al. 2007). Les manifestations de la « *programmation fœtale* » chez le rat induites par une carence en donneurs de méthyle

(vitamine B12 et folate), sont de manifestations centrales du syndrome métabolique au niveau hépatique et cardiaque. En effet, notre laboratoire a mis en place un modèle de carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement, et a étudié les effets de la carence sur la progéniture. Ce modèle produit des manifestations de type 'programmation fœtale', dont un petit poids de naissance, une obésité centrale, une stéatose hépatique et cardiaque et une hypertrophie cardiaque (Garcia et al. 2011)(Pooya et al. 2012). Ces manifestations résultent de l'augmentation de du flux des acides gras libres, avec une altération de la β -oxydation et du métabolisme énergétique ayant un impact sur le myocarde et le foie. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont liés à la diminution de l'expression et l'activité de SIRT1 et PRMT1, puis hyperacétylation et hypométhylation de PGC1- α , et par conséquent une dysrégulation épigénomique des récepteurs nucléaires, ER α , ERR α , PPARs, HNF-4 (Figure13). De manière intéressante, la surnutrition produit des effets similaires avec diminution de l'expression et l'activité de SIRT1. Sur ce modèle, l'étude d'expression des gènes associée à la méthylation de l'ADN a montré de différences d'expression de gènes en lien avec le syndrome métabolique, y compris des gènes que régulent la tension artérielle. En effet, certains des changements d'expression de gènes sont impliqués dans le système rénine-angiotensine et dans le métabolisme énergétique (G. Chen et al. 2015b).

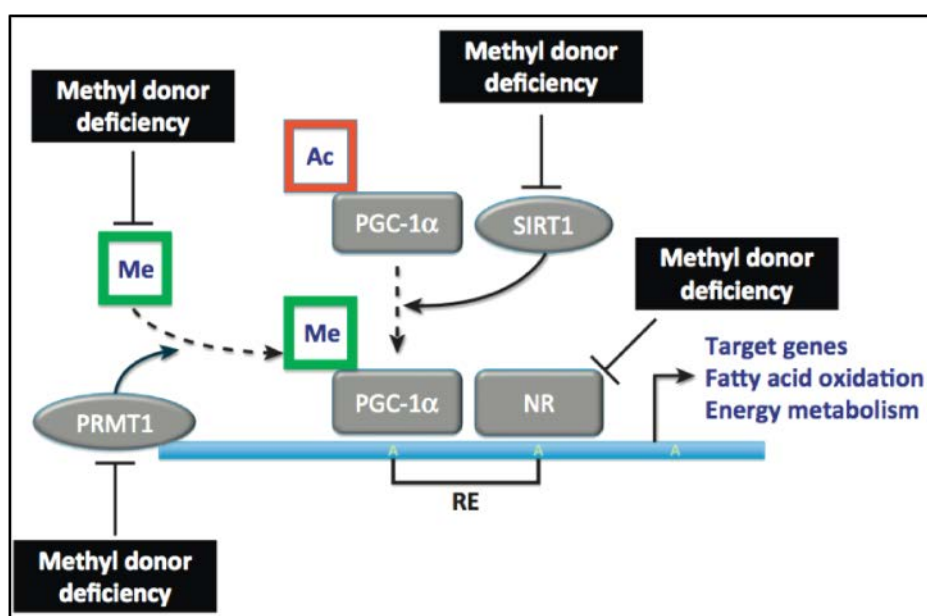


Figure 13. Le nucléosome et les modifications des histones.
(NR : Récepteurs Nucléaires) (modifié d'après R.M. Guéant Rodriguez 2012)

1.2.3.2 Faits épidémiologiques

Dans les 2 dernières décennies, de nombreuses études épidémiologiques et méta-analyses ont clairement démontré une association entre les marqueurs du métabolisme de monocarbone, y compris les donneurs de méthyle et l'homocystéine, et le poids de naissance et la survenue de pathologies chroniques.

Diverses études en Inde et au Népal ont rapporté une association entre le statut maternel en vitamine B12 pendant la grossesse et l'obésité centrale et l'insulino - résistance chez l'enfant. Malgré un petit poids de naissance, les nouveaux-nés présentent un phénotype maigre-gras. C'est à dire, une accumulation de graisse au niveau abdominal, puis dans la petite enfance, ils développent une insulino-résistance. Cette relation était observée uniquement chez les mères carencées en B12. (Chittaranjan Sakerlal Yajnik and Deshmukh 2012). En plus, le poids de naissance de la progéniture est inversement relié à la concentration en homocystéine maternelle et au variant TT du gène MTHFR (rs1801133) (Chittaranjan S. Yajnik et al. 2014). Cette cohorte (Pune Maternal Nutrition Study) montre aussi qu'une baisse de la concentration en cobalamine pendant le premier trimestre de la grossesse est prédictive de la survenue d'une obésité centrale et de la l'insulino-résistance chez les enfants à 6 ans, en particulier lorsqu'elle est associée à une élévation de la concentration de folates maternels (C S Yajnik et al. 2008). Une autre étude réalisée dans le district rural du Népal a confirmé les observations réalisées en Inde, en effet, une diminution de la cobalamine pendant la grossesse est associée à un risque accru de l'insulino-résistance précoce chez les enfants en âge scolaire (C P Stewart et al. 2011). En contraste, des autres observations en Inde n'ont pas montré de relation entre l'Hcy, les folates et la B12, et l'insulino-résistance chez l'enfant. Par contre, une l'élévation de l'homocystéine maternelle était associée à une insulino-résistance lors de la grossesse. Puis, l'élévation de la concentration en folates était associée à une insulino-résistance chez l'enfant à l'âge de 9-13 ans.(Ghattu V Krishnaveni et al. 2014) Une étude génétique réalisée également en Inde a montré qu'une variante du gène AMD1 codant pour une enzyme clé de la méthylation l'adénosyl-méthionine décarboxylase-1 est associée à l'obésité chez l'enfant (Tabassum et al. 2012).

Au delà des observations réalisées en Inde, en Europe et dans les pays occidentaux, des études épidémiologiques ont également montré que les marqueurs du métabolisme de monocarbone et du statut en donneurs de méthyles pendant la grossesse, influencent le risque d'avoir un enfant avec petit poids de naissance et de développer d'événements ultérieurs liés à la programmation fœtale. En effet, les enfants nés de mères avec un concentration d'homocystéine dans le quartile supérieur pendant la grossesse ont un poids de naissance inférieur (Murphy et al. 2004). D'autres

études ont également rapporté une association inverse entre l'homocystéine maternelle et le poids de naissance chez les enfants (Onalan et al. 2006), alors qu'aucune association n'a été trouvée dans une vaste étude du Canada, un pays dans lequel la fortification des céréales par de folates a été introduit il y a 15 ans (Dodds et al. 2008). La concentration maternelle en folates érythrocytaires pendant la grossesse est corrélée positivement avec le poids de naissance (Rao, Puschner, and Prolla 2001)(Relton, Pearce, and Parker 2005). Une méta-analyse réalisée sur 19 études, et constituée de 21,326 individus a confirmé l'association inverse entre l'homocystéine et le poids de naissance, et a estimé un risque élevé (OR de 1,25) d'avoir un enfant avec petit poids de naissance chez les mères ayant une concentration d'homocystéine au-dessus du 90e percentile(Hogeveen, Blom, and Den Heijer 2012). En revanche, une étude interventionnelle en double aveugle de supplémentation en folates au delà du premier trimestre entre les semaines 14-36 de gestation comparée aux femmes ayant reçu une supplémentation uniquement pendant le premier trimestre, montre que la supplémentation prolongée en folates a un impact uniquement sur la concentratin en folates maternelle, c'est à dire, la supplémentation évite le déclin gestationnel en folates observé à 36 semaines de gestation dans le groupe placebo, mais la supplémentation n'a aucun impact significatif sur la taille et le poids du nourrisson à la naissance (McNulty et al. 2013). Dans une étude plus récente, les concentrations maternelles en B12, B6 et homocystéine ne sont pas associées au poids de naissance, mais elles sont prédictives de la prise de poids des enfants à 3 ans (McCullough et al. 2016).

L'influence de l'apport en folates pendant la grossesse semble avoir une influence sur la survenue du syndrome métabolique dans l'enfance en Europe. En dépit des résultats contrastés parmi les populations étudiées. Dans une cohorte basée sur une population du sud du Royaume-Uni, l'apport en folates estimé par un questionnaire, n'a pas d'influence sur la composition corporelle de l'enfant (Lewis et al. 2009). Des autres résultats contrastés ont été publiés, par exemple, une étude française des adolescents obèses a montré que le polymorphisme MTHFR 677C>T est associé au petit poids de naissance et à l'insulino-résistance (Frelut et al. 2011). Cependant, au Royaume-Uni, Danemark et en Italie, ce polymorphisme n'est pas associé ni l'obésité infantile, ni à la composition corporelle, ni au syndrome métabolique (Lewis et al. 2008)(Russo et al. 2006).

1.2.4 Les donneurs de méthyles influencent l'épigénome dans la vie post-natal.

L'accumulation des données citées précédemment montre que le statut maternel en donneurs méthyle affecte la méthylation de l'ADN. Des associations inverses ont été rapportées entre l'homocystéine plasmatique à jeun de la mère et la méthylation globale de l'ADN du sang du

cordon (Fryer et al. 2009). En contraste, la méthylation de l'ADN est augmentée chez les nourrissons de 17 mois, dont leurs mères avaient reçu une supplémentation de 400 ug/j de folates périconceptionnelle (Steegers-Theunissen et al. 2009). Par contre, ce résultat n'a pas été confirmée dans la population aux Etats-Unis, où la fortification alimentaire en folates est très répandue (Boeke et al. 2012). Les déterminants génétiques du métabolisme monocarbonate et le statut en folates peuvent également affecter méthylation de l'ADN sur la progéniture.

1.2.5 Les changements dans l'Epigénome influencent le métabolisme et les traits du syndrome métabolique dans la vie adulte.

Le poids de la génétique comme responsable des maladies liées à l'âge, telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, l'obésité et l'hypertension, se situe entre 30 et 70 %. Le rôle crucial de l'épigénome dans ce scénario commence seulement à être évalué comme un de méthodes puissantes pour analyser l'ensemble de méthylation de l'ADN (Rakyan et al. 2011).

1.2.6 Influence de l'épigénome sur le phénotype métabolique

De nombreux mécanismes d'interaction entre la méthylation de l'ADN, l'expression génique et le profil métabolique participent au phénotype métabolique. La variation génétique sur les sites CpG ou dans leur voisinage pourrait influencer la méthylation de l'ADN. De nouvelles approches associant la génétique (GWAS) aux traits métaboliques en lien avec de maladies, ont identifié des *métabotypes*. Ces métabotypes sont influencés génétiquement (GIM) (Suhre and Gieger 2012). Cette approche est intéressante pour prédire la survenue de maladies métaboliquement complexes. Les associations entre les caractéristiques métaboliques et la méthylation de l'ADN peuvent résulter d'interactions complexes contrairement à GIM, où une variante génétique peut être causale directe d'une association entre un SNP et un phénotype. La méthylation de l'ADN est un mécanisme important de régulation génétique et joue un rôle majeur dans la détermination des métabotypes. liées aux maladies. Par exemple, la méthylation de l'ADN peut influencer le tryptophane C-glycosyle, un métabolite, qui est également associé au poids de naissance. Peu d'études longitudinales ont comparé l'influence respective de l'environnement et le métabolisme de monocarbones au cours de la vie. Une étude a évalué les changements temps-dépendant dans la méthylation globale de l'ADN dans un panel de 1505 dinucléotides CpG de 807 gènes au sein de 337 personnes à partir de 2 populations de zones géographiques très distinctes et sur 2 périodes de temps éloignés (Bjornsson et al. 2008). Les auteurs ont montré que, entre 8 % à 10 % des personnes dans les deux populations avaient des changements de sites CpG de plus de 20 % pendant une période de temps compris entre 11 à 16 ans. Les changements sur la méthylation soulève la possibilité que la méthylation pourrait être directement liée à l'activité des

méthyltransférases de l'ADN ou au métabolisme de monocarbones qui sont sous le contrôle des gènes.

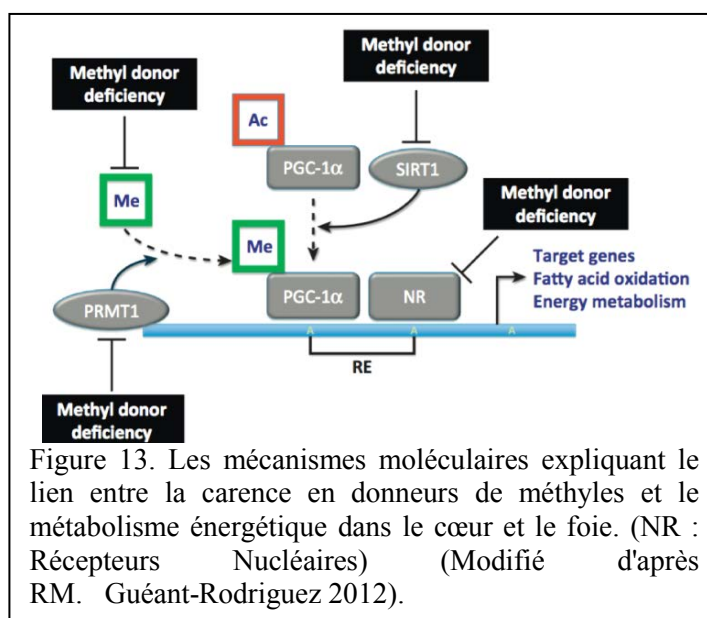
La méthylation de l'ADN est considérée comme une « clé » pour la compréhension des mécanismes moléculaires du vieillissement normal et prématuré. À ce jour, la plupart des connaissances portant sur l'influence de l'épigénome et l'apparition ultérieure des événements pathologiques comme le syndrome métabolique, est générée à partir de données expérimentales et ne peuvent pas être facilement extrapolées à des situations chez l'homme. Une augmentation de la masse du tissu adipeux a été associée à une sécrétion élevée d'adipokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et la leptine, dont l'expression est déterminée par l'état épigénétique des gènes concernés (Hermsdorff et al. 2010). Un groupe de femmes obèses qui ont bien répondu à un régime restrictif en calories avait un niveau de méthylation faible sur le promoteur de gènes codant pour le TNF- α et la leptine (Cordero et al. 2011), ce qui suggère que le niveau de méthylation de ces gènes pourrait être utilisé en tant que biomarqueur épigénétique dans la prédiction de la réponse à un régime restrictif en calories. En outre, une étude réalisée chez des hommes obèses soumis à un régime, a montré des niveaux de méthylations d'ADN différents sur plusieurs sites CpG situés sur les gènes ATP10A et CD44, après la perte de poids (Milagro et al. 2011). En outre, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est considérée comme une manifestation viscérale du syndrome métabolique, elle est associée avec toutes les composantes du syndrome métabolique. Dans une étude de biopsies hépatiques de patients atteints de NAFLD, la méthylation du promoteur PGC1- α , co-régulateur impliqué dans le métabolisme énergétique a été liée au HOMA-IR et l'insuline plasmatique à jeun (Sookoian et al. 2010).

En conclusion, la déficience en donneurs de méthyles alimentaires avant et pendant la grossesse produit des effets importants sur le développement des enfants et les événements sur la santé à long terme. L'obésité et le syndrome métabolique sont deux problèmes majeurs en matière de santé publique. Il y a maintenant des preuves expérimentales suggérant que la déficience maternelle en donneurs de méthyles crée un environnement tel que peut programmer la vie fœtal et avoir un risque accru de maladie dans la vie à long terme, en influençant les profils épigénomiques prénatales. Les variantes génétiques et l'épigénome sont des déterminants clés du développement et des événements sur la santé qui prédisent et / ou participent à l'apparition et à la progression de maladies chroniques liées au vieillissement. Les observations décrites jusqu'à présent sont encourageantes pour de nouvelles perspectives des études intégrées en associant l'épigénome, le profil métabolique et les facteurs nutritionnels qui influencent la méthylation, en particulier ceux liés au métabolisme de monocarbones.

2 OBJECTIFS ET HYPOTHESES

Notre unité Inserm U954 est engagée depuis longtemps dans l'étude des maladies métaboliques et les effets d'une carence en micronutriments (vitamines B9 et B12) sur la «*programmation fœtale*». En effet, les vitamines B9-B12 sont donneurs de groupements méthyles (mono-carbones), indispensables pour l'organisme et jouent un rôle essentiel dans les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (méthylation, acétylation). Ces mécanismes influencent l'expression des gènes et la signalisation cellulaire et jouent un rôle important dans la physiopathologie du retard de croissance intra-utérin avec des répercussions au cours du développement et tout au long de la vie (Dolinoy et al. 2007). Lors d'une carence en donneurs de méthyles, la dysrégulation de ces mécanismes épigénétiques et épigénomiques est observée dans le cerveau, le foie, le cœur et l'estomac. Nous avons montré que la carence maternelle en

donneurs de méthyles provoque un petit poids de naissance chez le nouveau-né, (S. Blaise et al. 2007)(Bossenmeyer-Pourie et al. 2010), ce qui augmente potentiellement le risque ultérieur de développer un syndrome métabolique ou d'un diabète de type 2. La carence en donneurs de méthyles produit aussi des troubles de la neuroplasticité cérébrale et du métabolisme énergétique, ces troubles mettent en jeu l'expression de gènes



clés du transport vésiculaire synaptique et du métabolisme oxydatif. Au niveau hépatique et cardiaque, la carence induit une dysrégulation épigénomique des récepteurs nucléaires, notamment PPAR-alpha, ERR-alpha et ER-alpha, en lien avec leur hypométhylation et un déséquilibre de la balance acétylation-méthylation du co-activateur PGC1- α (Garcia et al. 2011)(Pooya et al. 2012). Ces dysrégulations perturbent l'oxydation mitochondriale des acides gras et produisent une stéatose hépatique et une cardiomyopathie hypertrophique chez les rats à J21. (Figure 14). De manière intéressante, la mise en place d'un régime normal entre J21 et J50 restitue d'une part la structure histologique sur le foie et le cœur, et d'autre part, l'expression des protéines nucléaires qui devient similaire à celle des contrôles.

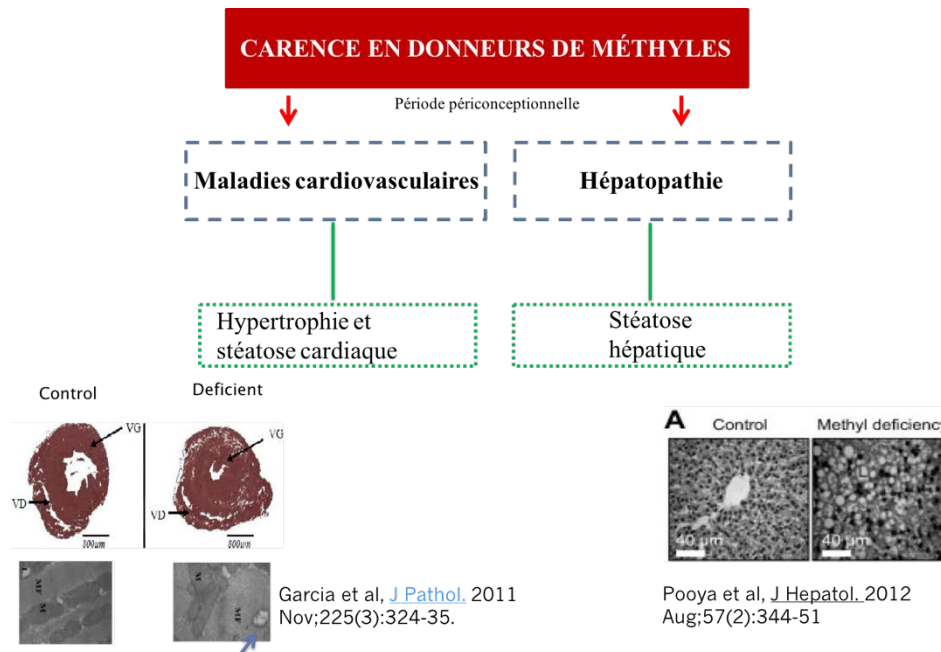


Figure 14. Effets de la carence maternelle en donneurs de méthyles sur le cœur et le foie de nouveaux nés. (21 jours de vie).

Afin d'évaluer le rôle de donneurs de groupements méthyles dans l'apparition de complications de l'obésité, nous avons réalisé dans une étude de population et une étude expérimentale chez l'animal.

Chez l'animal, nous nous posons les questions suivantes :

Existe-t-il un effet *fœtal programming* de la carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur le cœur de rats devenus adultes et soumis à un régime hyper-énergétique ?

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

Quelles sont les conséquences au niveau cardiaque, consommateur des acides gras ? L'effet *fœtal programming* d'une carence précoce en donneurs de méthyles entraîne-t-il des dysrégulations cardiaques chez des rats exposés à un régime hyper-énergétique (HF) ?

Quels sont les effets à long terme de la carence sur le vieillissement ?

Parallèlement, une étude menée au sein de notre unité sur deux populations contrastées (France et Italie) a montré un lien entre l'homocystéine et les acylcarnitines et entre l'homocystéine, l'acylcarnitines et le NT-pro-BNP ou le BNP. Les mécanismes impliqués dans ces associations sont probablement liés à un défaut d'utilisation mitochondriale des acides gras. (Guéant Rodriguez et al. 2013) (Figure 15)

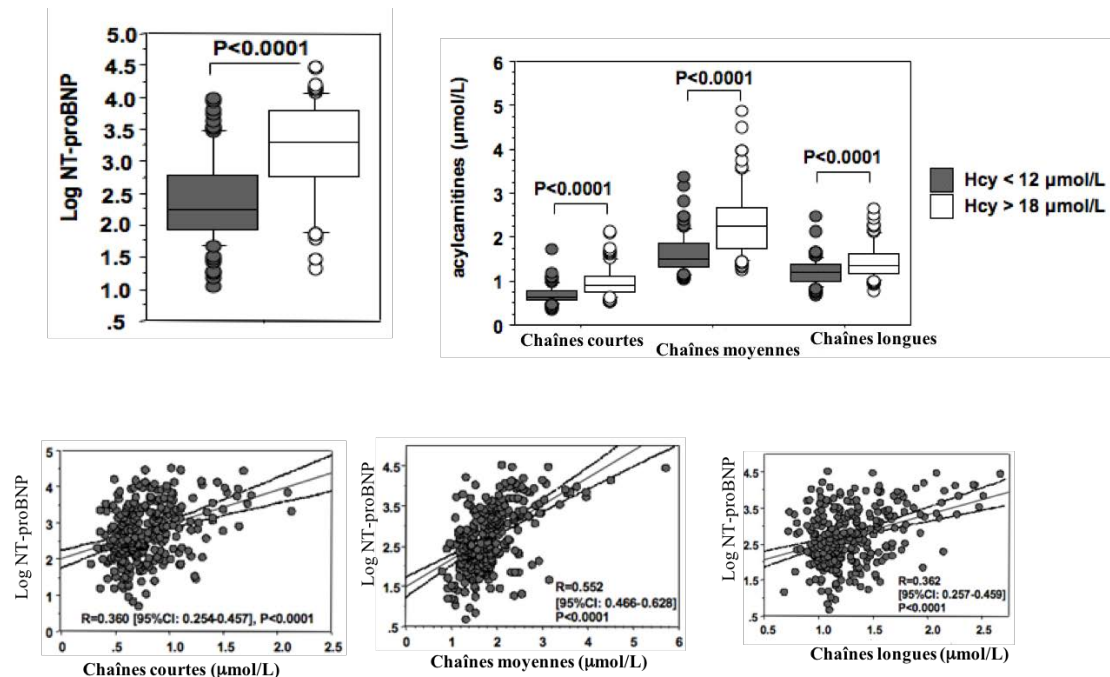


Figure 15. Corrélations entre homocystéine et NT-pro-BNP, NT-pro-BNP et acylcarnitines à chaînes courtes, moyennes et longues.
(Cohorte Français et Italienne) (Guéant Rodriguez et al. 2013)

Dans ce travail de thèse, nous voudrions évaluer s'il existe une relation entre le métabolisme de monocarbones et l'apparition ou la gravité du syndrome métabolique chez le sujet obèse.

Nous nous posons les questions suivantes :

- Existe-t-il une relation entre le métabolisme de monocarbones et l'apparition du syndrome métabolique ?
- Le nombre de composants du syndrome métabolique dépend-il du statut en donneurs de méthyles ?
- Chez le sujet obèse, y a-t-il des troubles de la bêta-oxydation ? Sont-ils en lien avec le statut en donneurs de méthyles ?

4. RÉSULTATS

4.1. Etude N°1 : Le statut en donneurs de méthyles a un impact significatif sur la résistance à l'insuline et sur la gravité du syndrome métabolique chez les patients avec une obésité morbide

4.1.1. Introduction

L'obésité, et ses comorbidités, telles que le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline, le diabète, l'hypertension, la dyslipidémie, la maladie stéato-hépatique non alcoolique, les maladies rénales, les maladies cardiovasculaires et le cancer, sont un problème de santé mondial (Robert H Eckel, Grundy, and Zimmet 2005)(S. Zhou et al. 2015). C'est un fardeau important pour la société, et représente l'une des causes principales de décès évitables avec une prévalence croissante dans les pays développés et en voie de développement au cours des dernières décennies (Genser et al. 2016)(Malik, Willett, and Hu 2013). Par conséquent, la compréhension des mécanismes sous-jacents entre l'obésité et les comorbidités est devenue une priorité dans le monde entier. La diminution de l'apparition des complications réduit de manière significative la survie des patients obèses (Stern et al. 2004). Puisque le génome humain ne peut pas changer de façon remarquable sur une courte période de temps, il est supposé donc que l'obésité et le syndrome métabolique sont le résultat d'interactions gènes-environnement / changements de mode de vie (habitudes alimentaires, sédentaires) (Andreassi 2009). Le rôle du métabolisme des monocarbones sur ces interactions et les composants du syndrome métabolique n'a pas été clairement évaluée, les études sur le sujet, portent principalement sur l'impact clinique de l'homocystéine chez les patients avec une obésité morbide (Gallistl et al. 2000)(Kahleová et al. 2002)(Sreckovic et al. 2016)(Catena, Colussi, and Sechi 2015). Cependant, la vitamine B12 et les folates sont des micronutriments essentiels, ils jouent un rôle important dans le métabolisme des monocarbones, des études récentes en Inde et au Royaume-Uni ont montré que les basses concentrations en vitamine B12 et en folates, pendant la gestation, sont associées à une augmentation de l'obésité et de la résistance à l'insuline (Knight et al. 2015)(Finer et al. 2014). En outre, certaines données de la population générale des États-Unis ont également suggéré que l'apport élevé en folates, est associé à une exacerbation des manifestations cliniques de la carence en vitamine B12 (Jacob Selhub and Rosenberg 2016). Pris ensemble, ces données soulignent que le statut plasmatique en vitamine B12, folates, acide méthyle malonique, et homocystéine devraient être pris en compte dans leur ensemble afin de mieux comprendre leurs impacts respectifs sur les composants du syndrome métabolique et de la résistance à l'insuline chez les patients obèses. Le but de cette étude était donc d'évaluer si la vitamine B12, les folates et les marqueurs du métabolisme des monocarbones prédisent la résistance à l'insuline (HOMA-IR) et les composants du syndrome métabolique chez les patients atteints d'obésité morbide évalués en

deux périodes, lors de l'évaluation multidisciplinaire préopératoire pour la chirurgie bariatrique (période 1) et le jour de la chirurgie bariatrique (période 2).

4.1.2. Population et Méthodes

4.1.2.1. La cohorte ALDEPI

Le projet ALDEPI (Adiposité Lipides Dystrophie EPIdémiologie), se déroulé au CHU Brabois Nancy du 1 janvier 2013 au 1 Mars 2015. Tous les patients avaient un IMC $> 35 \text{ kg/m}^2$ et ont été inclus dans l'étude lors de l'évaluation multidisciplinaire préopératoire pour la chirurgie bariatrique. Tous les patients ont accepté de participer après avoir reçu l'information de l'étude pendant la consultation chirurgicale préopératoire, et signé un consentement éclairé. L'étude était conforme aux principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki et a reçu l'approbation du comité d'éthique local. Cet essai a été enregistré dans clinicaltrials.gov (NCT02663388), OBESEPI (OBÉSité EPIdémiologie) est le protocole continué de l'ALDEPI. (Cf. Annexe 4)

4.1.2.2. Recueil des données cliniques et préparation des échantillons

Les données cliniques et biologiques ont été recueillies lors de l'évaluation multidisciplinaire préopératoire pour la chirurgie bariatrique (Consultation Obésité = période 1). Ensuite, un prélèvement sanguin à jeun dans la matinée de leur chirurgie bariatrique a été réalisé (Consultation préopératoire = période 2). (Figure 16) Les échantillons de sang veineux ont été acheminés, au laboratoire. L'ADN a été extrait à partir du culot leucocytaire. Le sérum et le plasma ont été obtenus par centrifugation à $2,000 \times g$ pendant 10 minutes, congelés et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse. Des biopsies du tissu adipeux sous-cutané, mésentère, épiploon, et hépatique ont été prélevées dans la période peropératoire, mises dans l'azote, et stockées à -80°C dans le service d'anatomopathologie du CHU Brabois de Nancy pour analyse ultérieure.

Nous avons évalué deux périodes, pour plusieurs raisons. La première est que les patients avant de subir une chirurgie bariatrique doivent maigrir d'environ 10 kilos afin d'avoir les meilleures conditions pré-opératoires. Et la deuxième, est de savoir si le traitement antidiabétique pourrait avoir une influence sur la concentration des paramètres métaboliques. Donc on suppose que les statuts métaboliques sont éventuellement différents. En enfin, l'analyse dans deux périodes nous permettait d'avoir une réplique dans notre propre étude. (Tableau 2)

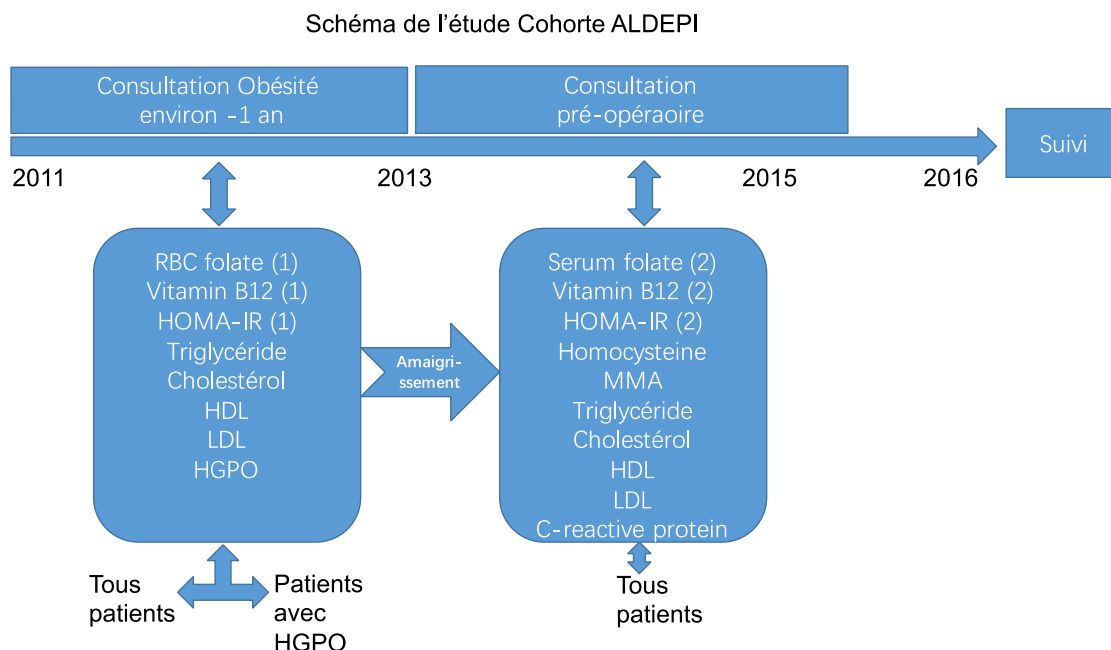


Figure 16. Schéma de l'étude ALDEPI.

4.1.3. Analyse biochimique

Les concentrations plasmatiques à jeun, en glucose, cholestérol, triglycérides, HDL-cholestérol, CRP (protéine C-réactive), albumine, sodium, potassium, iochlore, protéines, urée, créatinine, calcium, phosphore, bilirubine, fer, ASAT et ALAT ont été déterminées par les technique enzymatique ou méthode de chimie sèche en utilisant l'automate U 2700 Olympus Corporation, USA. Les valeurs de LDL-cholestérol ont été calculés selon la formule de Friedewald, $[LDL\text{-}chol] = [Total\ chol] - [HDL\text{-}chol] - ([TG]/2.2)$ en utilisant l'unité en mmol/L. L'Insuline plasmatique a été déterminé par RIA (radioimmunologie) à l'aide de la trousse MP Biomedicale (Solon, Ohio 44139, USA). L'HOMA-IR a été calculé selon le modèle proposé par Levy et al., $HOMA\text{-}IR = Glucose\ (mmol/L) \times Insuline\ (\mu UI/ml) / 22.5$. (Levy, Matthews, and Hermans 1998). La vitamine B12 et les folates ont été déterminés par RIA, en utilisant le coffret SimulTRAC-SNB (ICN, Costa Mesa, USA) Vitamine B12 [^{57}Co]/Folates [^{125}I]. Les concentrations de folates érythrocytaires ont été déterminées par la même technique radio-isotopique, après hémolyse d'un extrait de sang total (dont la valeur de l'hématocrite a été notée) en présence d'acide ascorbique. L'homocystéine et l'acide méthylmalonique (MMA) ont été déterminés par UPLC-MS/MS, avec une colonne ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 μ m, 2.1mm $\times$ 50mm, Waters Corporation). (Guéant-Rodriguez et al. 2011)

La carence préopératoire en vitamine B12 a été défini comme une concentration vitamine B12 sérique <150 pmol/L. Les folates sériques préopératoires élevés ont été définis comme une concentration >20ng/ml. (Jacob Selhub and Rosenberg 2016)

4.1.4. Analyse Statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS version 23 (IBM corporation, Chicago, USA). Les données continues ont été rapportées en tant que moyenne $\pm$ écart-type (SD). Les variables nominales ont été rapportées en pourcentage. Les tests non paramétriques ont été utilisés si la distribution des données ne suivait une loi normale. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer de variables à plus de 2 groupes. L'analyse multivariée a été effectuée pour évaluer les déterminants de l'insuline et les composants du syndrome métabolique (variables dépendantes) en utilisant la régression multiple et la régression logistique. Les variables ne suivant pas une distribution normale ont été transformées de façon logarithmique. Une valeur $P < 0.05$ a été considéré comme statistiquement significative.

4.1.5. Résultats

Deux cents soixante-dix-huit patients ont été inclus dans cette étude. L'âge moyen était de 45 ± 11.2 ans, et 221 patients étaient des femmes (79.4%). La répartition des éléments clés du syndrome métabolique était comme suit : dyslipidémie chez 235 patients (84.5%), diabète chez 137 patients (49.3%) et hypertension chez 118 patients (42.4%). Dans ce travail la dyslipidémie correspondait à 28 patients atteints d'hypertriglycéridémie (>1.5 g/L) + 108 patients avec hypoHDL-cholestérolémie (<0.40 g/L pour les hommes et <0.50 g/L pour les femmes), par ailleurs, 91 patients réunissaient les deux critères (IDF définition 2009). De plus, certains patients avaient des autres comorbidités cliniques liées à l'obésité, telles que, des antécédents de cardiopathie ischémique (6.5%), stéatohépatite non alcoolique (9.4%), et le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (50%). Les caractéristiques cliniques et biologiques ont été rapportées dans les tableaux 2 et 3.

Tableau 2. Caractéristiques cliniques et biologiques des 278 patients obèses aux périodes 1 et 2.

Parameters	n	Mean $\pm$ Standard Deviation	Median	Lower quartile	Upper quartile
During multidisciplinary evaluation - period 1					
BMI (kg/m ²)	278	48 $\pm$ 7.5	46.7	42.2	52.3
RBC folates (nmol/L)	220	936.5 $\pm$ 464	797.5	622.3	1153.8
Plasma folates (nmol/L)	201	13.9 $\pm$ 8.3	11.4	8.6	17.2
Plasma B12 (pmol/L)	226	298 $\pm$ 145	274	213	357
Fasting insulin (μ UI/mL)	186	24.9 $\pm$ 19	21.6	16	30.8
Fasting glucose (g/L)	192	0.99 $\pm$ 0.18	0.95	0.88	1.08
HOMA-IR	183	6.05 $\pm$ 4.3	5.09	3.69	7.43
HDL-cholesterol (g/L)	248	0.45 $\pm$ 0.1	0.43	0.38	0.51
LDL-cholesterol (g/L)	248	1.23 $\pm$ 0.33	1.21	1.02	1.44
Total Cholesterol (g/L)	250	2.02 $\pm$ 0.36	2.00	1.78	2.22
Triglycerides (g/L)	250	1.74 $\pm$ 0.89	1.56	1.08	2.16
At bariatric surgery - period 2					
BMI (kg/m ²)	278	46 $\pm$ 6.6	44.5	41	50.2
Age (years)	278	45 $\pm$ 11	45	37	54
Plasma folates (nmol/L)	278	11.9 $\pm$ 7.9	9.6	7.4	15.1
Plasma B12 (pmol/L)	278	265 $\pm$ 294	239	178	297
Homocysteine (μ mol/L)	278	13.7 $\pm$ 4.8	13.0	10.7	15.5
MMA (μ mol/L)	278	0.16 $\pm$ 0.07	0.14	0.11	0.18
Fasting insulin (μ UI/mL)	278	54.7 $\pm$ 50	43.5	28.6	62.8
Fasting glucose (g/L)	277	1.06 $\pm$ 0.39	0.94	0.83	1.19
HOMA-IR	277	16.4 $\pm$ 27	10.4	6.3	17.3
HDL-cholesterol (g/L)	277	0.41 $\pm$ 0.1	0.41	0.35	0.47
LDL-cholesterol (g/L)	277	1.14 $\pm$ 0.32	1.13	0.94	1.35
Total Cholesterol (g/L)	277	1.87 $\pm$ 0.35	1.86	1.65	2.11
Triglycerides (g/L)	277	1.56 $\pm$ 0.69	1.42	1.09	1.90

BMI: body mass index; MMA: methylmalonic acid ; RBC: red blood cell

Tableau 3. Les composants du syndrome métabolique et les autres caractéristiques chez 278 patients obèses en fonction de la définition des critères IDF 2009.

Comorbidity	Number of patients (n)	Percentage of patients (%)
Metabolic syndrome components		
Waist size (> 94 cm in male and > 80 cm in female)*	278	100
Hypertension (SBP $\geq$ 130 mm Hg or DBP $\geq$ 85 mm Hg or antihypertensive medication)*	118	42.4
Dyslipidemia**	235	84.5
- Triglycerides > 1,5 g/L	28	10.1
- Hypo HDL-cholesterol < 0.4 (M) or 0.5 (F) g/L	108	38.9
- Both	91	32.7
Diabetes (fasting glycemia $\geq$ 1,0 g/L or treatment)**	137	49.3
- Fasting glycemia $\geq$ 1,0 g/L without treatment	53	19.1
- Treatment	84	30.2
Other characteristics*		
NASH	26	9.4
OSAS	139	50.0
CHD	18	6.5
Male gender	58	20.8

CHD: coronary heart disease; NASH: non-alcoholic steatohepatitis; OSAS: obstructive sleep apnea syndrome; *: according data at period 1; **: according data at period 2

Puis, sur la période 1 (évaluation multidisciplinaire afin de subir une chirurgie bariatrique), nous avons évalué les interactions entre les folates plasmatiques, la vitamine B12, les folates érythrocytaires, et l'indice HOMA-IR. A cette période, nous avons observé que les folates érythrocytaires étaient positivement corrélés avec HOMA-IR (0.2135; $p=0.0085$). Les concentrations plasmatiques en vitamine B12 et en folates n'avaient aucun impact significatif sur l'indice HOMA-IR. La concentration des folates érythrocytaires (0.217, 0.087-0.339 ; $p = 0.001$) était également corrélé positivement avec celle de la vitamine B12 et des folates plasmatiques (0.190, 0.053-0.320; $p = 0.006$ et 0.392, 0.265-0.505; $p < 0.001$, respectivement). En analyse multivariée, les folates érythrocytaires restaient le facteur indépendant pour les valeurs HOMA-IR (0.001; $p = 0.045$). Sur la période 2, nous observé que folates plasmatique, MMA et HCY sont positivement corrélés avec HOMA-IR en analyse univariée. En analyse multivariée, MMA et HCY restaient le facteur indépendant pour les valeurs HOMA-IR (57.3983; $p = 0.035$ et 1.1916 ; $P=0.003$). Quand on rajoute les folates érythrocytaires dans ce model de regression pour prédire, ils sortent comme un facteur prédictif pour les valeurs HOMA-IR (0.0035; $p = 0.02$). (Tableau 4)

Tableau 4. Déterminants de HOMA-IR dans l'analyse univariée et multivariée à deux périodes.

	Period 1					Period 2						
	Univariate			Multivariate		Univariate			Multivariate Model 1		Multivariate Model 2	
	Rho	P	n	Coefficient	P	Rho	P	n	Coefficient	P	Coefficient	P
Age	0.1054	0.1874	158			0.1368	0.0228	277				
Weight	0.2332	0.0022	170			0.1876	0.0067	208				
Waist size	0.3195	0.0007	110			ND	ND	ND				
Hip size	0.0727	0.4721	100			ND	ND	ND				
BMI	0.1660	0.0305	170			0.1366	0.0491	208	0.7661	0.0050		
Total cholesterol	-0.1252	0.1060	168			-0.1970	0.0010	277				
Triglycerides	0.2338	0.0023	168			0.2439	<0.0001	277	6.0814	0.0260		
HDL-cholesterol	-0.2213	0.0041	167			-0.3128	<0.0001	277			-23.8833	0.003
LDL-cholesterol	0.1555	0.0448	167			-0.2349	0.0001	277				
Creatinine	0.0244	0.7555	165			0.0697	0.2490	275				
ASAT	0.4814	<0.0001	164			0.4558	<0.0001	277				
ALAT	0.4664	<0.0001	164			0.4410	<0.0001	277				
APRI score	0.4374	<0.0001	159	5.5194	<0.0001	0.4018	<0.0001	277			9.4880	<0.0001
Homocysteine	ND	ND	ND			-0.2286	0.0001	277	1.1916	0.0030		
Red cell folates	0.2135	0.0085	151	0.0009	0.0450	ND	ND	ND			0.0035	0.0200
Folates	-0.0709	0.4068	139			0.2167	0.0003	277				
B12	0.0695	0.3917	154			0.0520	0.3886	277				
MMA	ND	ND	ND			0.1524	0.0111	277	57.3983	0.0350		

ND : no data.

De manière intéressante, nous avons observé que les patients avec les valeurs les plus basses en Vitamine B12 plasmatique (tercile <241 pmol/L) associées aux valeurs les plus élevées pour les folates érythrocytaires (tercile > 953 nmol / L) ont été ceux qui avaient la valeur HOMA-IR la plus élevée, c'est à dire une résistance à l'insuline. Et la valeur HOMA-IR augmente avec folates érythrocytaires augmentation (tercile) dans la catégorie de vitamine B12 plus base (tercile <241 pmol/L). (Figure 17A)

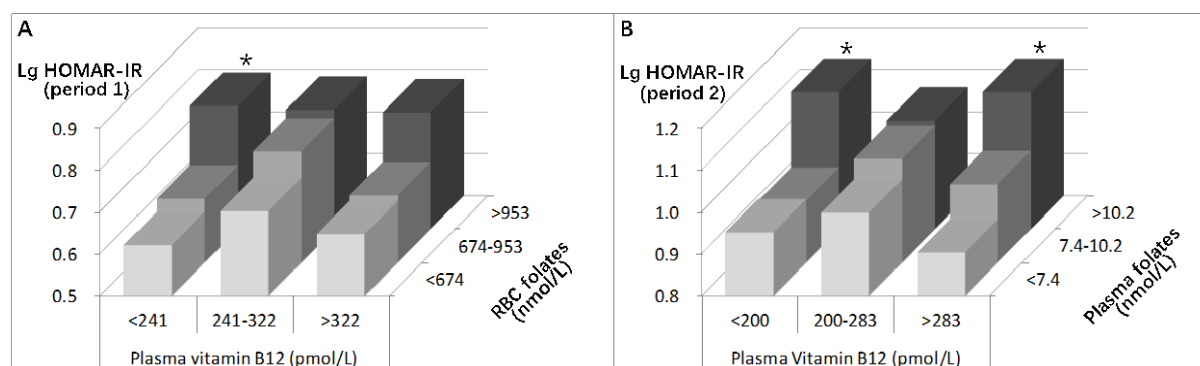


Figure 17. Interaction de la vitamine B12 et folates sur HOMA-IR.

A: Interaction de vitamine B12 plasmatique et de folate érythrocytaire sur HOMA-IR chez 183 sujets obésité français, sans traitement de metformine (période 1). B: Interaction de vitamine B12 plasmatique et de folate plasmatique sur HOMA-IR chez 277 population de l'obésité française (période 2). HOMA-IR dans la figure A et B a été transformé en logarithmes. (Valeur de P ont été analysées par l'analyse de tendance (P for trend), *: P <0.05)

Ensuite, sur la période 2, c'est à dire au moment de la chirurgie bariatrique avec un délai médian entre les deux périodes de 14.8 mois (6-53 mois). Nous avons observé que l'IMC moyen avait diminué de façon significative entre 48 ± 7.5 et 46 ± 6.6 kg/m² (p <0.001) correspondant à une perte moyenne de poids de 6.1 ± 10 kg. La concentration des folates plasmatiques et de la vitamine B12 n'étaient pas corrélées avec le HOMA-IR. Cependant, nous avons observé que les

folates érythrocytaires issus de l'évaluation multidisciplinaire (période 1) étaient toujours corrélés positivement avec les valeurs HOMA-IR à la période 2 (0.220, 0.090-0.342 ; $p=0.001$), ainsi qu'avec la concentration de folates plasmatique à la période 2 (0.399, 0.282-0.505 ; $p<0.0001$). De manière intéressante, nous avons confirmé que vitamine B12, folates et HOMA-IR à la période 2 avaient toujours la même distribution qu'à la période 1. Au moment de la chirurgie, les patients ayant des valeurs de vitamine B12 les plus basses et les plus élevées (tercile <200 pmol/L et tercile >283 pmol/L) avaient les valeurs de folates sérique les plus élevées (tercile >10.2 nmol / L), et ces deux groupes avaient les valeurs HOMA-IR les plus élevées. Et la valeur HOMA-IR augmente avec folates plasmatiques augmentation (tercile) dans ces deux catégories de vitamine B12 (tercile <200 pmol/L et tercile >283 pmol/L). (Figure 17B)

Toujours sur la période 2, nous avons confirmé que la concentration en folates sériques était négativement corrélée avec la concentration en homocystéine plasmatique (-0.272, -0.377- -0.159; $p<0.0001$). En outre, l'homocystéine et le MMA plasmatiques étaient positivement corrélés entre eux (0.208, 0.093-0.318; $p = 0,0005$). Nous avons également observé que 37 patients (13,3%) avaient une déficience en vitamine B12 (Vitamine B12 <150 pmol/L). Nous avons observé que les patients avec une déficience en vitamine B12 avaient une valeur moyenne de homocystéine élevée (15.6 $\mu\text{mol/L}$ par rapport à 13.4 $\mu\text{mol/L}$; $p=0.039$), mais aussi une concentration en MMA plus élevée (0.178 $\mu\text{mol/L}$ contre 0.154 $\mu\text{mol/L}$; $p=0.026$). De même, nous avons observé que valeur moyenne d'homocystéine était significativement plus faible chez les patients ayant des niveaux des folates plasmatiques les plus élevés, par rapport à ceux avec une concentration <20 nmol/L (11.7 $\mu\text{mol/L}$ contre 13.9 $\mu\text{mol/L}$; $p=0.004$). Cependant, les folates plasmatiques n'avaient aucun impact sur la concentration de MMA ($p=0.51$). Dans l'ensemble, nous avons montré que les concentrations moyennes de MMA étaient les plus élevées chez les patients avec une carence en vitamine B12 ($<150\text{pmol/L}$) ou en folates ($<5.8\text{nmol/L}$), ou bien élevés ($>8.1\text{nmol/L}$), comparés à ceux ayant des folates sériques dans de valeurs intermédiaires (Figure 18A).

Au moment de la chirurgie bariatrique (période 2), nous avons également montré que les valeurs HOMA-IR étaient significativement corrélées avec l'âge, l'homocystéine, le MMA, le cholestérol total et les triglycérides plasmatiques (Tableau 4). En analyse multivariée, le cholestérol total (-21.6 ± 5.5 ; $p<0.001$), les triglycérides (8.6 ± 2.3 ; $p<0.001$) et le MMA (43.6 ± 22.0 ; $p=0.050$) déterminaient de façon indépendante les valeurs HOMA-IR. (Figure 18B)

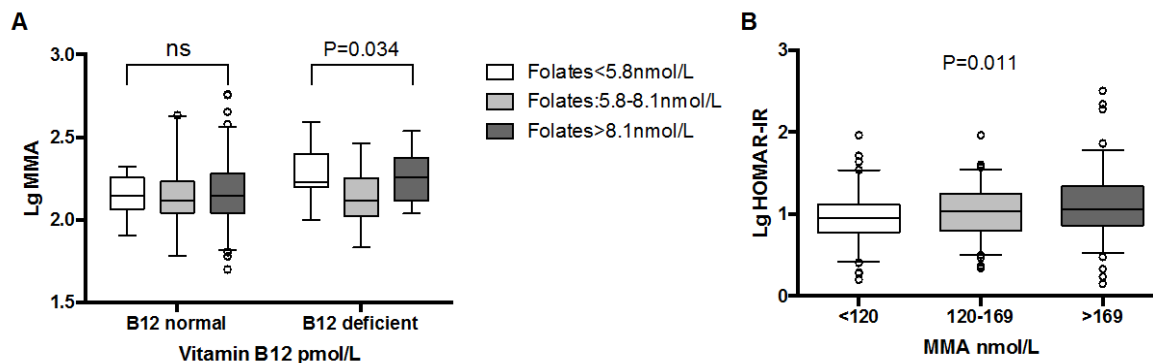


Figure 18. Interaction de la vitamine B12 - folates sur MMA et relation entre MMA et HOMA-IR.

A: Tendance de la concentration en MMA plasmatique avec l'augmentation de folate plasmatique chez 278 patients obésités françaises (période 2). La vitamine B12 déficiente est définie par la valeur inférieure à 150 pmol/L. Folate plasmatique a été divisé en trois catégories en fonction de la groupe vitamine B12 déficient. MMA est en unité nmol/L ici pour la transformation en logarithmes. B: Tendance de l'HOMA-IR avec l'augmentation de MMA plasmatique chez 278 patients obésités françaises (période 2). HOMA-IR ici a été transformé en logarithmes. ('P for tend' ont été utilisés pour analyser, *P < 0.05)

Dans notre population, le nombre moyen de composants du syndrome métabolique était 2.76 ± 0.9 . Cent quatorze patients (41%) avaient 1 ou 2 composants du syndrome métabolique (syndrome métabolique moins sévère) et 164 patients (59%) avaient 3 ou 4 composants du syndrome métabolique (syndrome métabolique plus sévère) (Tableau 4). Nous avons observé que, le sexe masculin, le syndrome d'apnée obstructive du sommeil et la maladie coronarienne ont été plus fréquemment observés chez les patients présentant un syndrome métabolique plus sévère. De même, l'âge, les triglycérides, le score APRI, l'insuline, la glycémie, et les valeurs HOMA-IR étaient significativement plus élevés chez les patients présentant un syndrome métabolique plus sévère (Tableau 5).

Tableau 5. Les nombres des composantes du syndrome métabolique des 278 patients.

Criteria	Number of metabolic syndrome components				P-Value
	1 (n=21)	2 (n=93)	3 (n=95)	4 (n=69)	
Age (years)**	40.6 ± 11	40.5 ± 11	46.6 ± 10	50.3 ± 10	<0.001
Male gender (%)*	5 (24)	11 (12)	20 (21)	22 (32)	0.020
BMI (kg/m²)*	47.8 ± 6	45.1 ± 5	45.5 ± 6	47.1 ± 8	0.339
OSAS comorbidity (%)*	7 (33)	34 (36)	56 (59)	42 (61)	0.001
NASH comorbidity (%)*	0 (0)	5 (5.4)	12 (12.6)	9 (13)	0.101
CHD comorbidity (%)*	0 (0)	1 (1.07)	8 (8.4)	9 (13)	0.009
APRI score**	0.27 ± 0.12	0.26 ± 0.18	0.40 ± 0.30	0.52 ± 0.51	<0.001
RBC folates (nmol/L)*	835 ± 347	821 ± 368	950 ± 412	1116 ± 620	0.016
Plasma folates (nmol/L)**	9.9 ± 5	10.7 ± 6	13.1 ± 11	12.6 ± 7	0.082
Vitamin B12 (pmol/L)**	214 ± 72	239 ± 91	320 ± 483	243 ± 101	0.073
HCY (μmol/L)**	14.6 ± 4	13.0 ± 3	13.6 ± 6	14.4 ± 5	0.270
MMA (μmol/L)**	0.157 ± 0.04	0.147 ± 0.06	0.153 ± 0.08	0.175 ± 0.09	0.036

The data are expressed in mean ± standard deviation for continuous variables and in number (frequency) for categorical variables. Abbreviations: APRI= aspartate aminotransferase / Platelet Ratio Index; BMI = body mass index; CHD = coronary heart disease; NASH = non-alcoholic steato-hepatitis; OSAS = obstructive sleep apnea syndrome; RBC folates = red blood folates; HCY= homocysteine; MMA: methylmalonic acid ; *: according data at period 1; **: according data at period 2

L'analyse univariée a montré que les folates érythrocytaires et les folates sériques étaient positivement corrélés avec le nombre de composants du syndrome métabolique à la période 2 (0.233, 0.103-0.354; p <0.001 et 0.121, 0.003-0.235; p = 0.044, respectivement). En revanche, on n'a pas observé d'association avec la vitamine B12 (p=0.483), l'homocystéine (p=0.319) et MMA (p=0.062). Cependant, les folates érythrocytaires (p=0.016) et MMA (p=0.036) étaient significativement plus élevés chez les patients avec un syndrome métabolique plus sévère (Tableau 5). En revanche, les folates érythrocytaires et sériques, lorsqu'ils sont analysés séparément, étaient des prédicteurs indépendants pour le nombre de composantes du syndrome métabolique (syndrome métabolique de gravité) (Tableau 6). De même, les folates érythrocytaires (OR 1.001, 1.000-1.002 ; p=0.007) et les folates sériques (OR 1.065, 1.011-1.122 ; p=0.0171) étaient les prédicteurs indépendants pour le diabète.

Tableau 6. Analyse multivariante sur nombre des composantes du syndrome métabolique en regardant les marqueurs du métabolisme mono carbone avec ceux qui ont la valeur $P < 0.2$ dans l'analyse univariate.

Criteria	Univariate analysis	Multivariate analysis			
	P-value	Model 1* P-value	Model 2* P-value	Model 3* P-value	Model 4* P-value
RBC folates at period 1 (nmol/L)	0.016	$p < 0.001$	$p < 0.001$	excluded	excluded
Plasma folates at period 2 (nmol/L)	0.082	excluded	excluded	0.051	0.040
Vitamin B12 at period 2 (pmol/L)	0.073	0.702	excluded	0.615	excluded
MMA at period 2 ($\mu\text{mol/L}$)	0.036	excluded	0.048	excluded	0.056

*: RBC folates and plasma folate levels were not independent variables. Consequently, they were analyzed separately. Similarly, vitamin B12 and MMA plasma levels were not independent variables. Consequently, they were analyzed separately.

4.1.6. Discussion

Cette étude transversale a identifié premièrement que, les folates érythrocytaires (RBC folate) comme prédicteur du HOMA-IR chez les patients avec une obésité morbide. Deuxièmement, chez les patients ayant une concentration en folates érythrocytaires élevée associée à une concentration basse en vitamine B12 avaient une fréquence plus élevée du diabète et/ou une insulino-résistance. Et troisièmement, les concentrations en acide méthyl-malonique sont plus élevées chez les patients ayant une concentration basse en vitamine B12 associée soit à des folates bas, soit à des folates élevés. Et enfin, cette étude a montré que les folates plasmatiques ou érythrocytaires sont un facteur indépendant de l'incidence du diabète et du nombre de composants du syndrome métabolique.

Le syndrome métabolique est fréquemment observé chez les patients atteints d'obésité morbide et correspond à un ensemble complexe des facteurs de risque métaboliques. Sa présence, multiplie cinq fois le risque du diabète de type 2, et par deux de développer une maladie cardiovasculaire (Grundy 2007). Nous avons confirmé que l'incidence et la distribution de composants clés du syndrome métabolique observés dans cette étude étaient similaires à une série publiée précédemment (Faria et al. 2014)(Alberti et al. 2009)(Fouse and Brethauer 2016). Le métabolisme des monocarbones comprend un ensemble complexe de réactions biochimiques dans lequel des groupements méthyles sont générés ou utilisés. Le cœur de ce métabolisme est le cycle de la méthionine, il produit la S-adenosylméthionine. La S-adenosylméthionine est convertie en S-adenosylhomocystéine par des méthyltransférases qui comme leur nom l'indique, transfèrent un groupement méthyle à des autres voies pour la méthylation de l'ADN, la synthèse des lipides, protéines, etc. La S-adenosylhomocystéine est ensuite convertie en homocystéine. A son tour, la méthionine peut être régénérée à partir d'homocystéine grâce à la présence d'un groupement méthyle provenant du cycle des folates. Cette réaction se fait par l'enzyme de méthionine synthase, elle exige la vitamine B12 (cobalamine) en tant que cofacteur. Une déficience dans l'un de ces micronutriments pourrait entraîner des perturbations du cycle des monocarbones et les processus métaboliques en aval (Finer et al. 2014). Cette étude a confirmé, comme observé chez les patients non obèses que, les concentrations plasmatiques en folates étaient négativement corrélées avec les celles d'homocystéine chez les patients obèses. Comme prévu, la valeur moyenne d'homocystéine était significativement plus basse chez les patients ayant des folates plasmatiques plus élevés. De même, cette étude a confirmé que les concentrations de MMA étaient les plus élevées chez les patients ayant une concentration basse en B12.

L'observation la plus intéressante de cette étude est la relation marquée entre statut élevé des folates (érythrocytaire et plasmatiques) et la résistance à l'insuline, et à la gravité du syndrome métabolique. Dans un premier temps, il a été décrit qu'une augmentation d'homocystéine pourrait être associée à l'obésité, l'hypertension et diabète de type 2 (Fonseca, Fink, and Kern 2003). D'autres études ont documenté une relation négative entre l'homocystéine sérique et les folates, ainsi que entre l'insuline et les folates (Martos et al. 2006). En conséquence, le concept de l'efficacité de l'administration de l'acide folique par fortification, pour réduire la concentration d'homocystéine et ses effets nocifs potentiels, a été développé chez les adultes et enfants obèses (Sudchada et al. 2012)(Dehkordi et al. 2016). L'un des mécanismes possibles est que les folates peuvent diminuer le stress oxydatif et par conséquent, réduire le risque du diabète de type 2 (Song et al. 2009). Cependant, ces données sont controversées et quelques auteurs ont rapporté que, des fortes doses des folates pourraient être nocives et l'apport en excès d'acide folique pourrait conduire à des événements négatifs sur la santé (Smith, Kim, and Refsum 2008)(Jacob Selhub and Rosenberg 2016). Chez les animaux, un régime alimentaire riche en acide folique peut influencer la méthylation de l'ADN et des histones, ce qui conduit à des modifications phénotypiques dans les générations suivantes (Smith, Kim, and Refsum 2008). Chez l'homme, la concentration élevée en folates plasmatiques a été associée à une exacerbation des signes à la fois cliniques (anémie et les troubles cognitifs) et biochimiques (élévation de MMA et d'homocystéine plasmatiques) de carence en vitamine B12 (Jacob Selhub and Rosenberg 2016). En plus, même avec une concentration normale en vitamine B12, une forte consommation en folates chez la personne âgée peut être associée à une neuropathie en présence du polymorphisme de la transcobalamine 776C→G (Sawaengsri et al. 2016). Une étude récente a mis en évidence que la concentration en folates érythrocytaires maternelle et du cordon étaient plus élevées, par rapport aux valeurs habituelles, après la fortification en folates systématique au Canada, ce qui peut avoir une incidence sur les résultats à long terme des enfants. (Plumptre et al. 2015). Notre étude a montré pour la première fois qu'un statut élevé en folates chez les patients atteints d'obésité morbide a été associé à une augmentation de la résistance à l'insuline et un syndrome métabolique plus sévère. Les mécanismes sous-jacents de cette relation ne sont pas bien élucidés, et peuvent impliquer des altérations épigénétiques dans les tissu hépatique comme c'était récemment rapporté, chez les patients atteints de diabète de type 2 (Nilsson et al. 2015). De plus, nous croyons que ces données sont cliniquement pertinentes parce que la fortification en acide folique a été adoptée aux États-Unis depuis des années, et son introduire en Europe est en cours de discussion (Smith et al. 2016). En effet, l'enrichissement en acide folique est clairement associé à une augmentation des folates dans la population générale, cette stratégie pourrait être contreproductive et conduire à une incidence accrue des individus présentant une

résistance à l'insuline et un diabète de type 2 (Smith, Kim, and Refsum 2008)(Jacob Selhub and Rosenberg 2016).

Au cours des dernières années, des études réalisées chez l'homme et chez l'animal ont montré que la carence maternelle en vitamines B9 et B12 peut avoir un effet de programmation fœtale et augmenter le risque d'avoir un diabète et obésité chez les descendants (Guéant, Namour, et al. 2013)(Finer 2015). Le rôle de la vitamine B12 et les folates dans la programmation fœtale chez l'homme, a été décrite dans l'étude prospective Pune (C S Yajnik et al. 2008). Cette étude a montré que plus de 60% des femmes enceintes étaient déficiente en vitamine B12, et que la vitamine B12 était négativement corrélée avec l'homocystéine et l'acide méthyle malonique, ce qui reflète un vrai déficit en B12. Les enfants nés de ces femmes ont été étudiés à 6 ans. Ils ont montré que les concentrations les plus basses en vitamine B12 maternelle étaient associées avec le HOMA-IR le plus élevé chez les enfants., En plus, une concentration élevée en folates érythrocytaires maternels était prédictive l'adiposité et HOMA-IR accru chez les enfants (C S Yajnik et al. 2008). De manière intéressante, cette étude a montré pour la première fois que, les patients obèses présentant des valeurs vitamine B12 plasmatique plus basse associées aux valeurs en folates plasmatiques les plus élevées, étaient ceux qu'avaient une résistance à l'insuline plus sévère. Il y a des raisons potentielles expliquant pourquoi une carence en vitamine B12 pourrait être la cause de l'adiposité, en particulier en présence des folates normaux ou élevés (G V Krishnaveni et al. 2009). En cas de carence en vitamine B12, les folates cellulaires se trouvent piégés sous forme de 5-méthyltetrahydrofolate, celui-ci est une forme inactive. Cela peut conduire à un défaut de transfert de groupement méthyles, et donc de la synthèse des protéines, ce qui peut occasionner son le dépôt dans le tissu maigre. Par ailleurs, la conversion de MMA en succinyl-CoA est impacté par la carence en vitamine B12 (celle-ci agit comme un co-enzyme), et résulte en l'accumulation de MMA, et peut augmenter la lipogenèse et la résistance à l'insuline. Bien que, les folates ne participent pas à ces voies, il a été démontré que dans le cas d'une déficience en vitamine B12 associée à folates élevés, concentrations d'homocystéine et de MMA sont plus élevées (Jacob Selhub, Morris, and Jacques 2007)(G V Krishnaveni et al. 2009). Une autre explication pourrait être les modifications épigénétiques entraînées par la carence. Dans un modèle animal chez le mouton, une restriction alimentaire de vitamine B12, d'acide folique et de méthionine dans la période péri-conceptionnelle entraîne une modification la méthylation de l'ADN chez l'embryon, conduisant à une augmentation de l'adiposité et de la résistance à l'insuline chez la progéniture à la vie adulte. Enfin, la concentration de folates plasmatiques peut augmenter dans une carence en vitamine B12, en raison de l'absorption tissulaire réduite, et alors, il est possible que les associations liées aux folates sérique élevés ne sont pas dues à une consommation excessive d'acide folique, mais

plutôt à un déficit plus sévère en vitamine B12 (G V Krishnaveni et al. 2009). Nous pensons que d'autres études devraient confirmer les résultats de cette étude afin d'évaluer les mécanismes potentiels entre les marqueurs du métabolisme des monocarbones et les composants du syndrome métabolique.

Cette étude a plusieurs limites. Premièrement, il est une étude transversale avec les mesures de marqueurs du métabolisme des monocarbones en seulement deux périodes. Nous suggérons la réalisation des études ultérieures avec un suivi plus long, y compris une période du temps après la chirurgie bariatrique. Deuxièmement, les facteurs de confusion peuvent avoir un biais potentiel (facteurs alimentaires, mixité la population). Et troisièmement, nous avons identifié des associations, mais celles-ci ne définissent pas la relation cause - effet ou sa direction. Ces questions pourraient être étudiées en outre, par l'utilisation de modèles animaux et par des études de suivi des patients obèses à partir de populations avec et sans fortification en folate.

4.2. Etude N°2 L'étude du profil des acylcarnitines dans le syndrome métabolique

4.2.1. Introduction

Entre 1950 et 2000, l'espérance de vie dans les pays occidentaux a augmenté de 11.4 et 13.6 ans pour les hommes et les femmes, respectivement, et pendant une période de 10 ans, entre 1995 et 2005, la longévité a augmenté de 3 ans pour les hommes et 2 ans pour les femmes dans les pays Européens. La diminution de l'incidence de maladies cardio-vasculaires est le facteur clé de la baisse de la mortalité, ceci est contrebalancé par l'augmentation spectaculaire des maladies liées à l'âge, y compris l'obésité. La prévalence de l'obésité est en augmentation continue, pas seulement dans les pays industrialisés, mais également dans les pays avec un revenu bas ou intermédiaire, en particulier chez les personnes habitant dans un milieu urbain. Il est bien établi que, l'occidentalisation des habitudes alimentaires contribue à l'augmentation de la fréquence de l'obésité (Finucane et al. 2011). L'une des complications de l'obésité est le syndrome métabolique. Le syndrome métabolique est un ensemble de facteurs de risque interdépendants pour les maladies cardiovasculaires et le diabète. Ces facteurs comprennent, l'obésité en particulier l'adiposité centrale, une glycémie et de triglycérides élevés, une pression artérielle augmentée et un HDL-cholestérol diminué. (Alberti et al. 2009). En conséquence, les chercheurs ont mis l'accent sur l'identification des facteurs sous-jacents pouvant avoir une influence sur la physiopathologie de l'obésité et du syndrome métabolique, parmi ces facteurs, la génétique joue un rôle causal. En effet, au cours des dernières 15 années, avec l'arrivée d'études d'association pangénomique (GWAS), plusieurs gènes ont été identifiés comme facteurs causals de l'obésité. Outre que les études génétiques, les chercheurs se sont intéressés au profil métabolique des sujets obèses, et la plupart de ces études soulignent le fait que, l'excès de lipides conduit à une diminution de la capacité d'oxydation des acides gras. Dans d'autres termes, il existe une diminution de la bêta-oxydation. L'oxydation mitochondriale des acides gras est un processus biochimique ayant comme objectif la production d'énergie à partir d'acides gras. Cette bêta-oxydation devient cruciale au cours du jeûne prolongé. À jeun, le métabolisme énergétique du cerveau dépend principalement de deux substrats : du glucose provenant de la gluconéogenèse et des cétones produites par bêta-oxydation. Ces procédés ont lieu principalement dans le foie. Ensuite, les acides gras à chaîne longue entrent dans les mitochondries par une série de réactions dépendantes de la carnitine, ces acides gras sont transformés en acyl-CoA. L'oxydation complète d'un acyl-CoA à chaîne longue nécessite l'activité de trois groupes d'enzymes spécifiques des chaînes longues, moyennes et courtes (Sharma and Black 2009). Chaque cycle de la bêta-oxydation produit un acyl-CoA raccourci de 2 atomes de carbone et une molécule d'acétyl-CoA. L'oxydation des acides gras activés est catalysée par l'action séquentielle de quatre familles d'enzymes (acyl-CoA déshydrogénase,

l'énoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et 3-kétoacyl-CoA thiolase), chacun avec un substrat différent spécifique à court, moyen et long-chaîne acyl-CoA.

Peu d'études se sont intéressées au lien entre les acylcarnitines et l'obésité. Les études comparent en général le profil métabolique d'un sujet obèse versus un sujet mince. (Newgard et al. 2009), certains se concentrent sur la relation entre les précurseurs métaboliques et le phénotype obèse (Rauschert et al. 2014). D'autres études ont examiné l'impact de l'alimentation appelée occidentale sur le profil métabolique des sujets (Bouchard-Mercier et al. 2013), et enfin d'autres, ont comparé le phénotype des sujets obèses métaboliquement sains à celui de sujets obèses avec de complications. Nous avons réuni un ensemble de données de 648 femmes venant de 2 populations contrastées, afin d'étudier le profil métabolique de chaque composant du syndrome métabolique.

4.2.2. Matériel et Méthode

4.2.2.1. Population et recueil de données

Population Française.

Nous avons pris en compte toutes les femmes faisant partie de l'étude ALDEPI décrit dans l'étude n°1. Un total de 230 femmes consécutives, ont été recrutées dans un contexte d'une intervention chirurgicale bariatrique dans l'unité multidisciplinaire pour la chirurgie de l'obésité au CHU de Nancy. Parmi la population totale de femmes, trente-deux patientes avec une procédure bariatrique précédente ont été exclues, au total, nous avons analysé 220 femmes avec une obésité morbide. Les informations du projet ont été détaillées dans l'étude n°1.

Population Africaine.

Cette étude prospective a été menée sur de femmes du marché central Dantokpa à Cotonou, Bénin (Afrique de l'Ouest). L'étude a obtenu l'autorisation des comités d'éthique de la santé, de l'Université de Cotonou et du Ministère de la Santé. Quatre cent vingt-huit (428) femmes ont été recrutées. Un consentement éclairé par écrit a été obtenu pour chaque participant sa participation dans l'étude. Les femmes enceintes et celles qui ont accouché dans les trois mois précédent ont été exclues. Les femmes recrutées ont été soumis à un questionnaire sur les antécédents familiaux, le niveau d'éducation, l'activité physique, et de données anthropométriques : taille, poids, tour de taille, hypertension (pression artérielle systolique > 140 mmHg ou traitement anti-hypertensif), diabète de type 2, dyslipidémie, et maladies cardiovasculaires.

4.2.2.2. Analyses biochimiques

Les concentrations plasmatiques en acylcarnitines ont été mesurées par UPLC sur un système Acuity (Waters, USA) couplée à la spectrophotométrie de masse Q TRAP 4000 (Applied Biosystems MDS SCIEX, Ontario, Canada) (Guéant Rodriguez et al. 2013). Le reste d'analyses biochimiques ont été mesurées par les méthodes détaillées dans l'étude n°1.

4.2.2.3. Analyse statistique

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel STATA 12.1 (College Station, Texas, États-Unis). Les variables ne suivant une distribution normale ont été transformées de façon logarithmique. Les variables catégorielles ont été rapportées en nombre et en pourcentage, et les variables continues en médiane et écart-type (SD). Un test du chi-carré a été utilisé pour évaluer les différences entre les variables nominales. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour évaluer les différences de moyennes entre deux groupes. L'analyse de régression linéaire multiple a été utilisée pour évaluer les déterminants indépendants des acylcarnitines. Les analyses multivariées ont tenu compte de variables qui avaient une valeur $p < 0.1$ et ont été ajustés à l'âge. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

4.2.3. Résultats

4.2.3.1. Caractéristiques cliniques et biologiques de la population Française

La population Française était composée de deux cent vingt femmes, l'âge moyen était de 45 ± 0.8 ans, 143 patientes (65.0%) avaient un syndrome métabolique selon la définition de l'IDF (Alberti et al. 2009). Et 85 (38.6%) patientes avaient une concentration en triglycérides élevée ; 164 (74.9%) avaient une concentration de HDL-cholestérol basse (inférieur à 0.5 g/L); 85 (38.6%) avaient une pression artérielle élevée et/ou un antécédent d'hypertension, et 85 (38.6%) avaient une concentration en glucose élevée et/ou un diabète de type 2 (DT2°. Les patientes atteintes d'un syndrome métabolique étaient plus âgées que les femmes sans syndrome métabolique. Et avaient une concentration en glucose, insuline, ASAT et ALAT plus élevées (Tableau 7).

4.2.3.2. Concentrations en acylcarnitines:

Nous avons comparé, le profile des acylcarnitines en fonction de la présence du syndrome métabolique dans les deux cohortes.

Dans la cohorte Française, les femmes atteintes du syndrome métabolique présentaient des concentrations plus élevées de la plupart des acylcarnitines ; carnitine totale (47.5 ± 1.0 pmol/L vs 43.2 ± 1.2 pmol/L, $p = 0.0037$), carnitine libre (36.4 ± 0.9 pmol/L vs 33.0 ± 0.9 pmol/L, $p = 0.0199$), et de chaînes courtes et moyennes, (0.73 ± 0.02 pmol/L vs 0.61 ± 0.01 pmol/L, $p < 0.0001$; 1.51 ± 0.06 pmol/L vs 1.35 ± 0.03 , $p = 0.0907$). Aucune différence n'a été observée dans chaîne longue (0.83 ± 0.02 pmol/L vs 0.80 ± 0.01 pmol/L, $p = 0.3316$). Ces observations sont quasiment similaires dans la cohorte Africaine, mais comme nous l'avons signalé au début, les chaînes moyennes et longues étaient significativement plus élevées chez les femmes atteintes du syndrome métabolique (Figures 20).

Chez les femmes Françaises, nous avons observé principalement, une concentration plus élevée en Acylcarnitines de chaîne courte (C3, C4 et C8) chez les femmes avec un Syndrome Métabolique, comparée à celles de femmes sans Syndrome Métabolique. Alors que, dans la population Africaine, les femmes ayant un Syndrome Métabolique avaient une élévation des acylcarnitines à chaîne courte (C3), mais également, celles à chaîne moyenne (C8, et C10) (Figures 19).

Tableau 7. Caractéristiques cliniques et biologique des patients femmes obèses sans ou avec le syndrome métabolique.

		Metabolic syndrome Obese patients		
		No <i>n</i> =77 (35.0%)	Yes <i>n</i> =143 (65.0%)	
	Composant MetS	Mean ± SD	Mean ± SD	<i>P</i>
Anthropometric measures				
Age, years		42 ± 1	47 ± 1	0.0031
Weight, kg	Yes	120.6 ± 1.9	121.5 ± 1.6	0.9385
Hip circumference, cm	Yes	138.1 ± 1.9	137.5 ± 1.8	0.2164
Waist circumference, cm	Yes	124.5 ± 2.0	124.8 ± 1.4	0.8877
Waist/hip ratio (WHR)	Yes	0.89 ± 0.02	0.93 ± 0.01	0.0068
BMI, kg /m ²	Yes	45.3 ± 0.6	46.4 ± 0.6	0.4657
Fasting biochemistry				
Glucose, mmol/L	Yes	4.8 ± 0.9	6.4 ± 0.2	<0.0001
Insulin, µU/mL	Yes	35.2 ± 2.8	63.1 ± 5.1	<0.0001
HOMA-IR	Yes	7.6 ± 0.6	19.2 ± 2.1	<0.0001
Total Cholesterol, g/L		1.9 ± 0.0	1.8 ± 0.0	0.1613
HDL-Cholesterol, g/L	Yes	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.0	<0.0000
LDL-Cholesterol, g/L		1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.0	0.0061
Triglycerides, g/L	Yes	1.1 ± .0.0	1.7 ± 0.1	<0.0001
ALAT, UI/L		24.1 ± 2.1	43.4 ± 3.2	<0.0001
ASAT, UI/L		22.9 ± 1.4	37.8 ± 2.4	<0.0001
Ratio ASAT/ALAT		1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.0721
Metabolic profiling				
Homocysteine, µmol/L		13.5 ± 0.4	13.1 ± 0.4	0.2379
Folates, nmol/L		10.6 ± 0.7	12.8 ± 0.8	0.0222
Vitamin B12, pmol/L		229.5 ± 10.0	290.9 ± 35.3	0.0605
Total carnitine, µmol/L		43.2 ± 1.2	47.5 ± 1.0	0.0037
Free carnitine, µmol/L		33.0 ± 0.9	36.4 ± 0.9	0.0199
Short chain, µmol/L		0.61 ± 0.01	0.73 ± 0.02	<0.0001
Medium chain, µmol/L		1.35 ± 0.03	1.51 ± 0.06	0.0907
Long chain, µmol/L		0.80 ± 0.02	0.83 ± 0.02	0.3316
Very long chain, µmol/L		0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.6030

Baseline characteristics are presented according to absence (No) or presence (Yes) of metabolic syndrome as means ± SDs. The Mann-Whitney U test was performed to assess differences (*P* values). BMI: body mass index; HOMA-IR: homeostasis model assessment for insulin resistance; HDL-C: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein; ALAT: alanine amino transferase; ASAT: aspartate amino transferase

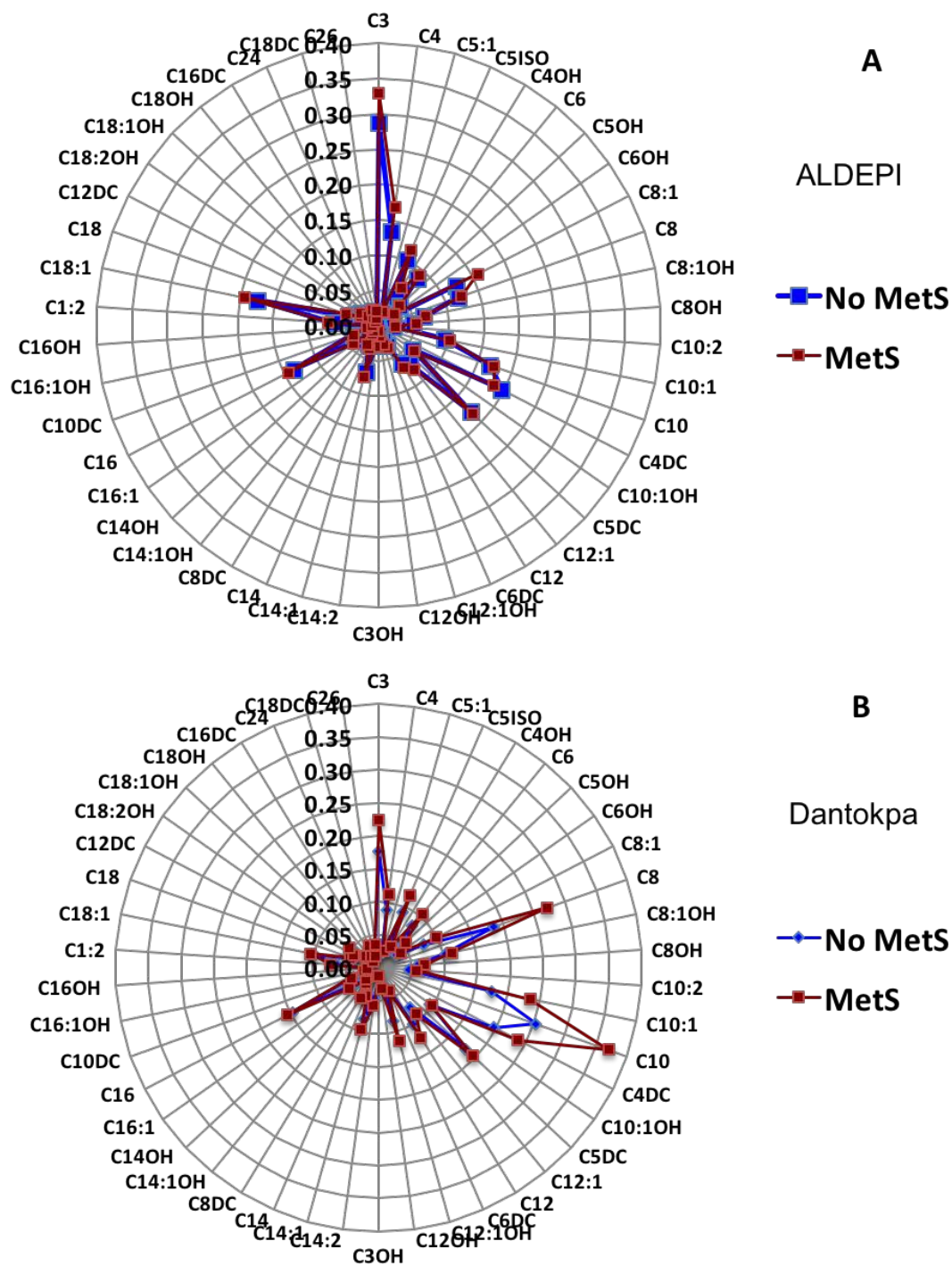


Figure 19. Les analyses du profil d'acylcarnitines en fonction de la présence ou absence du syndrome métabolique.
(La figure A représente la cohorte Française et la figure B représente la cohorte Africaine)

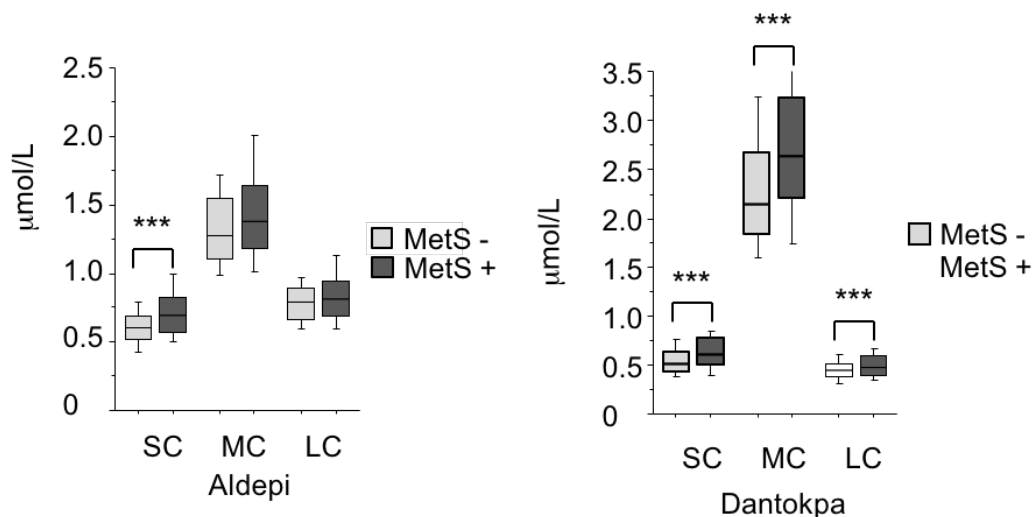


Figure 20. Les analyses du profil d'acylcarnitines en fonction de la présence ou absence du syndrome métabolique.

(La figure à gauche représente la cohorte Française et la figure à droite représente la cohorte Africaine)

Nous n'avons évalué de manière indirecte les activités des enzymes participant à la bêta oxydation des acides gras, à savoir l'activité de la carnitine palmitoyl transférase I mitochondriale (CPT1). Nous n'avons pas observé de différence dans l'activité CPT-I (calculé à partir du ratio octadécanoyl carnitine + hexadécanoyl carnitine / carnitine libre (C18 + C16) / C0). L'évaluation de l'oxydation des acides gras mitochondriale à carbone pairs, caractérisée par la détermination du ratio carnitine libre/acétylcarnitine (C2/C0), et l'activité globale de la β-oxydation (mesurée par le ratio acétylcarnitine + propionylcarnitine / carnitine libre (C2 + C3) / C0)) n'a pas montré de différence significative entre les femmes ayant un syndrome métabolique.

Concentrations en acylcarnitines selon les composants du syndrome métabolique

Afin de savoir, qui était la principale composante du MetS responsable de l'élévation des acylcarnitines. Nous avons examiné la concentration de courtes, moyennes et longues chaînes acylcarnitines dans chaque composant. Étant donné que la population française était uniquement de femmes obèses, le critère de l'obésité a été évaluée selon le rapport taille / hanche (RTH). Aucune différence n'était observée. Par contre, dans la population Africaine, on a observé une augmentation importante des acylcarnitines à chaîne courte et moyenne (0.91 ± 0.04 vs 0.79 ± 0.01 , $p < 0.0001$ et 1.65 ± 0.04 , $p < 0.0001$, respectivement) et une augmentation modérée des acylcarnitines chaîne longue (0.82 ± 0.01 vs 0.77 ± 0.02 , $p = 0.0322$).

En ce qui concerne les triglycérides, chez les femmes Françaises avec une concentration élevée de triglycérides, les acylcarnitines à chaîne courte étaient plus élevées (0.73 ± 0.02 vs $0.65 \pm$

0.02, $p = 0.0018$). Par contre, chez les femmes Africaines, aucune différence significative n'a été observée.

De la même façon, les Françaises ayant une faible concentration en HDL-C, les acylcarnitines à chaîne courte étaient plus élevées (0.70 ± 0.02 vs 0.63 ± 0.02 , $p = 0.0367$). Alors que, chez les femmes africaines à faible HLD-C, les chaînes moyennes et longues étaient plus élevées (1.62 ± 0.04 vs 1.49 ± 0.05 , $p = 0.0178$ et 0.83 ± 0.01 vs 0.79 ± 0.01 , $p = 0.0371$, respectivement).

Les femmes diabétiques Françaises avaient une concentration plus élevée des acylcarnitines à chaîne courte de (0.73 ± 0.02 vs 0.64 ± 0.01 , $p = 0.0002$). Aucune différence n'était observée chez les Africaines.

Le résultat le plus important et intéressant a été observé chez les femmes souffrant d'hypertension artérielle systémique. En effet, quelque soit la population, Française ou Africaine, nous avons observé une concentration plus élevée des acylcarnitines de courte, moyenne ou longue chaîne. Chez les Françaises, les différences de concentration étaient : 0.73 ± 0.02 vs 0.66 ± 0.02 , $p = 0.0073$ pour les chaînes courtes; 1.52 ± 0.05 vs 1.40 ± 0.05 , $p = 0.0026$ pour les chaînes moyennes et 0.86 ± 0.02 vs 0.79 ± 0.01 , $p = 0.0093$ pour les chaînes longues. Et chez les femmes Africaines : 0.92 ± 0.00 vs 0.85 ± 0.01 , $p = 0.0014$; 1.74 ± 0.06 vs 1.46 ± 0.04 , $p < 0.0001$ et 0.88 ± 0.02 vs 0.77 ± 0.01 , $p < 0.0001$, respectivement.

4.2.4. Discussion

Cette étude a été menée dans deux populations contrastées, l'une dans la région côtière du Bénin et l'autre en France. En Afrique, la population souffre d'une transition nutritionnelle due à une amélioration du statut économique et surtout au changement des habitudes alimentaires avec une adoption de la nourriture occidentale de type *fast food*. En Afrique sub-saharienne plusieurs études sur le syndrome métabolique ont été menées principalement pour décrire sa fréquence et le lien avec les déterminants cliniques et biologiques en relation à l'environnement nutritionnel, et les différences par rapport aux populations sub-sahariennes. (Gyakobo et al. 2012)(Kengne et al. 2012)(Fezeu et al. 2007)(Tran et al. 2011)(Sodjinou et al. 2008). Chez les Africaines, la fréquence du syndrome métabolique dans notre étude était seulement de 20% toute femme confondue, et de presque 40% si on considère uniquement les femmes obèses. Malgré cela, la fréquence du syndrome métabolique reste plus faible par rapport à la fréquence observée chez les femmes afro-américaines. Une étude récente réalisée chez 1965 femmes afro-américaines provenant de l'Enquête Nationale sur la santé et la nutrition (NHANES) entre 2007 et 2011 montre une fréquence élevée du syndrome métabolique, de presque 50% (Malayala and Raza 2016). La différence de fréquence entre le continent Africain et Américain peut s'expliquer par la forte prévalence de l'obésité aux États-Unis, atteignant souvent près de la moitié de la population. En effet, de données récentes issues de l'Enquête nationale sur la santé et la nutrition (NHANES) menés sur une année, montrent que, plus de 78 millions d'adultes Américains (35%) sont obèses, parmi eux, environ 40% sont des adultes d'origine caucasienne et 56% sont de femmes Afro-américaines (Gu et al. 2016).

En France, la fréquence du syndrome métabolique dans la population générale est inférieure à celle des États-Unis. En effet, une étude de cohorte de sujets sains concernant 3726 participants adultes (SUVIMAX), a observé que seulement 524 sujets (14%) développaient un Syndrome métabolique au cours du suivi à 13 ans (Neufcourt et al. 2015). En ce qui concerne notre population Française, la fréquence très élevée du syndrome métabolique s'explique par le fait que cette population est constituée uniquement de femmes obèses.

4.2.4.1. Les caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée

Des études ont montré que la dyslipidémie joue un rôle causal dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline (Morino, Petersen, and Shulman 2006). Dans la présente étude, nous avons observé une élévation des triglycérides chez des sujets présentant un syndrome métabolique dans les deux populations. Le flux élevé de triglycérides circulants conduit à une augmentation de la malonyl-CoA dans les tissus, principalement au niveau musculaire et une diminution de

l'oxydation d'acides gras dans le foie (McGarry 2002). Par conséquent, les lipides vont se dégrader vers les voies d'estérification. L'accumulation d'acides gras estérifiés dans les tissus peut contribuer à une accumulation de métabolites dérivés de lipides tels que le diacylglycerol, les céramides, les cétones, les prostaglandines et d'autres lipides partiellement oxydés, et tout ceci peut affecter la signalisation de l'insuline et contribuer au développement d'une insulino-résistance et un diabète. (Morino, Petersen, and Shulman 2006)(Summers 2006)(Chaurasia and Summers 2015). Les acylcarnitines sont de métabolites issus du métabolisme oxydatif intermédiaire qui comprennent un acide gras estérifié à une molécule de carnitine. (Reuter and Evans 2012) Elles sont générées par les enzymes mitochondriales et peroxysomales, leur rôle est le transport des acides gras à longue chaîne (LCFAs) à travers la membrane mitochondriale pour subir la β -oxydation. Les concentrations et les rapports des acylcarnitines anormaux sont indicatifs d'une déficience de l'activité des déshydrogénases mitochondriales comme l'acyl-CoA réductase, la longue chaîne acyl-CoA déshydrogénase (VLCAD) et la chaîne moyenne acyl-CoA déshydrogénase (MCAD) (Rinaldo, Matern, and Bennett 2002)(Guéant Rodriguez et al. 2013). Étant donné que le profil des acylcarnitines est classiquement utilisé pour le diagnostic des maladies héréditaires métaboliques, on connaît peu sur le profil des acylcarnitines dans la population générale ou chez les personnes atteintes du syndrome métabolique et / ou obèses. Certaines études ont décrit le profil des acylcarnitines sur de populations Africo-Américaines, (24, 25) (Patel, et al 2013; Adams 2009) et seulement quelques-unes ont étudié ce profil dans des populations purement Africaines (Mels et al. 2013). A notre connaissance, c'est la première étude menée dans deux populations contrastées : les femmes Africaines et Européennes, ayant comme objectif, étudier l'association entre les acylcarnitines et les composants du syndrome métabolique.

En outre, en cohérence avec notre hypothèse de travail, nous avons trouvé dans les deux populations une élévation significative de la concentration de carnitine libre, totale et acylcarnitines à chaîne courte chez les femmes avec un syndrome métabolique. Par contre, les acylcarnitines à chaîne moyenne et longue étaient plus élevées uniquement chez les femmes Africaines ayant un syndrome métabolique. L'augmentation des acylcarnitines à chaîne courte peut être expliquée en partie par un changement des habitudes alimentaires chez les sujets avec syndrome métabolique. Une étude récente menée par Bouchard-Mercier et al, a comparé le profil métabolique de 210 sujets en bonne santé selon deux typologies alimentaires: la typologie dite « Prudente » caractérisée par des apports plus élevés en légumes, fruits, produits céréaliers à grains entiers, acides gras non hydrogénés, et la typologie alimentaire dite « Occidentale », constituée d'un apport peu élevé en céréales, légumes, fruits, etc, mais plus riche en produits raffinés, desserts, sucre et viandes transformées (Bouchard-Mercier et al. 2013). Dans cette étude,

le profil métabolique de la typologie « Occidentale » a été associée à de signatures métaboliques spécifiques caractérisées par de concentrations élevées en acides aminés ramifiés (BCAA) et en acylcarnitines à chaîne courte. Une autre étude comparant des sujets obèses aux maigres, a montré une élévation de C3, C5, C6, C8:1 chez les obèses (Newgard et al. 2009). Nous avons observé dans notre étude, une élévation de C3, C4 et C5 chez les femmes atteintes d'un syndrome métabolique. Étant donné que, les acides aminés ramifiés comme la leucine et l'isoleucine, contribuent au moins à 25% de la réserve en acétyl-CoA, et la contribution de la valine et l'isoleucine est de 100% pour la réserve en propionyl-CoA (Crown, Marze, and Antoniewicz 2015). L'élévation de C3 et C5 dans notre étude peut s'expliquer par une typologie alimentaire occidentale chez les femmes Françaises, mais pas chez les femmes Africaines où le mode alimentaire est différent avec un apport plus riche en fibres. Wolk et al., ont démontré que les concentrations en propionyl-carnitine reflètent la réserve de propionyl-CoA et d'acétyl-CoA pendant l'adipogénèse (Wolk, Furuheim, and Vessby 2001). D'après cette observation, d'autres études récentes ont montré que les acides gras à chaîne impaire peuvent être produits aussi par les adipocytes, conduisant à leur accumulation au cours de la différenciation cellulaire. Ceci a été démontré en particulier, chez les patients présentant une acidémie propionique ou acidémie méthylmalonique, pour laquelle on sait qu'il existe un excès en propionyl-CoA (Wendel 1989) (Crown, Marze, and Antoniewicz 2015). En outre, l'acide propionique et l'acide isobutyrique peuvent être produits par le microbiote intestinale (Saric et al. 2008), donc une augmentation dans le plasma peut refléter de manière indirecte un changement du microbiote chez les sujets obèses (Raman et al. 2013).

4.2.4.2. Acylcarnitines et les composants du syndrome métabolique

Récemment, plusieurs études ont démontré que les concentrations circulantes élevées en acides aminés ramifiés (BCAA) peuvent servir comme biomarqueurs de prédiction du développement de l'insulino-résistance et / ou DT2 (Huffman, Shah 2012, Fiehn, Wang). Si on considère que les acylcarnitines à chaînes courtes reflètent la concentration en acides aminés ramifiés, on pourrait supposer que ces acylcarnitines seraient plus élevées chez les femmes diabétiques dans notre population. Cependant, nous avons observé une relation entre les acylcarnitines à chaînes courtes et le diabète uniquement chez les femmes Françaises.

Par contre, nous avons observé une relation entre l'obésité et les acylcarnitines à chaîne court, moyen et long chez les femmes Africaines. Une étude réalisée sur des cellules musculaires humaines et de souris obèses en culture, a montré qu'un défaut de la bêta-oxydation des acides gras dans le muscle provoque une accumulation des acylcarnitine (Aguer et al. 2015). En outre,

Baker et al., ont démontré une altération de la beta-oxydation chez les patients obèses, ils ont mesuré les profils métabolomiques dans le plasma et le muscle squelettique, 4 heures après un repas hyper lipidique pendant 5 jours, les résultats montrent une accumulation des acylcarnitines à chaîne courte et moyenne (Baker et al. 2015). A contrario, une étude conçue chez les adolescents par Mihalik et al, a montré que les concentrations des acylcarnitines à chaîne courte et moyenne sont plus basses chez les sujets obèses et les diabétiques par rapport aux sujets maigres. Ces observations laissent qu'il existe une plasticité adaptative métabolique précoce chez les jeunes (Mihalik et al. 2012).

Nous avons trouvé une élévation uniquement des acylcarnitines à chaîne courte chez les femmes Françaises et une élévation des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue chez les femmes Africaines. Ces élévations globales chez les Africaines pourraient refléter une augmentation des lipides dans l'alimentation. Il existe peu d'études concernant la relation entre la dyslipidémie et acylcarnitines, une seule étude a révélé une augmentation des acylcarnitines à chaîne moyenne dicarboxyliques chez les souris nourries avec un régime hyperlipidique (Dahlhoff et al. 2014). Mais aussi pourrait refléter une incapacité de l'oxydation des lipides dans les mitochondries (Guéant Rodriguez et al. 2013).

Enfin, nous avons observé une élévation constante des acylcarnitines à chaîne courte, moyenne et longue dans les deux populations chez les sujets atteints d'hypertension systémique, cette observation est cohérente avec les observations de Mels et al., ils ont montré une corrélation entre la L-carnitine libre et de la pression systolique et diastolique chez des hommes Caucasiens et Africains (Mels et al. 2013). Les mécanismes sous-jacents ne sont pas bien expliqués. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette relation: la première possibilité est la différence de concentrations en L-carnitine dans une typologie alimentaire dite « occidentale » (Ramos-Roman et al. 2012); une seconde explication est l'existence d'une biosynthèse de carnitine élevée à la suite d'une demande accrue de des acides gras pour maintenir la fonction musculaire cardiaque dans de conditions d'une augmentation de la force de contraction en cas d'une hypertension, puisque l'oxydation des acides gras à chaîne longue est la principale source de combustible pour la production d'ATP (Sharma and Black 2009). Un troisième mécanisme sous-jacent pourrait être un dysfonctionnement de la production de la NO-synthase. Une étude récente a montré que les souris KO pour la NO synthase (- / -) avaient de concentration en carnitine plus basses (Tsyprikov et al. 2015). D'autres études suggèrent que le dysfonctionnement mitochondrial, secondaire à une perturbation de l'homéostasie de la carnitine, peut également altérer la voie de signalisation de l'oxyde nitrique (NO), et en conséquence provoquer le développement d'une dysfonction endothéliale (Sharma and Black 2009). Et enfin, une étude récente par Brittain et al,

chez les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire a révélé une augmentation des acylcarnitines à chaîne longue : palmitoylcarnitine (C16), stearoylcarnitine (C18), oleoylcarnitine (C18:1), et linoleylcarnitine (C18: 2), avec une élévation entre 1.5 à 2 fois par rapport aux témoins (Brittain et al. 2016). Pris dans leur ensemble, toutes les études démontrent que l'hypertension artérielle pulmonaire ou systémique est associée à des anomalies du métabolisme des acides gras.

4.1. Etude N°3 La programmation fœtale par une carence en donneurs de méthyles produit une cardiomyopathie et défaillance cardiaque chez des rats exposés à un régime alimentaire riche en lipide

4.1.1. Approches expérimentales (Modèle animal et traitements)

Le protocole expérimental s'intitule CHEBO (Contrôle ou Carencé, Hyper Énergétique, vitamine B ZérO). Les expérimentations animales ont été réalisées sur des rats Wistar (JanvierLabs, France) et ont été menées dans un établissement agréé (Inserm U954), selon la Directive 2010/63/UE du 22 septembre 2010. L'étude des animaux a été enregistrée et approuvée par le ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche sous la référence APAFIS#1498-2015082015582707v1. Des Rats femelles adultes ont été maintenues dans des conditions de laboratoire standard, selon un cycle d'alternance lumière/sombre de 12 heures, à température et hygrométrie contrôlées ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ et $\text{Rh } 50 \pm 5\%$) avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Un mois avant la gestation, les animaux ont été nourris soit avec un régime standard (avec 16 % de protéines et 60 % d'azote extrait exempt, l'apport calorique : était de 2,800 kcal/kg dans les rats contrôles et celles carencées. L'apport en vitamines B9 et B12 dans le groupe MDD était 0.04 mg/kg et 0.0 mg/kg, respectivement (SDS Dietex, Saint-Gratien, France). Le régime alimentaire fournit de la choline et de la méthionine (220 mg/kg et 0.4% de la teneur totale, respectivement). Nous avons équilibré le nombre de rats dans les deux groupes en excluant les rats en excès dans le groupe témoin. Le régime a été maintenu jusqu'au sevrage de la descendance (Jour 21 postnatal), puis tous les rats ont été nourris avec un régime alimentaire normal jusqu'à J50. La moitié d'entre eux ont ensuite été exposés à une alimentation HE (Hyper-énergétique) entre J50 et J450 selon le protocole expérimental ci-dessous. (Figure 21)

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL – CHEBO

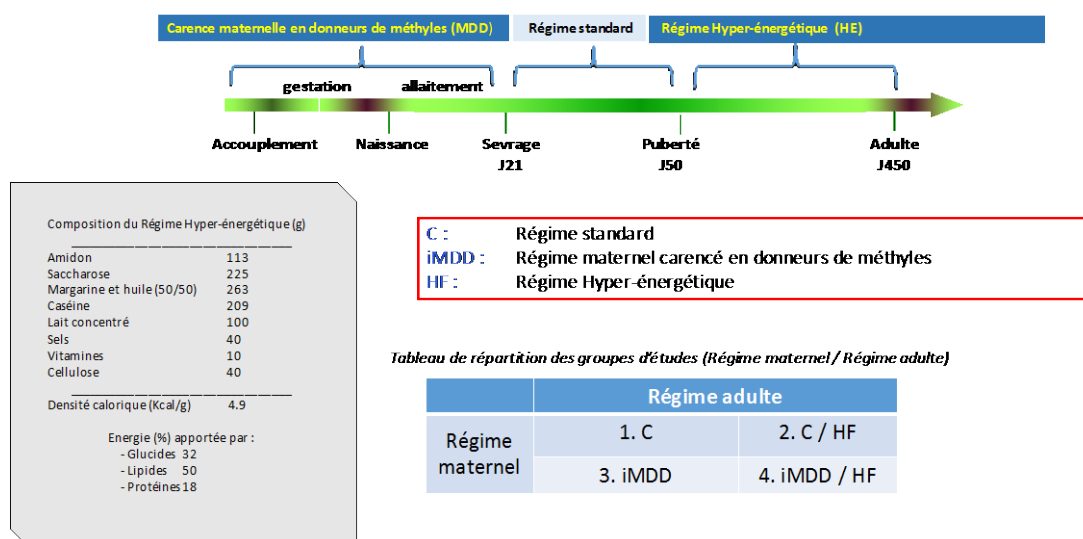


Figure 21. Le schéma du protocole du modèle animal.

Le régime hyper-énergétique (HF) apportait 32 % de glucides, 50 % de lipides et 28 % de protéines. Les animaux ont été mis à mort à 3 périodes de leur vie : J50, J185 et J400.

- 1) Contrôle / régime standard, nommé C
- 2) Contrôle / régime HE, nommé C/HF
- 3) Initialement carencé / régime standard, nommé iMDD*
- 4) Initialement carencé / régime HE, nommé iMDD*/HF

iMDD (initialement « méthyle donneur déficient »)

Les rats ont été mis à mort par décapitation après anesthésie complète à l'isoflurane et le sang total, le cœur et le foie ont été rapidement prélevés. Dans les suites, nous avons mesuré le poids corporel et celui des organes, cœur et foie. Immédiatement après la mise à mort, les prélèvements de sang effectués ont été placés dans des tubes héparinés dans la glace, puis centrifugés à 3.000 g/4°C/10 min pour séparer le plasma, ce dernier a été aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à son analyse. Le cœur et le foie ont été rapidement recueillis, lavés avec du PBS 1x (2.7 mmol/L de KCl, 140 mmol/L de NaCl, 6.8 mmol/L de Na₂HPO₄·2H₂O, 1.5 mmol/L de KH₂PO₄, pH7.4), congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à analyse des protéines et de l'ARN. Les échantillons de tissus utilisés pour les études histologiques ont été fixés dans du formol et inclus dans de la paraffine.

4.1.2. Méthodes d'analyse

4.1.2.1. Composition du corps entier en utilisant l'analyse DEXA. (Dual-Energy X-ray Absorptiometry)

L'analyse DEXA a été réalisée à l'aide d'un densitomètre QDR-4500A (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) avec un module pour le petit animal. Le logiciel identifie et évalue la masse maigre et grasse globale ou par secteurs, et exprimée en grammes ou en pourcentage. Les rats ont été anesthésiés avec une anesthésie par inhalation avec 1.5-3% de volume d'isoflurane (Forene® 100% (V/V), Abbott, Wiesbaden, Allemagne). Une fois anesthésiés, les rats ont été placés sur le ventre. Cinq mesures répétées ont été effectuées par le même investigateur. (Figure 22) La technique en détail se trouve dans les fiches techniques.

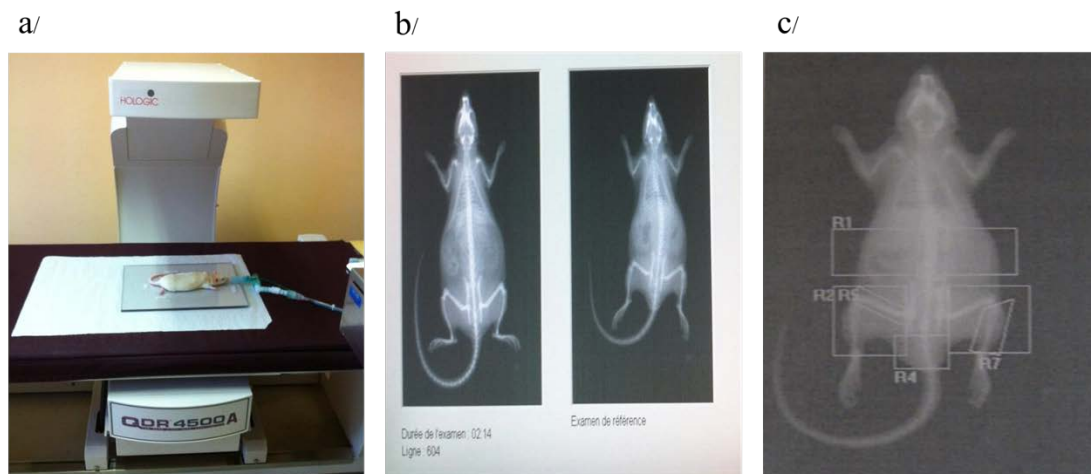


Figure 22. Examen de DEXA (Dual Energy X-ray ABSorimetry).

a/ Photographie prise lors de l'examen de DEXA. b/ et c/ Images obtenues après l'examen de DEXA.

4.1.2.2. L'exploitation fonctionnelle du myocarde

La fonction myocardique a été analysée à l'aide d'une tomographie par émission de positons adapté aux petits animaux (MicroPET Model M-1025T; Inveon Siemens Medical USA, Inc.) fournissant une résolution spatiale élevée (proche de 1 mm). Les animaux ont été mis à jeun pendant une nuit et anesthésiés par inhalation d'isoflurane (d'après le texte précédent) tout au long de l'enregistrement PET. Après une pré-médication orale par l'acide nicotinique (Acipimox, 50 mg / Kg, Pfizer), 74 MBq de ^{18}F -fluorodesoxyglucose (FDG) ont été injectés par voie intraveineuse. Le PET cardiaque fermé a été enregistré 60 minutes plus tard et pendant une période de 20 minutes dans un mode liste. Les pressions sanguines systoliques, moyennes et diastoliques ont été déterminées par pléthysmographie de poignet de queue pendant le processus d'enregistrement. Les images cardiaques ont été reconstruites par une méthode itérative (3D OSEM), en utilisant 16 intervalles de phase par cycle cardiaque, et ont été analysées chez tous les rats par le logiciel QGS pour déterminer le volume fin de systolique et de diastolique du ventricule gauche, la fraction d'éjection, volume d'éjection, taux de remplissage maximal, et le débit cardiaque (fréquence cardiaque x volume d'éjection) et la résistance artérielle périphérique (pression artérielle moyenne / débit cardiaque). (Figure 23)

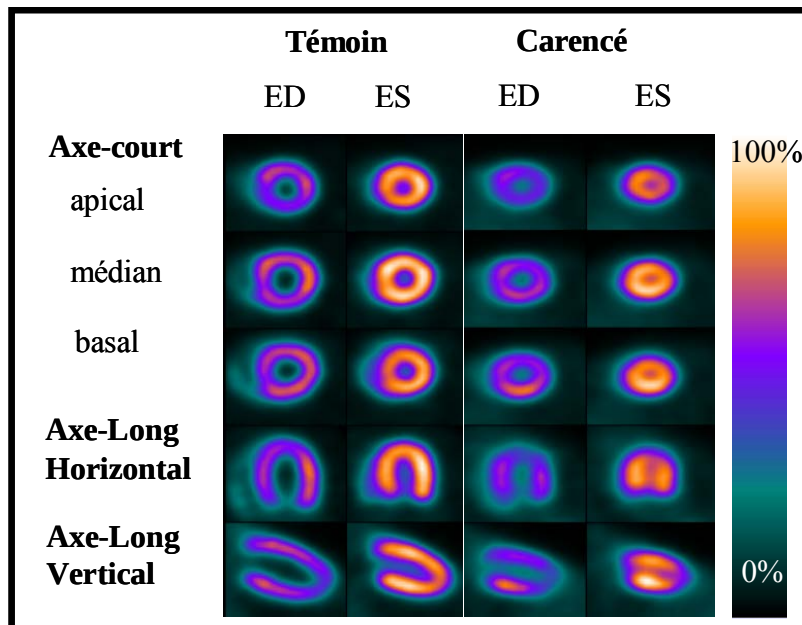


Figure 23. Examen de l'exploitation fonctionnelle myocardique (miniPET).
(ED :End- Diastole ES : End-Systole)

4.1.2.3. Analyses biochimiques.

Les métabolites du cycle des monocarbone (homocystéine, acide méthylmalonique,) ont été mesurés dans le plasma par chromatographie liquide haute performance (Waters, St Quentin, France) couplée à un spectromètre de masse (API 4000 QTRAP Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le dosage de l'angiotensine, du peptide natriurétique de type B (BNP45-Rat) et l'insuline ont été réalisés à l'aide d'un coffret RIA (Radio Immuno Assay) commercialisé par la société PHOENIX PHARMACEUTICALS (USA), selon les recommandations du fabricant. Les autres analyses biochimiques ont été mesurées comme c'était indiqué dans l'étude n°1.

4.1.2.4. Analyses histopathologiques.

Les examens histologiques des tissus colorés par l'hématoxyline-éosine-Safran (HES), le trichrome de Masson (Sigma) et le rouge Sirius, ont été effectués comme décrit précédemment (S. A. Blaise et al. 2007). Très brièvement, les organes préalablement fixés dans le formol (4 %, tamponné à pH 7.4) pendant 24h puis placés dans des cassettes d'inclusion avant d'être déshydratés par une série de bains d'alcool (70 %, 95 % et 100 %) et de toluène, puis imprégnés de paraffine dans un automate de type Excelsior ES (Thermoscientific, Pittsburg). A partir des blocs de paraffine ainsi obtenus, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (HM325, MicroM). Ces coupes sont ensuite montées à l'eau albumineuse sur des lames en verre traitées à la polylysine (Polylysine TM ; VWR international, Leuven, Belgique) pour les colorations ordinaires à l'hématoxyline-éosine-safran (HES) (coloration en bleu du noyau et le cytoplasme en rouge en vision de la structure globale) et au Trichrome (coloration

des fibres de collagène) pour confirmer la présence d'une fibrose. La coloration a été réalisée dans le Service d'anatomopathologie de l'hôpital centrale du CHU de Nancy. L'analyse histologique a été réalisée en utilisant des éléments semi-quantitatifs portant sur les lésions nécro-inflammatoires, fibrose et stéatose. Les techniques en détail se trouvent dans les fiches techniques.

4.1.2.5. Western Blot : Immuno-détection sur membrane

Cette méthode permet de détecter et quantifier l'expression des protéines et comporte trois étapes : la séparation des protéines sur gel (SDS-PAGE : « Sodium Dodecyl Sulfate Polyacryamide Gel Electrophoresis »), le transfert des protéines sur un support solide et la détection immunologique couplée à une révélation (Figure 24). La technique de déshybridation de membrane vise à dissocier les anticorps primaires accrochés sur les protéines et permet d'utiliser un nouvel anticorps sur la même matrice. (Les techniques en détail se trouvent dans les fiches techniques.)

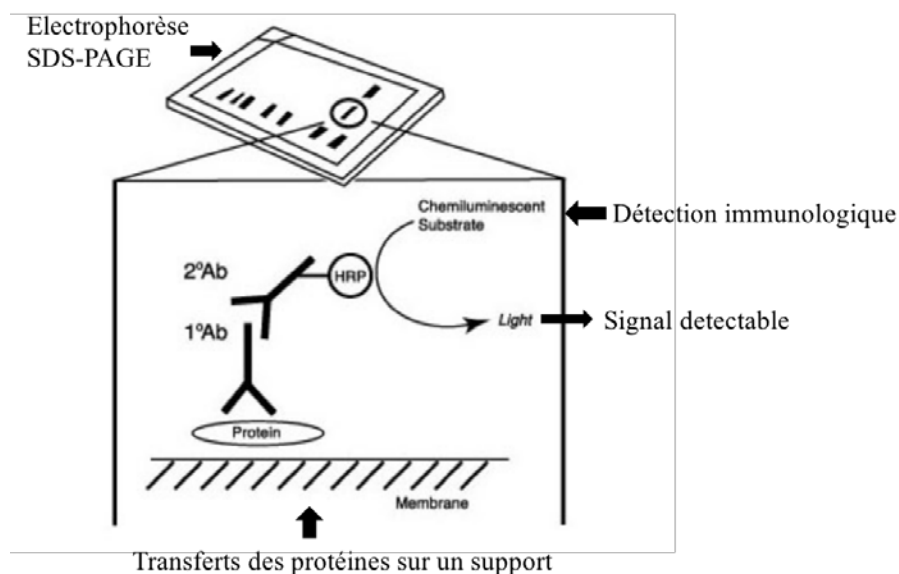


Figure 24. Le principe de western blot. Le substrat chimiluminescence qui a été utilisé est ECL.

(Amersham Pharmacia Biotech).

(a). Préparations et dosage des échantillons

Les tissus ont été broyés finement dans l'azote liquide sur lit de carboglace afin d'éviter la dégradation des protéines tissulaires. Les tissus ainsi broyés et pesés ont été lavés deux fois dans 10 volumes de PBS 1x pour éliminer l'excès de sang. L'extraction des protéines totales du tissu broyé a été réalisée par une lyse des tissus à l'aide du tampon RIPA (1 % Triton X-100, 1 % de sodium deoxycholate, 0.1% de sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.2M de sodium orthovanadate,

0.5mM de dithiothreitol, 200mM de bêta-glycerol phosphate et 20mM d'inhibiteur de protéase (Roche, Boulogne-Billancourt, France)) à raison de 100 µL / 10 mg de tissu. La lyse est complétée par un broyage mécanique à l'aide d'une seringue de 1 mL associée à une aiguille de 0.45 mm de diamètre permettant une homogénéisation (20 Allers/retours) tout en maintenant les échantillons dans la glace. La concentration en protéines est ensuite mesurée en utilisant la méthode de dosage de l'acide bicinchoninique (BCA) via le kit BCA Protein Assay® Reagent (Uptima) selon les recommandations du fabricant. C'est une méthode colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (BCA). En milieu alcalin, les protéines réduisent proportionnellement les ions cuivriques (Cu^{2+}) en ions cuivreux (Cu^{+}). Le BCA est un réactif chromogène réagissant avec les ions cuivreux pour former un complexe violet avec un pic d'absorbance à 562 nm. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préparée à partir d'une solution de BSA (Bovine serum albumin).

Un total de 20-30 µg de protéines seront analysés pour chaque échantillon et chaque type de protéine étudiée. Les quantités de protéines déposées sur SDS-PAGE sont équivalentes, et les volumes sont ajustés avec le tampon RIPA. Les échantillons sont ensuite mélangés avec un volume identique de tampon 2 x Laemmli (SIGMA, S3401-1VL, Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, glycérol 20%, 2-mercaptoéthanol 10% (v/v), bleu de bromophénol 0.004%, pH 6,8) et dénaturé par chauffage pendant 5 min à 100°C.

(b).Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est une méthode de séparation des protéines au travers d'un gel de polyacrylamide de 6 à 15%. Deux types de gels sont préparés préalablement dont un gel de séparation et un gel de concentration dit aussi « stacking » qui doit être coulé sur le gel de séparation. L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes, grâce à la présence de SDS (SIGMA, L4509) qui va dérouler la structure tridimensionnelle des protéines tout en apportant des charges négatives à l'ensemble des peptides, permettant ainsi la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire uniquement. L'électrophorèse est réalisée dans un système de migration verticale (Mini Protean III, BioRad®, USA).

Le marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad, 161-0374) et les échantillons sont déposés dans les puits du gel de concentration. Les protéines migrent à voltage constant de 80 V pendant 15 min puis de 110 V pendant environ 90 min, dans le tampon de migration 1x (Tampon 10X : pH 9.2 ; Tris 480 mM ; Glycine 390 mM ; SDS 0.375 % ; eau ultra pure qsp 1L ou eau Milli Q (MQ)) à température ambiante.

(c). Transfert

Les protéines séparées sont transférées soit sur une membrane nitrocellulose ou PVDF (**P**oly**v**inylidene **d**ifluoride, Bio-Rad®). PVDF doit être perméabilisée au méthanol au moins 1 minutes. Le transfert se fait à l'aide d'un système de transfert (Tank transfer systems, 1170-3930 Bio-Rad®, USA), dans une solution de transfert 1x (Tampon 10X : pH 9,2 ; Tris 480 mM ; Glycine 390 mM ; SDS 0,375% ; eau ultra pure qsp 1L) pendant 45 min à 350 mA. Bien qu'il existe un autre système de transfert dit semi-sec, c'est l'électro-transfert liquide qui est utilisé par référence dans la thèse car il chauffe moins et il est plus homogène. Un montage type « sandwich », formé d'une éponge, 3 papiers filtres, la membrane, le gel, 3 papiers filtres (les bulles d'air doivent être éliminées) et une éponge avec l'aide d'une cassette est placé dans la cuve de transfert, selon schéma ci-après. (Figure 25)

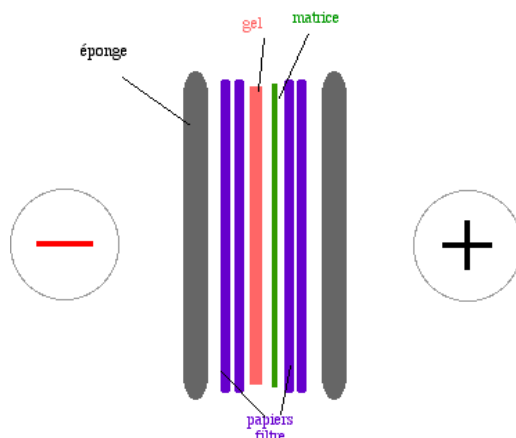


Schéma de montage pour transfert de protéines sur membrane PVDF ou nitrocellulose

Figure 25. Le principe de transfert sur un support membranaire.

Un bac de glace est placé dans la cuve et la cuve est entourée avec de la glace pilée pour protéger de la dégradation des protéines. A la fin de cette étape, on réalise une coloration au rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2 % (p/v), acide acétique 0.1 % (v/v), filtrée à 0.2 µm, 4°C) qui peut s'avérer être utile pour vérifier l'intégrité du transfert, tout en permettant de bien couper les membranes si besoin.

(d). Immunoblot

La membrane est placée dans la solution de blocage (Tris Buffered Saline Tween : TBST-Lait/BSA 5 %) pendant 1 heure sous agitation lente à température ambiante, pour saturer tous les sites de la membrane non occupés par des protéines, puis incubée pendant une nuit à 4°C sous agitation lente avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. Suite à 4 lavages de 10 min avec du TBST 1x (Tampon TBS 10X : pH 7.4 ; NaCl 1.5 M ; Tris 200 mM ;

eau ultra pure qsp 1L + Tween20 0.1%), la membrane est incubée pendant 1 h sous agitation lente avec un anticorps secondaire, reconnaissant la partie constante (Fc) de l'anticorps primaire) à T° ambiante. Généralement, les anticorps sont dilués dans la solution de blocage avec certaine dilution. Puis 4 lavages avec du TBST 1x, la révélation est réalisée par chimiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). La peroxydase, en présence de son substrat, le luminol, émet de la lumière détectée par l'appareil Fusion FX7 (ThermoFisher).

(e). Déshybridation de membrane Western-Blot

Cette technique est le plus souvent utilisée pour révéler les protéines de référence (β -actine, GAPDH, etc) quand les poids moléculaires sont proches des protéines d'intérêt. Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaires et secondaires ont été repris pour les ré-incuber avec un autre anticorps. Deux techniques de déshybridation peuvent être utilisées. La première est réalisée avec un tampon de déshybridation 1x (TrisHCl 62,5 mM, 2-mercaptoéthanol 100 mM, SDS 2 %) en chauffant à 50°C dans un bain-marie sous hotte aspirante. La deuxième technique est préférentiellement utilisée car elle est plus efficace et plus douce que la première, limitant la dégradation des protéines sur la membrane. Enfin, le Western Blot est repris à partir de la phase Immunoblot.

(f). Analyse densitométrique

La chimiluminescence des bandes présentes sur les membranes est quantifiée par le logiciel imageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Une zone est délimitée autour de la bande et le programme mesure la densitométrie par contraste entre la protéine et le bruit de fond.

4.1.2.6. Analyses statistiques

Analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel «StatView». Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et d'écarts types (SD). Pour le calcul de densitométries en Western Blot, chaque échantillon a été normalisé grâce à la valeur de densitométrie de la β -actine (protéine de référence). La comparaison des moyennes entre les groupes a été évaluée en utilisant le test d'ANOVA à un facteur. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significativement différente. Les résultats sont indiqués par des étoiles (*) dans les figures (*p-value < 0.05 ; **p-value < 0.01 and ***p-value < 0.001).

4.1.3. Résultats

4.1.3.1. Anomalies métaboliques, fonctionnelles et histologiques

L'évaluation de la distribution de tissu adipeux par DEXA montre que les rats nés de mères nourries avec un régime déficient en donneurs de méthyles (iMDD) pendant la grossesse et l'allaitement ont développé une obésité abdominale dès J50. Alors que, à J185 seulement les rats soumis à un régime hyper-énergétique (C/HF et iMDD/HF) avaient une obésité abdominale (Figure 26). (Bison et al. 2016)

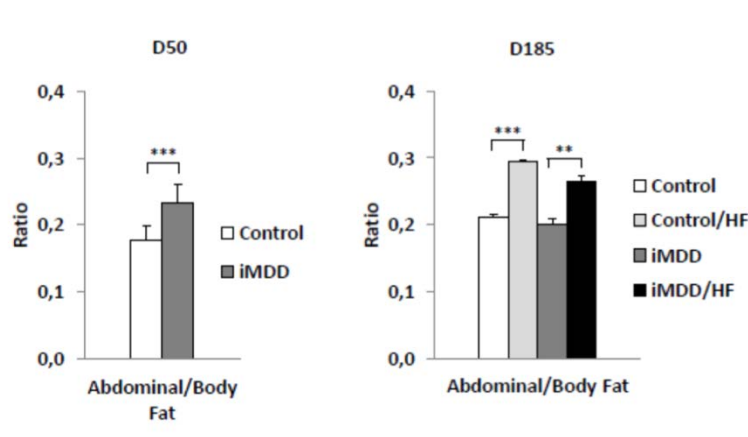


Figure 26. Adiposité abdominale chez les rats de 50 jours et 185 jours.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

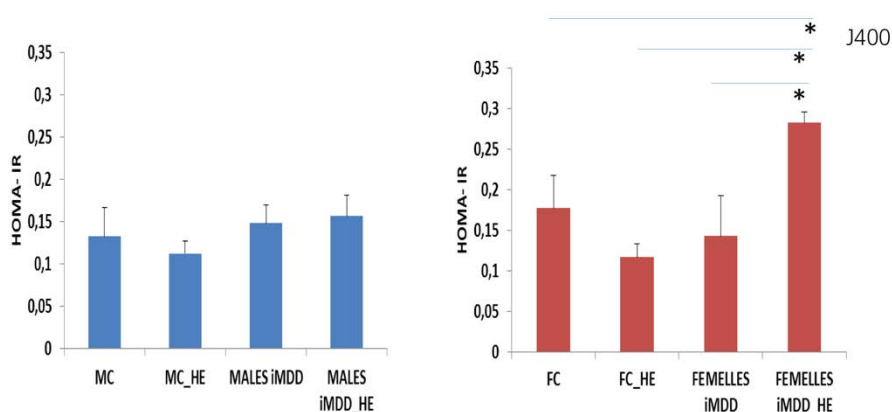


Figure 27. L'index HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) selon dosages plasmatiques du glucose et de l'insuline chez les rats à J400.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

Afin d'évaluer l'existence éventuelle d'une insulino-résistance en rapport à l'obésité abdominale, nous avons dosé le glucose et l'insuline plasmatiques et nous avons calculé l'index HOMA-IR

(Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance). Aucune différence entre les groupes n'était observée ni à J50 ni à J185. Par contre, à J400 l'index HOMA-IR était plus élevé chez les rats femelles iMDD/HF par rapport aux autres groupes ($p<0.01$) ($p<0.01$) (Figure 27).

En regard de la fibrose, nous avons mesuré l'angiotensine et les peptides natriurétiques de type B. On a observé une concentration en angiotensine plasmatique très élevée chez les rats iMDD à J50 et chez les rats iMDD ou iMDD+HF à J185. Étonnamment, en dehors d'une élévation modérée dans le groupe de mâles iMDD nous n'avons pas observé d'élévation significative de l'angiotensine à J400. (Figure 28)

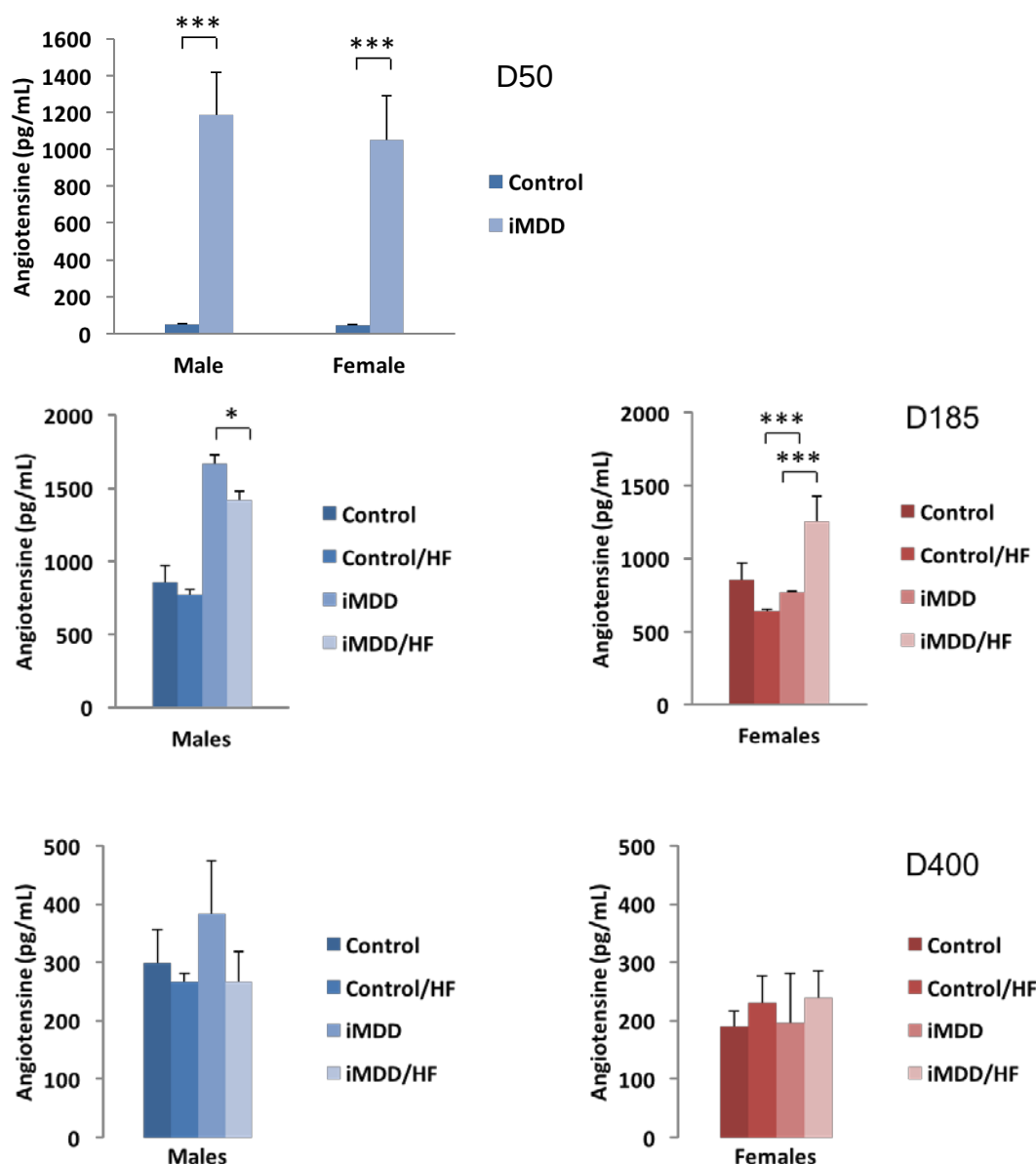


Figure 28. Dosages d'angiotensine plasmatique chez les rats à J50, J185 et J400.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

De même, le peptide natriurétique de type B (BNP), un marqueur de stress de la paroi ventriculaire, était élevé chez les rats femelles iMDD dès J50, et puis à J185, il restait élevé uniquement chez les rats femelles iMDD/HF. (Figure 29)

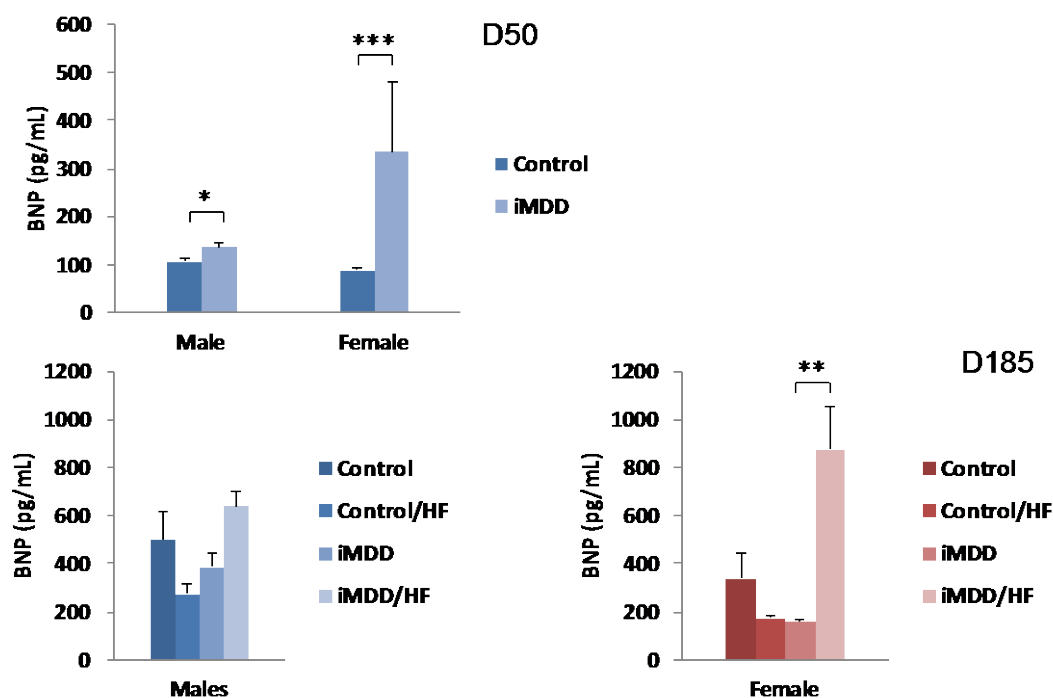


Figure 29. Dosages du peptide natriurétique de type B (BNP) chez les rats à J50 et J185.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

A J185, nous avons évalué la fraction d'éjection et la perfusion myocardique, aucune différence significative n'était notée.(Figure 30) Concernant la tension artérielle, le groupe de rats iMDD femelles et mâles avaient une tension artérielle élevée. Celle-ci était plus marquée chez les mâles, mais chez les femelles elle était significativement différente.(Figure 31)

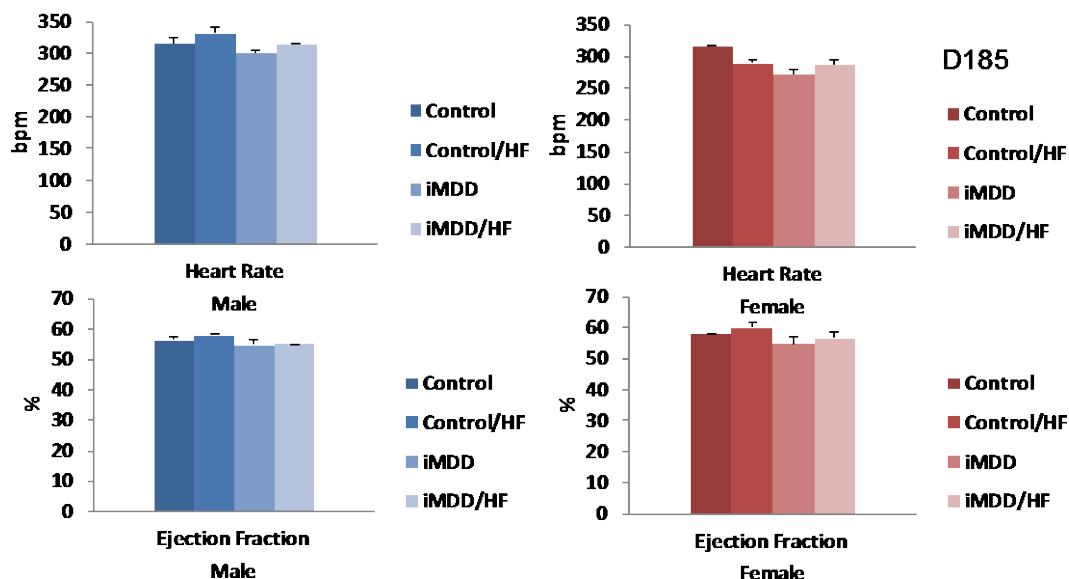


Figure 30. L'exploitation fonctionnelle myocardique chez les rats à J185.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=5$ dans chaque groupe (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

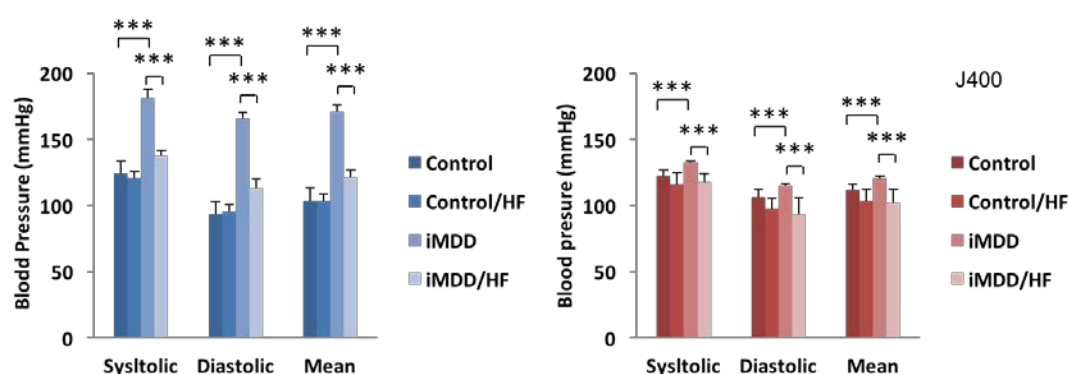


Figure 31. Mesure de la tension artérielle chez les rats de 365 jours.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=5$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

Les coupes histologiques du cœur à J50 montrent une structure normale et absence de fibrose. (Figure 32) A J185 les rats initialement carencés et ayant reçu un régime hyper-énergétique (iMDD/HF) ont développés une fibrose cardiaque.(Figure 33) Au cours du vieillissement à J400, on observe une fibrose dans tous les groupes chez les mâles et de manière intéressante, la fibrose était présente uniquement dans le groupe iMDD chez les femelles.(Figure 34) Le ratio du poids cardiaque/corporelle a démontré que les rats femelles iMDDs est plus élevé par rapport au iMDD/HF à J400. (Figure 35)

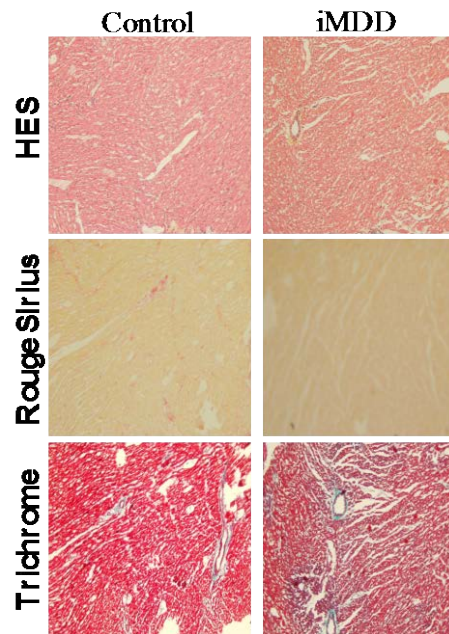


Figure 32. Les analyses anatomopathologique du cœur avec les colorations HES et Rouge Sirius et Trichrome Masson à J50.

(iMDD = initialement méthyl donneur déficient)

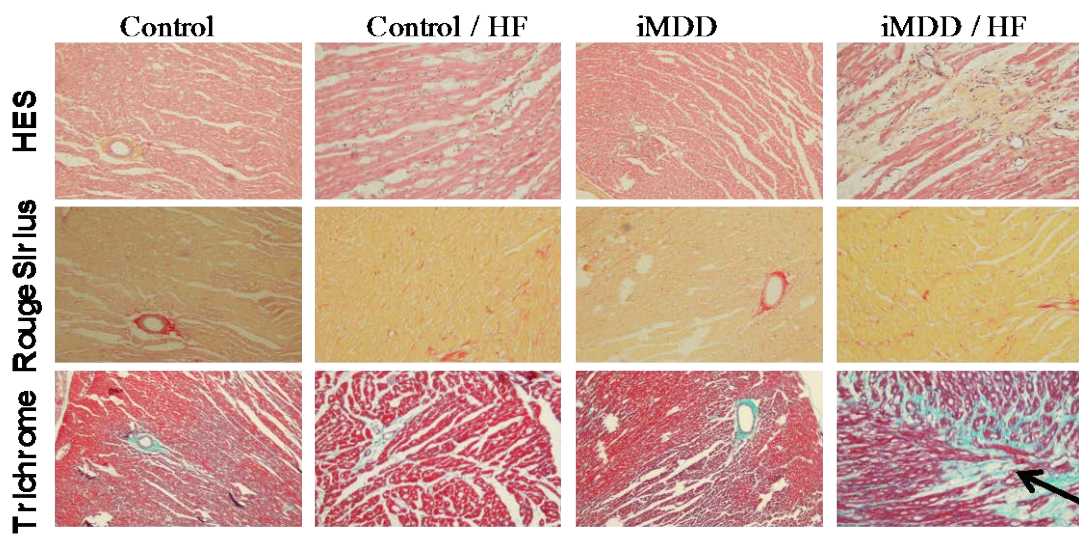


Figure 33. Les analyses anatomopathologique du cœur avec les colorations HES et Rouge Sirius et Trichrome Masson chez les rats à J185.

(Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD/HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique ; La flèche représente la fibrose.)

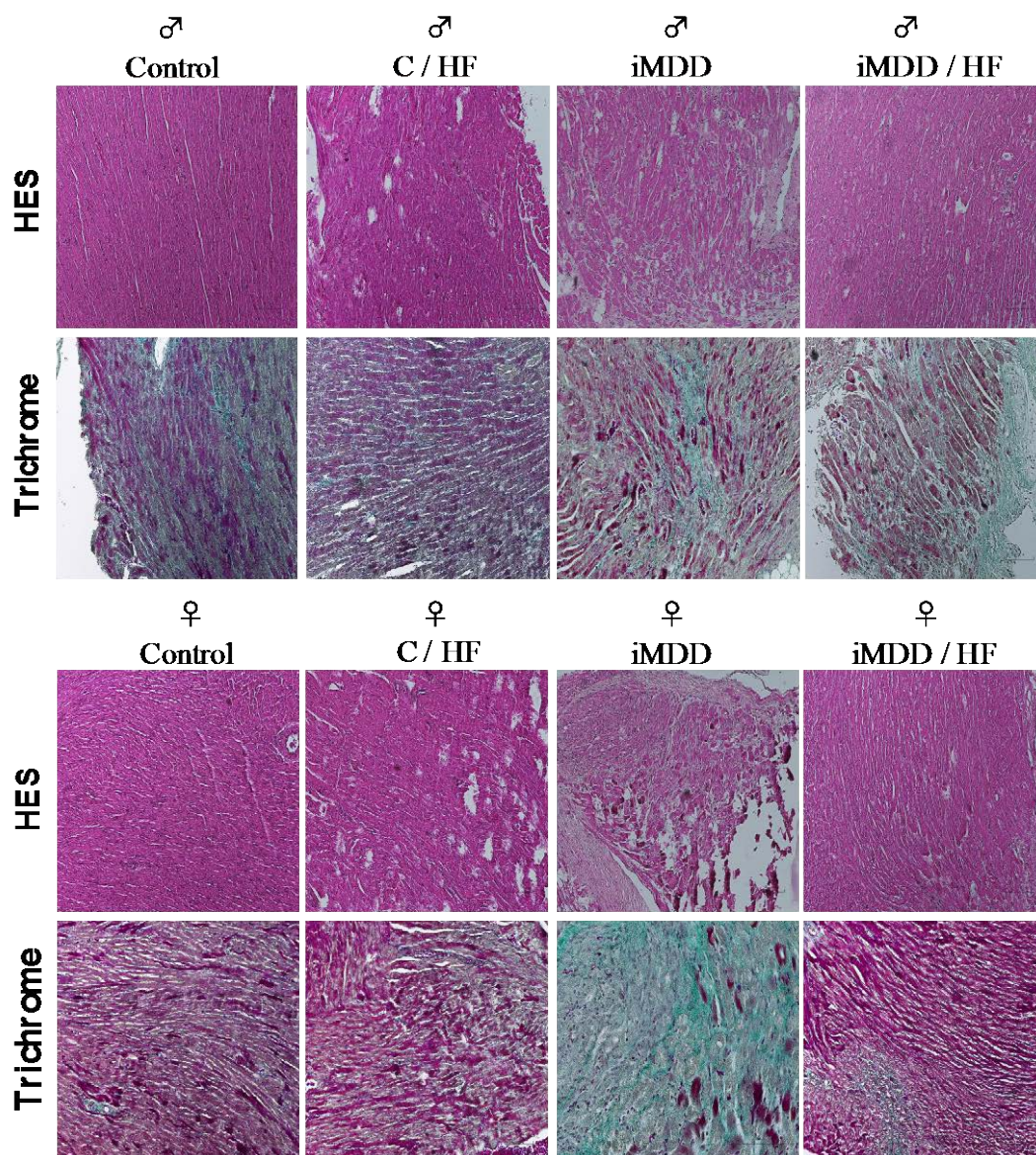


Figure 34. Les analyses anatomopathologique du cœur avec les colorations HES et Rouge Sirius et Trichrome Masson chez les rats à J400.

(Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD/HF = initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

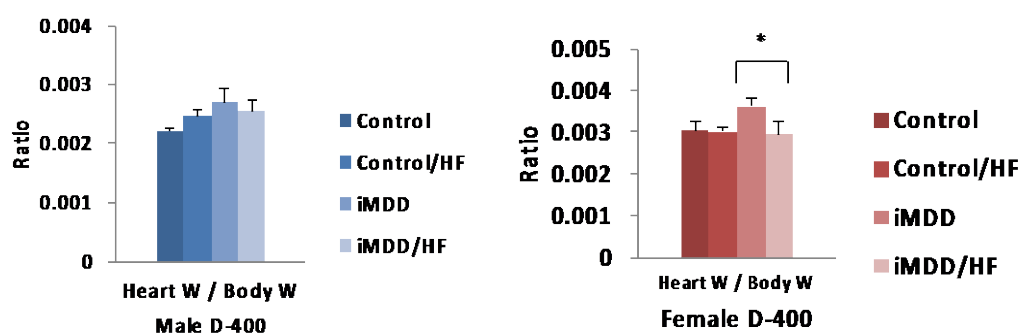


Figure 35. Le ratio du poids cardiaque/corporelle chez les rats à J400.

(Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD/HF = initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

Nous voulions savoir si les modifications observées en histologie avaient un retentissement métabolique sur le cœur, alors nous avons étudié l'expression du Glut4, avec l'objectif de connaître un éventuel shift du métabolisme lipidique vers un métabolisme glucidique. A J50 aucun changement d'expression n'a été observé. Par contre, à J185 nous observons une augmentation de l'expression dans le groupe initialement carencé et soumis à un régime hyper-énergétique (iMDD/HF). Et à J400 l'expression reste élevée dans les groupes iMDD et iMDD/HF, cependant elle est plus importante dans le groupe iMDD. (Figure 36)

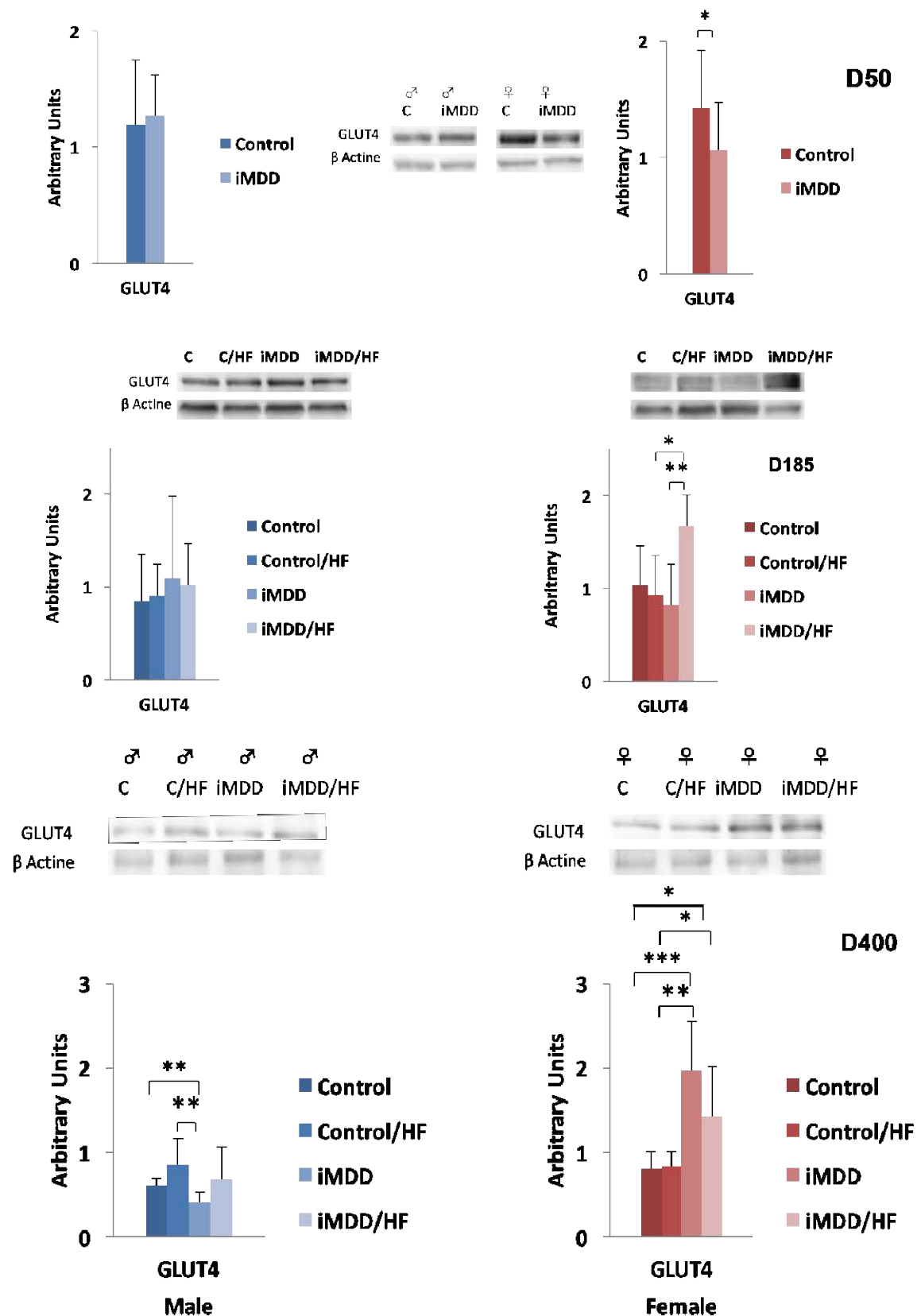


Figure 36. Expression du transporteur de glucose de type 4 (GLUT 4) dans le cœur des rats à J50, J185, et J400.

Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

4.1.3.2. Marqueurs de fibrose dans le cœur des rats iMDD et iMDD/HF.

A J50, on a constaté que l'expression des protéines matricielles considérées comme marqueurs de fibrose n'étaient pas modifiées. Par contre, à J185, l'expression de protéines matricielles, collagènes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$, MMP2 et α -SMA était significativement plus élevée chez les rats femelles contrôle/HF et iMDD/HF par rapport aux autres groupes. (Figure 37)

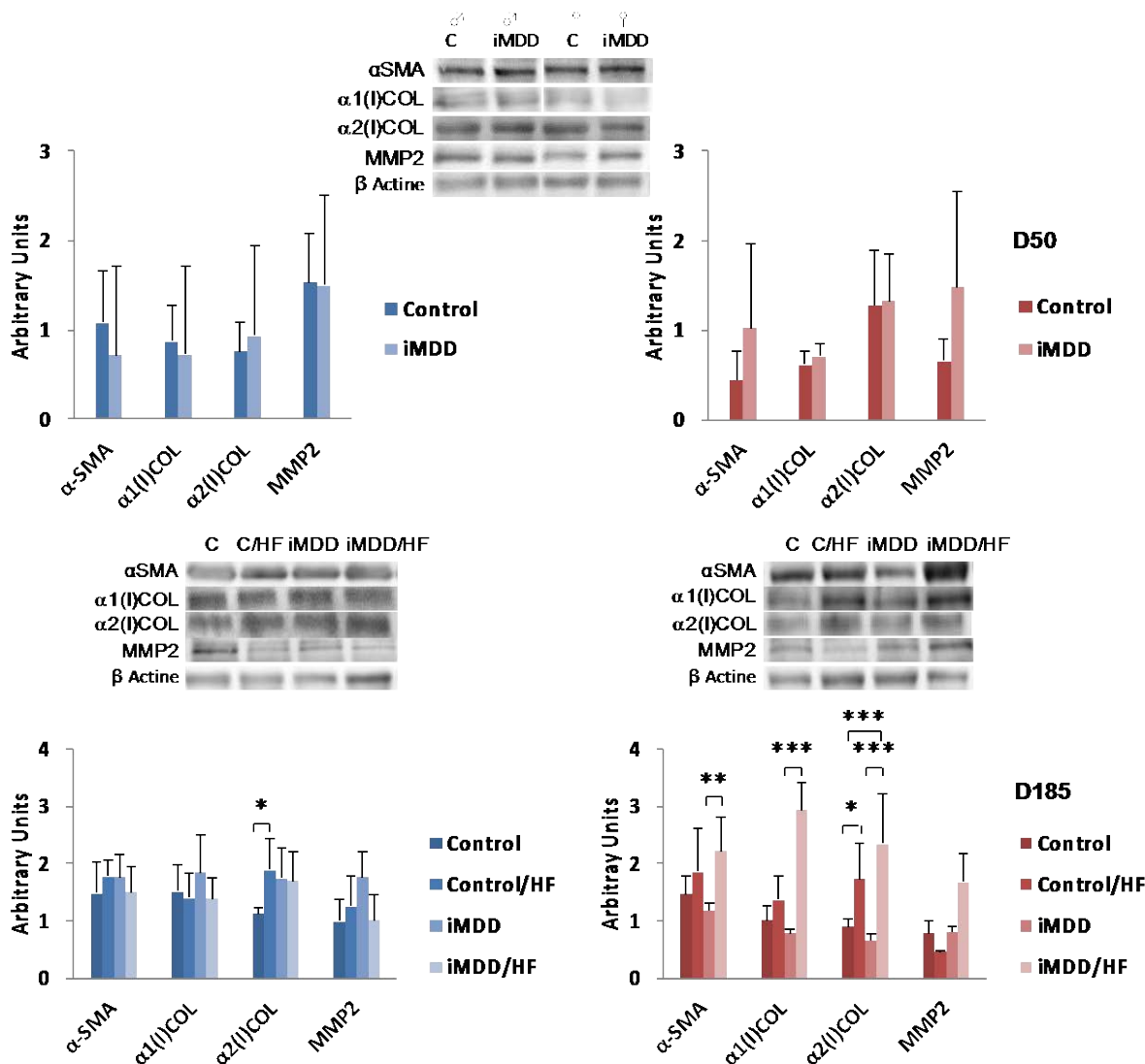


Figure 37. Expression des protéines matricielles α -SMA, Col 1A1, Col 1A2 et MMP2 dans le cœur du rat à J50 et J185.

(α -SMA : actine musculaire lisse type alpha, Col 1A1 : Le collagène de type I, alpha 1, Col 1A2 : Le collagène de type I, alpha 2, MMP2 : métalloprotéinase matricielle 2; Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec n=6 dans chaque groupe (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

4.1.3.3. L'activation de la fibrose était liée à l'inflammasome et à l'angiotensinogène

Afin d'expliquer les mécanismes déclenchant la fibrose nous avons exploré la voie TGF β 1 et l'angiotensine.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés au facteur de croissance TGF β , facteur profibrosant majeur, doté également de propriétés antiprolifératives et hypertrophiques. En accord avec les protéines de la fibrose, son expression était augmentée dans le groupe des rats iMDD/HF à J185. A J400 aucune différence n'était observée. Puisque la transition de la matrice est régulée par l'activation des enzymes NADPH oxydases de la famille Nox. Nous avons exploré l'expression de ces protéines, et avons observé une augmentation de l'expression de NOX4 chez les rats mâles et femelles iMDD comparés aux contrôles à J185. Au même âge, et chez les femelles iMDD/HF, l'expression de NOX4 était inférieure à celles des femelles iMDD. L'expression de la protéine NOX2 était augmentée uniquement chez les rats mâles iMDD comparée à celle des contrôles à J185. Au cours de vieillissement, à J400, chez les femelles, l'expression de NOX4 dans les groupes C/HF, iMDD et iMDD/HF était inférieure à celles du groupe contrôle. Aucun changement d'expression n'était observé chez les mâles à J400. (Figure 38)

L'expression de l'angiotensine et ses récepteurs connus pour jouer un rôle important dans le déclenchement d'une fibrose était altérée. On a observé une augmentation de l'expression de l'angiotensine dans le groupe iMDD/HF chez les mâles et les femelles à 185. (Figure 39) L'expression du récepteur de l'angiotensine de type 2 (AT2) était augmentée significativement chez les rats mâles à J185. A contrario, chez les femelles, on a observé une sous-expression significative d'AT2 dans le groupe iMDD/HF. (Figure 39)

Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de l'expression accrue de protéines de l'inflammation NF κ B et IL1 β dans le groupe initialement carencé et soumis à un régime hyper-énergétique (iMDD/HF), alors que, dans le groupe contrôle/HF les effets étaient modérés. (Figure 40)

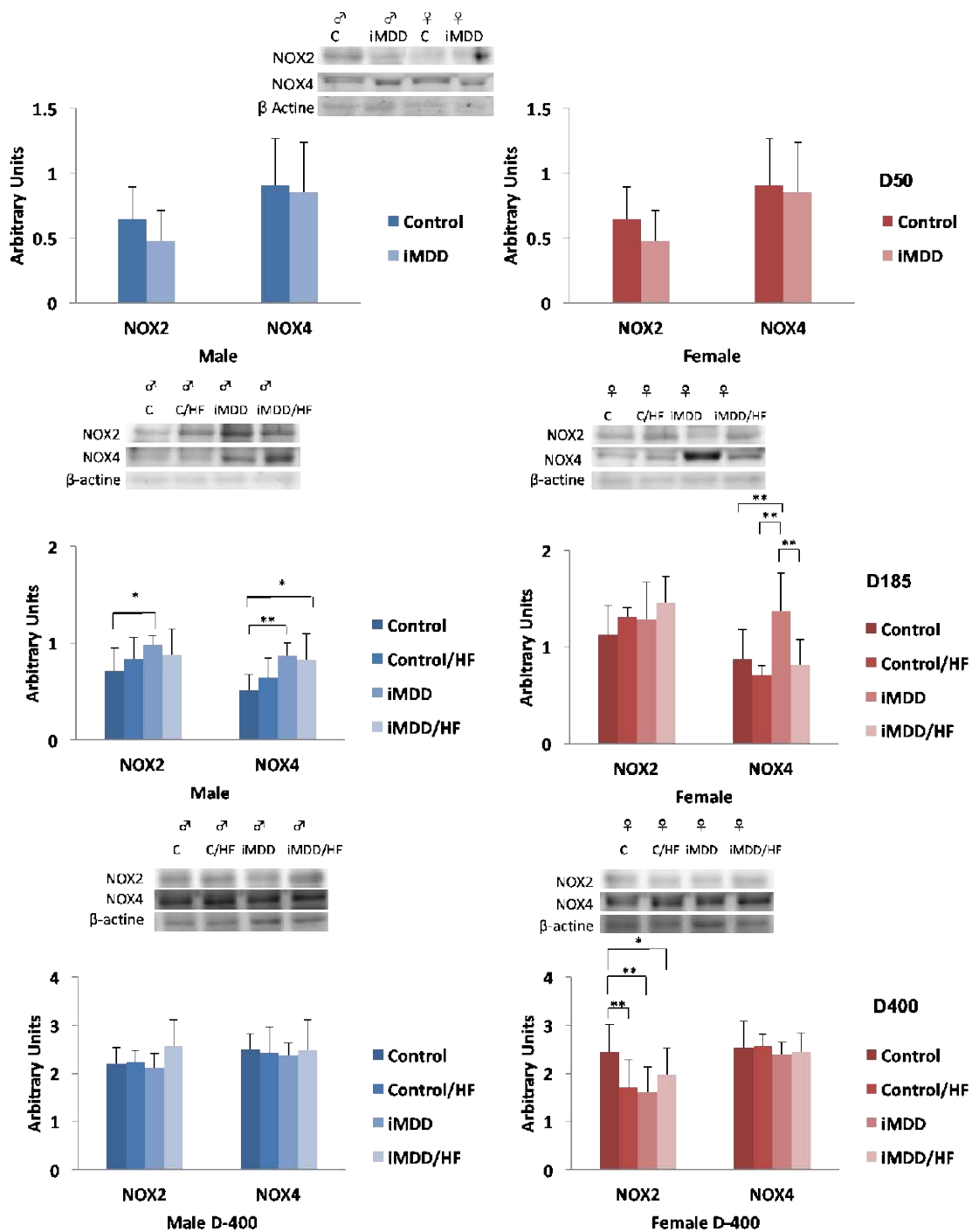


Figure 38. L'expression de NOX2 et NOX4 dans le cœur du rat à J50, J185, et J400.

(NOX2 et NOX4 : le Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate oxydase (NADPH) oxydase 2 et 4,) Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

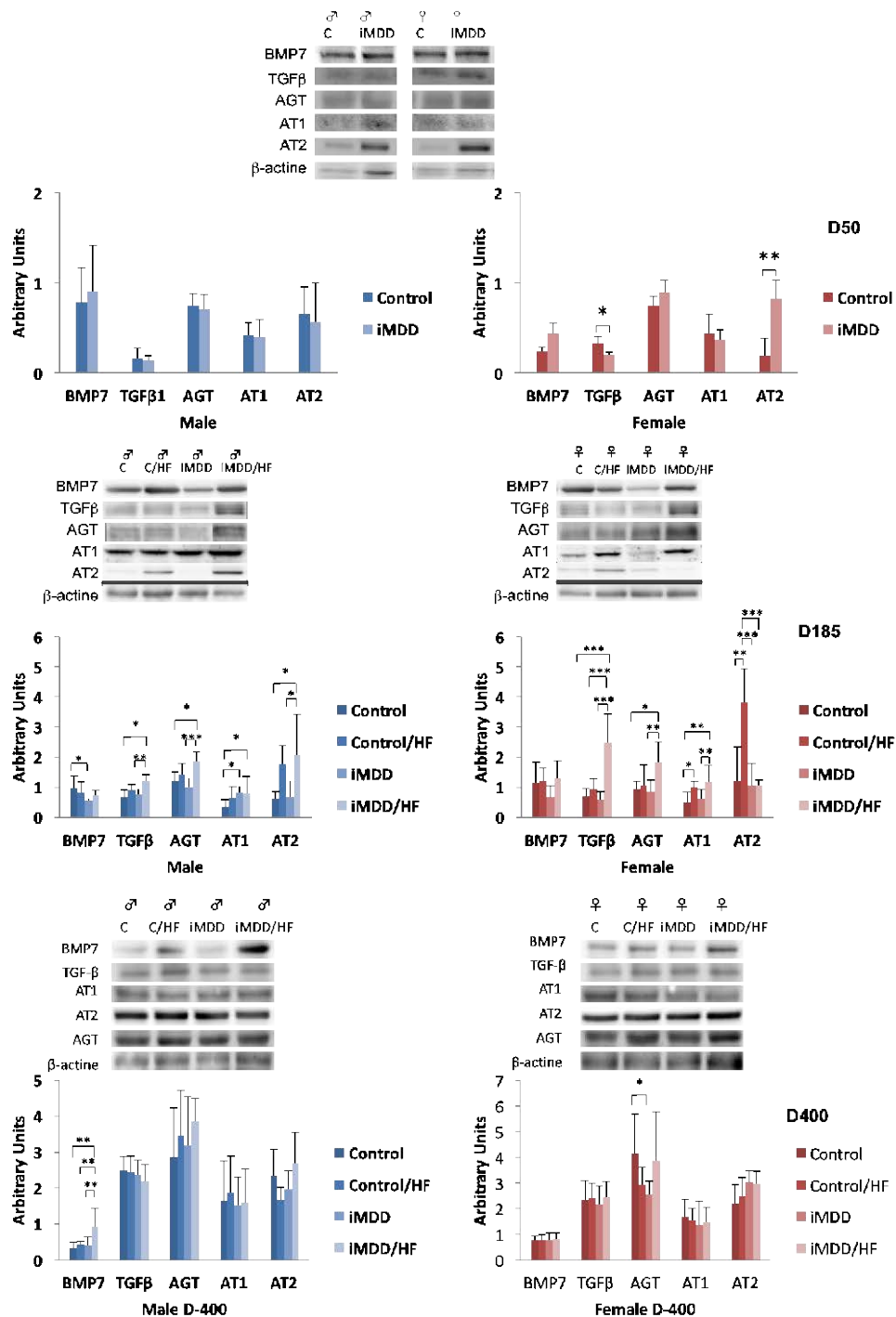


Figure 39. L'expression de BMP7, TGFβ1, l'angiotensinogène (AGT), récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT1) et de type 2 (AT2) dans le cœur du rat à J50, J185, et J400. (BMP7 : Protéine Morphogénétique osseuse (Bone)-7 ; TGFβ1 : Le Facteur Transformé de croissance (Growth)-bêta 1) Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

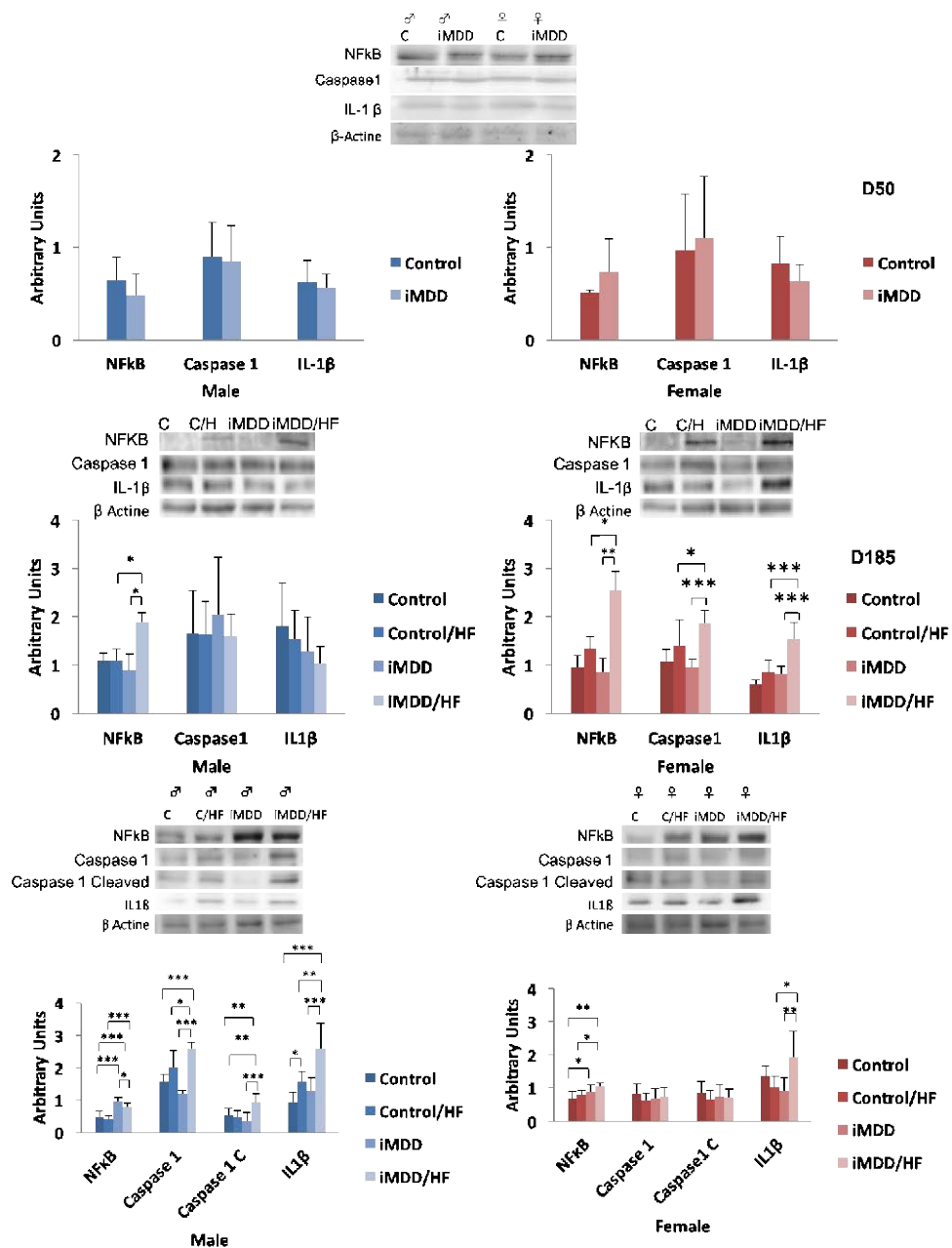


Figure 40. L'expression des protéines en lien à l'inflammasome dans le cœur des rats à J50, J185, et J400.

(NFkB : facteur nucléaire kappa-chaîne-légère-activateur des cellules B activées ; IL1β : Interleukine 1-bêta) Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

4.1.3.4. Les rats iMDD/HF présentaient une altération de l'expression des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique.

On a observé une diminution de l'expression des protéines PGC1- α et PPAR- α chez les rates iMDD à J50. L'exposition subséquente à l'alimentation HF produit une expression accrue de PGC1- α et PPAR- α chez ces rats femelles à J185 par rapport celles n'ayant pas reçues un régime HF. En plus les rats mâles montrent une augmentation similaire, ce qui suggère une régulation adaptative du métabolisme énergétique en réponse à un régime HF. Cependant, au cours du vieillissement à J400, l'expression de PGC1- α et PPAR- α est moins importante. (Figure 41)

L'expression de la sirtuine 1 déacétylase (SIRT1) était surexprimée chez les rats mâles C/HF et iMDD/HF versus C et iMDD, respectivement à J185. Par contre, chez les femelles nous avons observé l'inverse à J185. L'expression de cette protéine à J400 était similaire dans tous les groupes. (Figure 41)

Pour aller plus loin sur l'influence du sexe, nous avons observé que l'expression d'ERRa était augmentée chez les rats femelles iMDD/HF par rapport iMDD à J185. Et chez les rats mâles l'expression d'ERa était augmentée dans le groupe iMDD et contrôle/HF par rapport au groupe contrôle à J185. Par contre, chez les rats mâles à J400, une diminution de l'ERRa était observée dans la groupe iMDD/HF par rapport au groupe contrôle. (Figure 42)

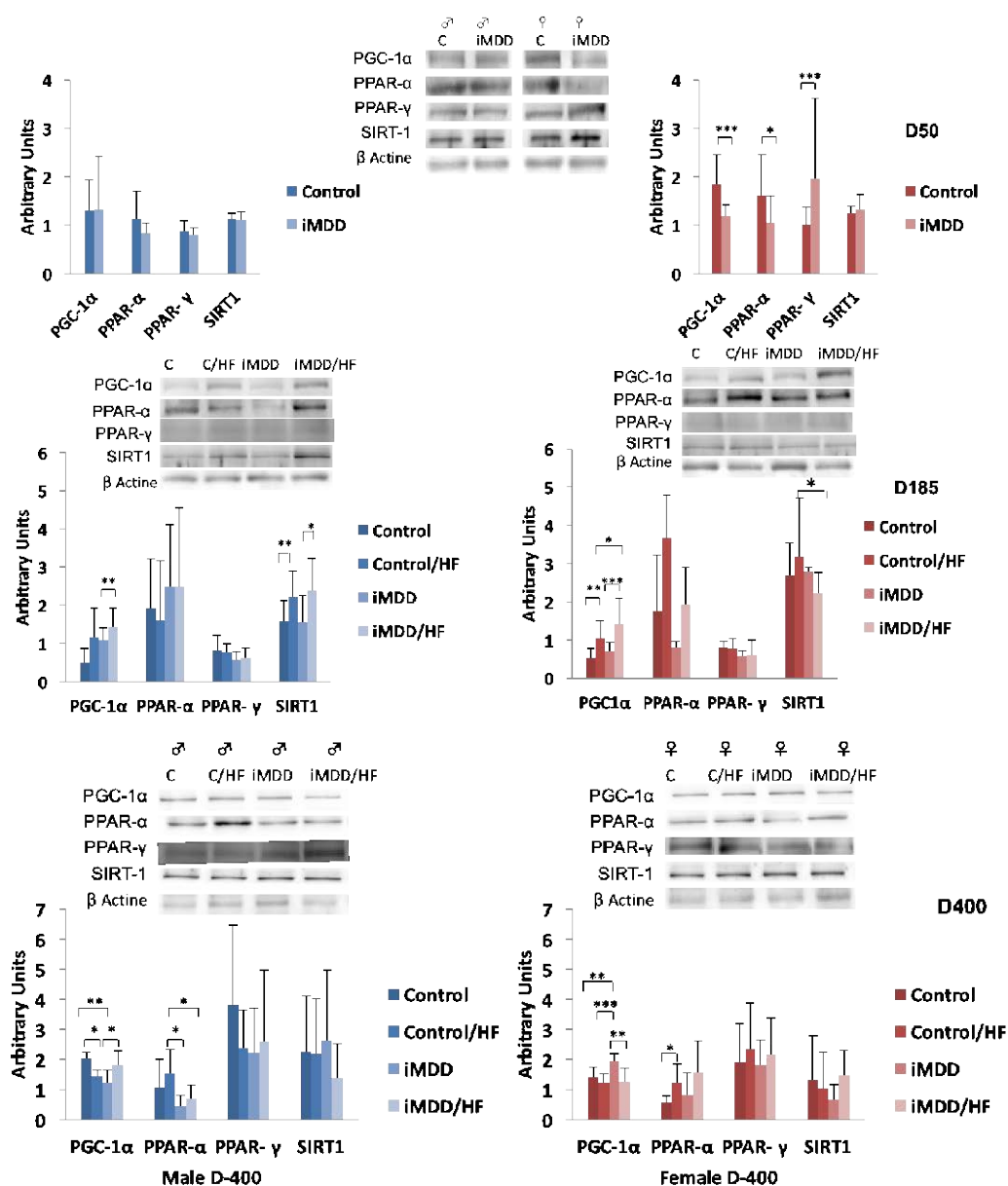


Figure 41. Expression de PGC1- α , PPAR α , PPAR γ , SIRT1 dans le cœur des rats au J50, J185, et J400.

(PPARs : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes ; PGC1- α : Coactivateur- α du PPAR gamme ; SIRT1 : la sirtuine 1 déacétylase.) Les données sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ écart-type, avec $n=6$ dans chaque groupe (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

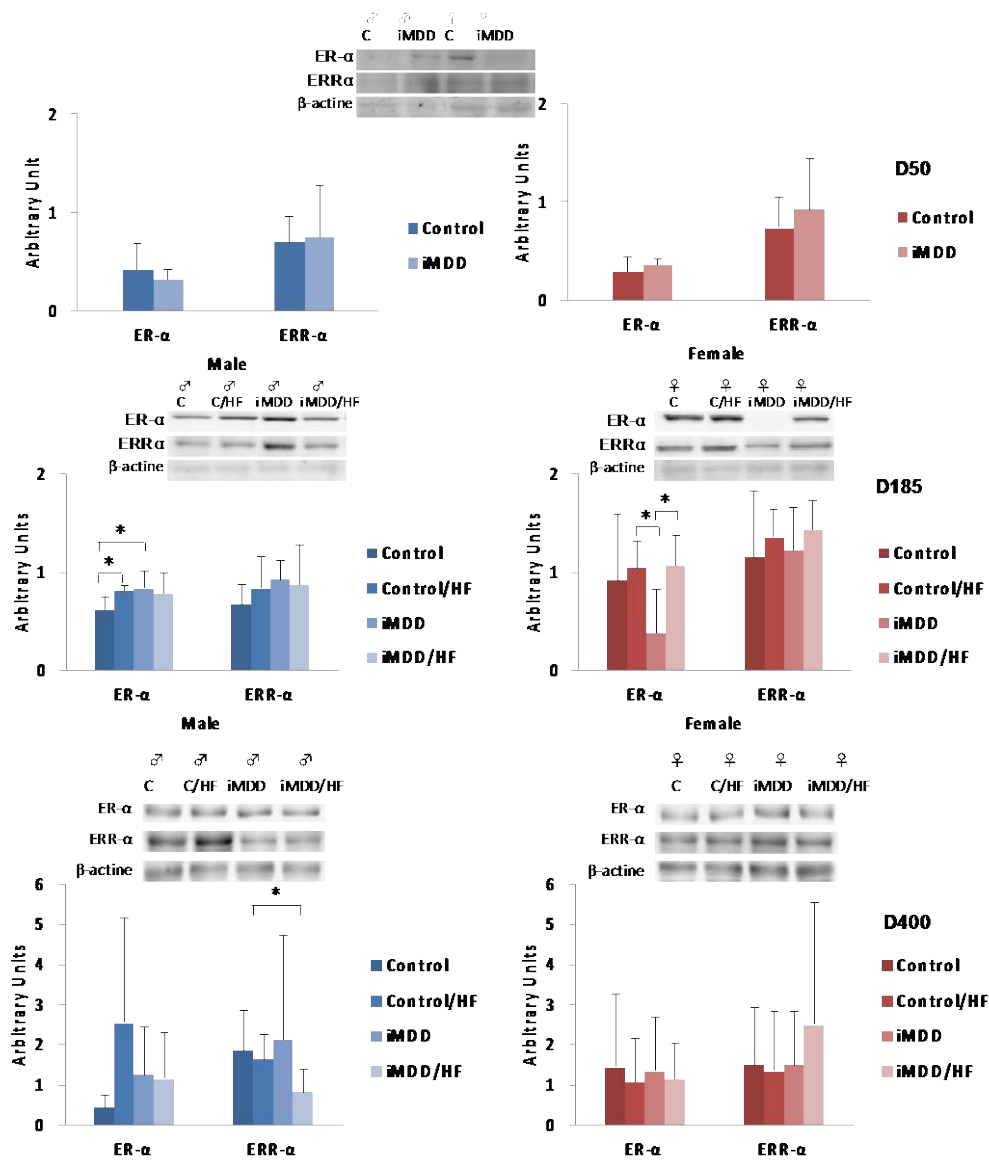


Figure 42. Expression d'ERα et ERRα dans le cœur des rats à J50, J185, et J400.

(ERα : Estrogène Récepteur α, ERRα : Estrogène Récepteur Relative α) Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type, avec n=6 dans chaque groupe (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). (Control/HF = contrôle + hyper-énergétique, iMDD = initialement méthyl donneur déficient, iMDD /HF =initialement méthyl donneur déficient + hyper-énergétique)

4.1.4. Discussion

Malgré un grand nombre d'études épidémiologiques et expérimentales sur la surnutrition dans la génération du syndrome métabolique, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires, peu d'attention a été accordée à l'effet de la carence en micronutriments et la *programmation fœtale* sur ces maladies. Des études épidémiologiques estiment que 15% des femmes enceintes ont une déficience en folate et/ou Cbl, ce qui peut conduire à des manifestations liées à la programmation fœtale. (Guéant, Namour, et al. 2013). A cela s'ajoute la surnutrition, problème fréquente chez l'adulte mais également chez les enfants et les adolescentes. Notre étude a donc été conçue pour évaluer les liens et les pathomécanismes entre la programmation fœtale et cardiomyopathie métabolique selon trois périodes, prénatal, avec une exposition à une carence en donneurs de méthyles, post-natal, avec la mise en place d'un régime hyper-énergétique et vieillissement.

Des études réalisées dans notre laboratoire, montrent les conséquences de la carence en donneurs de méthyles dès la gestation, puisque la taille et le poids des embryons est inférieur dans le groupe MDD (Kerek et al. 2013). Cette différence est la conséquence d'une restriction maternelle en donneurs de méthyles initiée un mois avant l'accouplement. Notre modèle provoque un petit poids, comme celui observé sur d'autres expériences de restriction énergétique utilisées pour produire des modèles de *programmation fœtale* chez les rats (Guéant, Namour, et al. 2013). Par ailleurs, nous avons montré dans nos études précédentes, qu'à J21 les rats carencés développaient une cardiomyopathie métabolique (Garcia et al. 2011) (Pooya et al. 2012). Dans la présente étude, le régime alimentaire normal entre J21 et J50 abolit la plupart des perturbations métaboliques existantes chez les rats iMDD à 21jours. Les anomalies majeures des animaux à J50 étaient la persistance d'un petit poids, et une proportion élevée de la graisse abdominale. (S. Blaise et al. 2007) Et puis, une augmentation de l'angiotensine chez les rats iMDD à J50. Si nos hypothèses sur effet de la carence sur la programmation fœtale étaient correctes, les animaux carencés pouvaient développer un syndrome métabolique. Toutefois, à J50 les rats n'ont pas développé une insulino-résistance. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons soumis les animaux à une alimentation hyper-énergétique (High-Fat) modéré, celle-ci avait une teneur en matières lipides limitée à 50% comparée à la plus part des régimes utilisés en expérimentation animale, dont la teneur en lipides dépasse le 50%. Plusieurs conséquences ont été observées après la mise en place de ce régime HF. Tout d'abord, à J185, nous avons observé une fibrose modérée dans le groupe iMDD/HF, celle-ci était en lien avec une augmentation de l'expression des composants macromoléculaires de la matrice extracellulaire, à savoir, les collagènes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$, et α -SMA. Cette fibrose s'accompagne d'une inflammation, avec une augmentation de l'expression de NFkB et IL-1 β . L'activation de NFkB peut être un évènement précoce du développement d'une possible hypertrophie liée à l'hypertension artérielle

systémique observée dans nos rats (Leychenko et al. 2011). Haugen et al., ont montré une activation des protéines de l'inflammation (IL6) chez les rats spontanément hypertendus avec une hypertrophie et dysfonction diastolique (Haugen et al. 2007). En parallèle, nous avons observé une augmentation spectaculaire de la concentration plasmatique du peptide natriurétique de type B, dès J50 chez les femelles et peu importante chez les mâles. Ceci, témoigne d'une part, un stress de la paroi ventriculaire et un signe précoce d'une insuffisance cardiaque très probablement diastolique car, nous n'avons pas observé de défaillance cardiaque systolique à l'évaluation par miniPET à J185 (Clerico et al. 2016). D'autre part, le BNP induit la production de métalloprotéinases MMP1, MMP2, MMP3, MMP14 et TIMP2 (Tsuruda et al. 2002), dans notre travail l'expression de MMP2 était augmentée chez les femelles dans le groupe iMDD à J50 et dans le groupe iMDD/HF à J185, mais la différence d'expression comparée aux autres groupes n'était pas significative.

Au cours du vieillissement et à un an de vie, nous avons mesurée la tension artérielle, de manière intéressante les rats mâles dans le groupe iMDD non soumis à un régime HF, avaient une hypertension artérielle importante aussi bien systolique que diastolique. Cette anomalie était observée de manière moins importante chez les femelles du même groupe. Ceci témoigne d'un effet de *programmation fœtale* du exclusivement à une carence en donneurs de méthyles. Des études réalisées chez l'homme et chez l'animal ont montré qu'une supplémentation durant la grossesse en vitamine B12 et folates réduit le risque de pré-éclampsie (Browne et al. 2016)(Kemse, Kale, and Joshi 2016). A J400, chez les mâles, nous avons observé une fibrose dans les quatre groupes. La fibrose observée chez les mâles peut être liée au processus du vieillissement. En effet, le vieillissement retentit sur les tissus en combinant les lésions suivantes: diminution du renouvellement cellulaire et atrophie cellulaire, aboutissant à l'atrophie de nombreux tissus et organes et à la fibrose. Des études ont montré qu'au cours du vieillissement chez les mâles, il existe une réduction du nombre de cardiomyocytes cardiaques, compensée par une hypertrophie des myocytes résiduels et associée à une fibrose (Keller and Howlett 2016)(Horn and Trafford 2016)(Lindsey et al. 2005). Par contre, chez les femelles nous avons observé une fibrose majeure dans le groupe iMDD, accompagnée d'une augmentation du ratio poids du cœur/poids corporel. Ceci nous laisse supposer un effet programmation fœtal sur le vieillissement précoce chez les femelles. De plus, les cellules sénescents contiennent d'une part, de niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme IL1, IL6, et TGFβ par activation des voies JAK/STAT, TGFβ/SMAD et IL1/NFκB, et d'autre part, IL1 et TGFβ induisent l'expression des NAPDH oxydases, et plus spécifiquement Nox4. De ce fait, une augmentation de Nox 4 est indicative d'une sénescence cellulaire avec un changement de phénotype contractile vers un phénotype sécrétoire (Hubackova et al. 2012). En accord avec les données de la

littérature, nous avons constaté une augmentation de l'expression de NOX 4 chez les femelles iMDD à J185, puis à J400 nous avons observé une fibrose uniquement dans ce groupe, cela laisse penser qu'un changement de phénotype commençait à s'installer dès J185 pour aboutir à un vieillissement prématuré chez les femelles iMDD.

A côté des effets du vieillissement et de l'inflammation, les membres de la superfamille, TGF β jouent aussi un rôle majeur dans développement de la fibrose cardiaque. Cette relation a été bien établie depuis longue date par des études réalisées chez l'homme et chez l'animal. En effet, sur des biopsies cardiaques des patients atteints d'une cardiomyopathie hypertrophique, l'expression de TGF β était augmentée (R. K. Li et al. 1997). Dans notre modèle, nous avons observé une augmentation de l'expression de TGF β à J185 dans le groupe iMDD/HF. Chez l'animal, une alimentation riche en méthionine provoque une hyperhomocystéinémie systémique et une hypertrophie cardiaque par activation du TGF β (Raaf et al. 2011). L'augmentation du TGF β dans notre modèle est en parallèle à celle d'ATG à J185 aussi bien chez les mâles que les femelles. De nombreuses études ont montré que l'angiotensine, joue un rôle majeur dans le remodelage cardiaque, est un déterminant majeur des manifestations cardiovasculaires et est utilisée comme cible thérapeutique (Thürmann et al. 1998)(Shimoura et al. 2016). Le résultat intéressant dans notre étude est l'augmentation de l'expression uniquement chez les animaux iMDD/HF, c'est à dire un effet de *programmation fœtale*. En effet, chez le raton à 21 jours, nous avons montré qu'il existe une altération de l'expression et de la méthylation au niveau hépatique de gènes impliqués dans le système renine-angiotensine (G. Chen et al. 2015a). Des autres exemples de programmation fœtale existent dans la littérature, par exemple, chez l'animal, une carence protéique induit une hypertension (Goyal, Hypert Res 2013), et chez l'homme, il a été montré que, les enfants nés de mères avec une pré-éclampsie ont de niveaux circulantes élevés d'aldostérone et/ou une augmentation de la tension artérielle systolique (Martinez-Aguayo et al. 2012)(Franco et al. 2008) D'autre part, l'angiotensine II régule l'expression du TGF β , via l'activation du récepteur de l'angiotensine de type I (AT1) dans les myocytes et les fibroblastes, et l'induction de TGF β est primordiale pour le développement de l'hypertrophie. En plus, le TGF β détermine la conversion de fibroblastes en myofibroblastes et participe au développement de la fibrose en activant le dépôt de protéines de la matrice extra-cellulaire comme le collagène, la fibronectine, les protéoglycanes, et par conséquent, le développement ultérieur d'une hypertrophie ventriculaire. De manière surprenante, à J400, nous n'avons plus observé de différence d'expression du TGF β chez les animaux. Il est possible que des autres mécanismes ont rentré en jeu entre J185 et J400, afin de contrebalancer l'hypertrophie comme TAK1 que nous n'avons pas exploré (L. Li et al. 2015).

Enfin, les changements dramatiques métaboliques produits par la déficience en donneurs de méthyles sur le cœur à J21, comme l'altération de la balance méthylation/acétylation de PGC-1 α y diminution de l'expression de PPAR α et ERR α (Garcia et al. 2011)(Pooya et al. 2012) sont discrètement observés à J50 (PGC-1 α et PPAR α). Puis à J185, il y a une augmentation significative de l'expression de PGC-1 α . Par contre, contrairement aux effets délétères de régimes hyper-lipidiques dans la littérature, nous n'avons pas observé de diminution de l'expression de PPAR α , car très probablement, notre régime est modérément hyper-lipidique (Zhang et al. 2016)(Y. Zhou et al. 2016).

Et enfin, nous avons observé une augmentation de GLUT4, cette augmentation témoigne d'un shift du métabolisme énergétique lipidique distinctif du cœur vers un métabolisme glucidique laissant supposer une défaillance cardiaque chez les femelles à J400 (Ware et al. 2011).

4.2. Etude n°4 : La programmation fœtale par une carence en donneurs de méthyles produit une stéatohépatite chez des rats exposés à un régime alimentaire riche en lipides

Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet.

Anaïs Bison, Aude Bressenot, **Zhen Li**, Illef Elamouri, Eva Feigerlova, Lu Peng, Remi Houlgatte, Bernard Beck, Gregory Pourié, Jean-Marc Alberto, Remy Umoret, Guillaume Conroy, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez

Sci Rep. 2016 Nov 17;6:37207. (Bison et al. 2016)

Tous les détails des résultats de ce travail sont dans l'annexe 4.

4.2.1. Résumé

La stéatohépatite non alcoolique (NASH) est une manifestation du syndrome métabolique, et un problème majeur de santé publique. La carence en donneurs de méthyles (acide folique et la vitamine B12) pendant la gestation et la lactation est fréquente chez la femme et produit des effets de manifestations du syndrome métabolique liées à la programmation fœtale, un petit poids de naissance et une stéatose hépatique au 21^{ème} jour. Nous avons étudié les effets de la programmation fœtale sur le foie des rats nés de mères déficientes (iMDD) et soumis à un régime alimentaire normal entre J21 et J50. A l'âge adulte (J50), ils ont reçu un régime hyper-énergétique (HF). A J50, nous avons observé une augmentation de la graisse abdominale, du rapport ASAT / ALAT et de l'angiotensine circulante, mais aucune anomalie hépatique histologique était observée. En revanche, les animaux iMDD/HF à J185 avaient une stéatose hépatique majeure en conjonction avec une augmentation des marqueurs de l'inflammation et de la fibrose (Caspase1, l'IL-1 β clivés, les collagènes α 1 (I) et α 2 (I), et α -SMA), une résistance à l'insuline (HOMA-IR et Glut 2) et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la stimulation des cellules étoilées et du remodelage (facteur transformant de croissance bêta superfamille, l'angiotensine et de l'angiotensine récepteur de type 1). Nos données montrent un effet de programmation fœtale du régime déficient en donneurs de méthyles sur l'inflammation et la fibrose hépatique.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVE GÉNÉRALE

L'objectif général de notre projet était d'identifier les modifications nutriginomiques en lien avec les dérégulations du métabolisme énergétique dans une étude de population et dans un modèle animal de carence en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement, soumis à la vie adulte à un régime hyper-énergétique. Il s'inscrit dans le projet de l'unité U954 portant sur le rôle de donneurs de méthyles, de l'épigénomique et le développement des maladies complexes. En 2007, notre unité était la première à montrer les conséquences d'une déficience en donneurs de méthyles (MDD) sur la programmation fœtale (S. Blaise et al. 2007). Plusieurs études épidémiologiques menées en Inde, au Népal et en Europe montrent un effet de type fœtal programming du déficit en donneurs de méthyles, et plus particulièrement en vitamine B12 sur l'obésité, l'insulinorésistance et les complications viscérales du syndrome métabolique (Rinaudo and Wang 2012)(C S Yajnik et al. 2008)(Christine P Stewart et al. 2011) La surnutrition dès l'enfance et l'adolescence est également un facteur causal de la forte augmentation du syndrome métabolique et du diabète de type 2, depuis deux décennies. Nous avons ciblé notre intérêt sur deux organes, le cœur et le foie, qui sont deux cibles importantes de la stéatose dans le syndrome métabolique, pour lesquels la recherche de mécanismes communs de dérégulation fait l'objet de très nombreux travaux dans la littérature. La carence maternelle en donneurs de méthyles produit chez le raton de 21 jours une stéatose hépatique et cardiaque par un déficit de la synthèse de carnitine et des dérégulations épigénomiques avec une hypométhylation et une diminution de l'expression des récepteurs nucléaires, PPAR- α , ERR- α , ER- α et HNF-4 α , ce dernier spécifique du foie (Garcia et al. 2011)(Pooya et al. 2012). Le mécanisme causal est une modification épigénomique, d'hypométhylation de PGC1- α et par conséquent, un défaut de la bêta-oxydation des acides gras. L'ensemble des données expérimentales et cliniques mentionnées précédemment suggèrent qu'une déficience en donneurs de méthyles conduit à des variations de l'épigénome et à l'apparition des maladies comme l'obésité, le syndrome métabolique et ses complications.

Dans la première partie de la thèse, nous avons réalisé une étude de population basée sur la cohorte OBESEPI (clinicaltrials.gov NCT02663388). Il s'agit de patients obèses recrutés avant la chirurgie bariatrique sur une période de 2 ans. 278 patients obèses ont été recrutés.

Cette étude transversale a montré premièrement, que les folates érythrocytaires sont corrélés de manière positive avec l'index HOMA-IR, et restent en analyse multivarié un facteur indépendant du HOMA-IR chez les patients avec une obésité morbide. Deuxièmement, chez les patients ayant une concentration en folates érythrocytaires élevée associée à une concentration basse en vitamine B12 avaient une fréquence plus élevée du diabète et/ou une insulino-résistance. Et

troisièmement, les concentrations en acide méthyl-malonique sont plus élevées chez les patients ayant une concentration basse en vitamine B12 associée soit à des folates bas, soit à des folates élevés. Et enfin, cette étude a montré que les folates plasmatiques ou érythrocytaires sont un facteur indépendant de l'incidence du diabète et du nombre de composants du syndrome métabolique.

Dans la deuxième partie, nous avons évalué le lien entre les Acylcarnitines, marqueurs périphériques de la bêta oxydation des acides gras, et la présence ou l'absence du Syndrome Métabolique chez les patients obèses. Nous avons montré que les patients obèses avec un Syndrome Métabolique avaient une concentration plus élevée des Acylcarnitines de chaîne courte. Cette élévation peut s'expliquer en partie par une élévation accrue des acides gras chez les patients obèses, mais également par une accumulation des acides aminés branchés due à un problème de dysbiose fréquemment observé chez le sujet obèse (Harakeh et al. 2016).

Chez l'animal, nous avons montré l'influence de donneurs de méthyles de la « programmation foetale » sur le cœur à long terme, chez le raton né d'une mère carencée et soumis à un régime hyper-énergétique à la vie adulte. Ce travail de thèse a été réalisé dans la continuité de travaux précédents effectués au sein notre laboratoire sur le cœur dans ce modèle. Nous avons étudié dans un premier temps les effets du sevrage de la carence chez le rat au début de la vie adulte (J50), puis les effets du régime hyper-énergétique (HF) après 135 jours d'exposition (J185) en comparant quatre groupes : contrôle, contrôle/HF, initialement carencé en donneurs de méthyl (iMDD) et initialement carencé en donneurs de méthyl/HF; et dans un deuxième temps, les effets sur le vieillissement à 400 jours toujours dans les 4 groupes. A J50, nous avons observé une augmentation de la masse adipocytaire abdominale et une élévation de l'angiotensine et du peptide natriurétique de type B circulants. Cependant, au niveau cardiaque, aucune anomalie n'était constatée. Nous avons réalisé un phénotypage cardiaque à J185. Aucune anomalie n'a été constatée sur la fonction cardiaque, la fraction d'éjection était normale. Alors que, à l'histologie, une fibrose cardiaque dans le groupe iMDD soumis à un régime hyper-énergétique a été observée. De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'angiotensine et du TGFB connus pour être des facteurs pro-fibrotiques. Ces observations ont été confirmées par l'augmentation de l'expression de protéines de l'inflammation NFkB et IL-1 β , et de la fibrose, à savoir, les collagènes α 1(I) et α 2(I), et α -SMA dans le groupe initialement carencé et soumis à un régime hyper-énergétique (iMDD/HF), alors que, dans le groupe contrôle/HF les effets étaient modérés. Au cours du vieillissement, la tension artérielle des rats a été mesurée et une hypertension artérielle systémique dans le groupe iMDD non soumis à un régime hyper-énergétique a été constatée, A J400, les rats ont été mis à mort. Au niveau histologique, nous avons observé une fibrose très marquée chez les femelles dans le groupe de rats

hypertendus (iMDD), alors que chez les mâles la fibrose était modérée et présente dans tous les groupes. A noter qu'aucune modification de l'expression des protéines de l'inflammation ou de la fibrose n'a été observée. Par contre, une augmentation du GLUT4 sur le groupe de femelles hypertendues (iMDD) a été constatée, témoignant un shift du métabolisme lipidique vers le glucidique. Ceci laisse supposer l'existence d'une défaillance cardiaque. Pendant les dernières années, des études réalisées aussi bien chez l'animal et l'homme, montrent que le cœur subit des modifications structurelles et fonctionnelles précises au fil des années. Ces modifications surviennent même en l'absence de MCV avérée et sont souvent la conséquence d'une problématique adaptative liée à l'âge. De même, l'augmentation liée à l'âge de la fibrose et de l'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche peut favoriser l'apparition d'une dysfonction diastolique qui évoluera vers une insuffisance cardiaque sans altération de la fraction d'éjection ventriculaire gauche. Comme nous l'avons observé dans notre modèle, des données montrent que le remodelage cardiaque s'effectue différemment en fonction du sexe (Olivetti et al. 1995). Par exemple, on sait désormais que le mécanisme d'apoptose entraîne une diminution du nombre de myocytes ventriculaires chez l'homme, mais pas chez la femme (M. Wang et al. 2008). Ce travail a fait l'objet d'une communication affichée dans le congrès Européen de Cardiologie 2016, récompensée par le prix du meilleur poster dans le domaine de l'hypertension. Un article est en cours de rédaction.

Au total, ces observations ouvrent de nouvelles perspectives et nous incitent à chercher dans la cohorte des obèses les mécanismes sous-jacents. Nous sommes en train d'analyser le génome et le méthylome, mais aussi nous réalisons l'étude du transcriptome sur le foie des patients, afin de réaliser à la fin une étude intégrative qui nous permettra d'élucider les mécanismes impliqués dans nos observations et de trouver des bio-marqueurs qui permettront de prédire les complications liées au Syndrome Métabolique et de les prévenir.

Chez l'animal, nous poursuivons nos travaux sur le même modèle exposé à des toxines LPS, produits bactériens ayant un rôle sur les caractéristiques du microbiote. Et ainsi, nous étudierons les différences du microbiote et leurs conséquences sur le foie et le cœur. Il pourrait également être intéressant d'effectuer une analyse de la méthylation du génome des rats dans notre modèle. En effet, les gènes impliqués dans le métabolisme des glucides et des lipides, le développement de la fibrose et le remodelage des tissus sont connus pour être régulés par méthylation de l'ADN (Tryndyak et al. 2011).

6. BIBLIOGRAPHIE

- Adameova, Adriana, and Naranjan S Dhalla. 2014. "Role of Microangiopathy in Diabetic Cardiomyopathy." *Heart Failure Reviews* 19 (1): 25–33. doi:10.1007/s10741-013-9378-7.
- Adams, Leon A, James F Lymp, Jenny St Sauver, Schuyler O Sanderson, Keith D Lindor, Ariel Feldstein, and Paul Angulo. 2005. "The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study." *Gastroenterology* 129 (1): 113–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16012941>.
- Adeghate, Ernest, and Jaipaul Singh. 2014. "Structural Changes in the Myocardium during Diabetes-Induced Cardiomyopathy." *Heart Failure Reviews* 19 (1): 15–23. doi:10.1007/s10741-013-9388-5.
- Agopian, Vatche G, Fady M Kaldas, Johnny C Hong, Meredith Whittaker, Curtis Holt, Abbas Rana, Ali Zarrinpar, et al. 2012. "Liver Transplantation for Nonalcoholic Steatohepatitis: The New Epidemic." *Annals of Surgery* 256 (4): 624–33. doi:10.1097/SLA.0b013e31826b4b7e.
- Aguer, Céline, Colin S McCain, Trina A Knotts, A Brianne Thrush, Kikumi Ono-Moore, Ruth McPherson, Robert Dent, Daniel H Hwang, Sean H Adams, and Mary-Ellen Harper. 2015. "Acylcarnitines: Potential Implications for Skeletal Muscle Insulin Resistance." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (1): 336–45. doi:10.1096/fj.14-255901.
- Ahmed MH, Byrne CD. 2011. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." In: *Byrne CD, Wild SH, Editors. The Metabolic Syndrome. 2nd Edition. Oxford (United Kingdom): Wiley- Blackwell; 2011. P. 245–77.*
- Aimone-Gastin, I, J L Gueant, F Plenat, F Muhale, F Maury, M Djalali, P Gerard, and A Duprez. 1999. "Assimilation of [57Co]-Labeled Cobalamin in Human Fetal Gastrointestinal Xenografts into Nude Mice." *Pediatric Research* 45 (6): 860–66. doi:10.1203/00006450-199906000-00014.
- Akar, N, E Akar, R Akçay, F Avcu, A Yalcin, and S Cin. 2000. "Effect of Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C-T, 1298 A-C, and 1317 T-C on Factor V 1691 Mutation in Turkish Deep Vein Thrombosis Patients." *Thrombosis Research* 97 (3): 163–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10680647>.
- Alberti, K G, R H Eckel, S M Grundy, P Z Zimmet, J I Cleeman, K A Donato, J C Fruchart, W P James, C M Loria, and S C Smith Jr. 2009. "Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International ." *Circulation* 120 (16): 1640–45. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
- Alexander, C. M., P. B. Landsman, S. M. Teutsch, and S. M. Haffner. 2003. "NCEP-Defined Metabolic Syndrome, Diabetes, and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older." *Diabetes* 52 (5): 1210–14. doi:10.2337/diabetes.52.5.1210.
- Allen, Robert H., Bellur Seetharam, Elaine Podell, and David H. Alpers. 1978. "Effect of Proteolytic Enzymes on the Binding of Cobalamin to R Protein and Intrinsic Factor." *Journal of Clinical Investigation* 61 (1): 47–54. doi:10.1172/JCI108924.
- Amarin, Zouhair O, and Ahmed Z Obeidat. 2010. "Effect of Folic Acid Fortification on the Incidence of Neural Tube Defects." *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 24 (4): 349–51. doi:10.1111/j.1365-3016.2010.01123.x.
- Andersson, A, L Brattström, B Israelsson, A Isaksson, A Hamfelt, and B Hultberg. 1992. "Plasma Homocysteine before and after Methionine Loading with Regard to Age, Gender, and Menopausal Status." *European Journal of Clinical Investigation* 22 (2): 79–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1572391>.
- Andreassi, Maria Grazia. 2009. "Metabolic Syndrome, Diabetes and Atherosclerosis: Influence of Gene-Environment Interaction." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 667 (1–2): 35–43. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.10.018.
- Andrès, Emmanuel, Nouredine Henoun Loukili, Esther Noel, Georges Kaltenbach, Maher Ben Abdelgheni, Anne Elisabeth, Marie Noblet-dick, and Frédéric Maloisel. 2005. "Review Synthèse Vitamin B 12 (Cobalamin) Deficiency in Elderly Patients Defining Cobalamin Deficiency" 12 (3): 1–15. doi:10.1503/cmaj.1031155.
- Argo, Curtis K, Patrick G Northup, Abdullah M S Al-Osaimi, and Stephen H Caldwell. 2009. "Systematic Review of Risk Factors for Fibrosis Progression in Non-Alcoholic Steatohepatitis." *Journal of Hepatology* 51 (2): 371–79. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.019.
- Arner, Peter. 2002. "Insulin Resistance in Type 2 Diabetes: Role of Fatty Acids." *Diabetes/metabolism Research and Reviews* 18 Suppl 2: S5-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11921432>.
- Aroor, Annayya R, Chirag H Mandavia, and James R Sowers. 2012. "Insulin Resistance and Heart Failure: Molecular Mechanisms." *Heart Failure Clinics* 8 (4): 609–17. doi:10.1016/j.hfc.2012.06.005.
- Bäckhed, Fredrik, Jill K Manchester, Clay F Semenkovich, and Jeffrey I Gordon. 2007. "Mechanisms Underlying the Resistance to Diet-Induced Obesity in Germ-Free Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (3): 979–84. doi:10.1073/pnas.0605374104.

- Baker, Peter R, Kristen E Boyle, Timothy R Koves, Olga R Ilkayeva, Deborah M Muoio, Joseph A Houmard, and Jacob E Friedman. 2015. "Metabolomic Analysis Reveals Altered Skeletal Muscle Amino Acid and Fatty Acid Handling in Obese Humans." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 23 (5): 981–88. doi:10.1002/oby.21046.
- Barak, A J, and H C Beckenhauer. 1988. "The Influence of Ethanol on Hepatic Transmethylation." *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)* 23 (1): 73–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3282521>.
- Barker, David J.P. 1997. "Maternal Nutrition, Fetal Nutrition, and Disease in Later Life." *Nutrition* 13 (9): 807–13. doi:10.1016/S0899-9007(97)00193-7.
- Bastard, Jean-Philippe, Mustapha Maachi, Claire Lagathu, Min Ji Kim, Martine Caron, Hubert Vidal, Jacqueline Capeau, and Bruno Feve. 2006. "Recent Advances in the Relationship between Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance." *European Cytokine Network* 17 (1): 4–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16613757>.
- Battiprolu, Pavan K, Camila Lopez-Crisosto, Zhao V Wang, Andriy Nemchenko, Sergio Lavandero, and Joseph A Hill. 2013. "Diabetic Cardiomyopathy and Metabolic Remodeling of the Heart." *Life Sciences* 92 (11): 609–15. doi:10.1016/j.lfs.2012.10.011.
- Bays, H E, R H Chapman, S Grandy, and SHIELD Investigators' Group. 2007. "The Relationship of Body Mass Index to Diabetes Mellitus, Hypertension and Dyslipidaemia: Comparison of Data from Two National Surveys." *International Journal of Clinical Practice* 61 (5): 737–47. doi:10.1111/j.1742-1241.2007.01336.x.
- Biancotto, Chiara, Gianmaria Frigè, and Saverio Minucci. 2010. "Histone Modification Therapy of Cancer." *Advances in Genetics* 70: 341–86. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60013-7.
- Bischoff, Stephan C, Giovanni Barbara, Wim Buurman, Theo Ockhuizen, Jörg-Dieter Schulzke, Matteo Serino, Herbert Tilg, Alastair Watson, and Jerry M Wells. 2014. "Intestinal Permeability--a New Target for Disease Prevention and Therapy." *BMC Gastroenterology* 14: 189. doi:10.1186/s12876-014-0189-7.
- Bison, Anaïs, Aude Marchal-Bressenot, Zhen Li, Illef Elamouri, Eva Feigerlova, Lu Peng, Remi Houlgatte, et al. 2016. "Foetal Programming by Methyl Donor Deficiency Produces Steato-Hepatitis in Rats Exposed to High Fat Diet." *Scientific Reports* 6 (October): 37207. doi:10.1038/srep37207.
- Bjornsson, Hans T, Martin I Sigurdsson, M Daniele Fallin, Rafael A Irizarry, Thor Aspelund, Hengmi Cui, Wenqiang Yu, et al. 2008. "Intra-Individual Change over Time in DNA Methylation with Familial Clustering." *JAMA* 299 (24): 2877–83. doi:10.1001/jama.299.24.2877.
- Björntorp, P. 2016. "'Portal' adipose Tissue as a Generator of Risk Factors for Cardiovascular Disease and Diabetes." *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 10 (4): 493–96. Accessed September 21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2196039>.
- Blaise, Sébastien A, Jean-Marc Alberto, Sandra Audonnet-Blaise, Jean-Louis Guéant, and Jean-Luc Daval. 2007. "Influence of Preconditioning-like Hypoxia on the Liver of Developing Methyl-Deficient Rats." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293 (6): E1492-502. doi:10.1152/ajpendo.00255.2007.
- Blaise, Sébastien, Emmanuelle Nédélec, Henri Schroeder, Jean-Marc Alberto, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Louis Guéant, and Jean-Luc Daval. 2007. "Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats." *The American Journal of Pathology* 170 (2): 667–79. doi:10.2353/ajpath.2007.060339.
- Boden, Guenther. 2011. "Obesity, Insulin Resistance and Free Fatty Acids." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 18 (2): 139–43. doi:10.1097/MED.0b013e3283444b09.
- Boeke, Caroline E, Andrea Baccarelli, Ken P Kleinman, Heather H Burris, Augusto A Litonjua, Sheryl L Rifas-Shiman, Letizia Tarantini, and Matthew Gillman. 2012. "Gestational Intake of Methyl Donors and Global LINE-1 DNA Methylation in Maternal and Cord Blood: Prospective Results from a Folate-Replete Population." *Epigenetics* 7 (3): 253–60. doi:10.4161/epi.7.3.19082.
- Bonner-Weir, S. 2000. "Life and Death of the Pancreatic Beta Cells." *Trends Endocrinol.Metab* 11 (9): 375–78. doi:10.1016/S1043-2760(00)00305-2.
- Bossenmeyer-Pourié, Carine, Sébastien Blaise, Grégory Pourié, Catherine Tomasetto, Sandra Audonnet, Sandrine Ortiou, Violette Koziel, et al. 2010. "Methyl Donor Deficiency Affects Fetal Programming of Gastric Ghrelin Cell Organization and Function in the Rat." *The American Journal of Pathology* 176 (1): 270–77. doi:10.2353/ajpath.2010.090153.
- Bouchard-Mercier, Annie, Iwona Rudkowska, Simone Lemieux, Patrick Couture, and Marie-Claude Vohl. 2013. "The Metabolic Signature Associated with the Western Dietary Pattern: A Cross-Sectional Study." *Nutrition Journal* 12 (December): 158. doi:10.1186/1475-2891-12-158.
- Brittain, Evan L, Megha Talati, Joshua P Fessel, He Zhu, Niki Penner, M Wade Calcutt, James D West, et al. 2016. "Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension." *Circulation* 133 (20): 1936–44. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.019351.

- Browne, J L, K Klipstein-Grobusch, A Franx, and D E Grobbee. 2016. "Prevention of Hypertensive Disorders of Pregnancy: A Novel Application of the Polypill Concept." *Current Cardiology Reports* 18 (6): 59. doi:10.1007/s11886-016-0725-x.
- Bugger, Heiko, and E Dale Abel. 2014. "Molecular Mechanisms of Diabetic Cardiomyopathy." *Diabetologia* 57 (4): 660–71. doi:10.1007/s00125-014-3171-6.
- Bugianesi, E, A Gastaldelli, E Vanni, R Gambino, M Cassader, S Baldi, V Ponti, G Pagano, E Ferrannini, and M Rizzetto. 2005. "Insulin Resistance in Non-Diabetic Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Sites and Mechanisms." *Diabetologia* 48 (4): 634–42. doi:10.1007/s00125-005-1682-x.
- Bugianesi, Elisabetta, Nicola Leone, Ester Vanni, Giulio Marchesini, Franco Brunello, Patrizia Carucci, Alessandro Musso, et al. 2002. "Expanding the Natural History of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Cryptogenic Cirrhosis to Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology* 123 (1): 134–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105842>.
- Butler, Alexandra E, Juliette Janson, Susan Bonner-Weir, Robert Ritzel, Robert a Rizza, and Peter C Butler. 2003. "Beta-Cell Deficit and Increased Beta-Cell Apoptosis in Humans with Type 2 Diabetes." *Diabetes* 52 (January): 102–10. doi:10.2337/diabetes.52.9.2304.
- Caesar, Robert, Valentina Tremaroli, Petia Kovatcheva-Datchary, Patrice D. Cani, and Fredrik Bäckhed. 2015. "Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling." *Cell Metabolism* 22 (4): 658–68. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.026.
- Caldwell, Stephen H, and Deborah M Crespo. 2004. "The Spectrum Expanded: Cryptogenic Cirrhosis and the Natural History of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 40 (4): 578–84. doi:10.1016/j.jhep.2004.02.013.
- Cani, Patrice D, Rodrigo Bibiloni, Claude Knauf, Aurélie Waget, Audrey M Neyrinck, Nathalie M Delzenne, and Rémy Burcelin. 2008. "Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice." *Diabetes* 57 (6): 1470–81. doi:10.2337/db07-1403.
- Castro, Ana Valeria B, Cathryn M Kolka, Stella P Kim, and Richard N Bergman. 2014. "Obesity, Insulin Resistance and Comorbidities? Mechanisms of Association." *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia E Metabologia* 58 (6): 600–609. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25211442>.
- Catena, Cristiana, GianLuca Colussi, and Leonardo A Sechi. 2015. "Response to 'Plasma Homocysteine Levels and Endothelial Dysfunction in Cerebro- and Cardiovascular Diseases in the Metabolic Syndrome'." *American Journal of Hypertension* 28 (December): 2015. doi:10.1093/ajh/hpv159.
- Cerf-Bensussan, Nadine, and Valérie Gaboriau-Routhiau. 2010. "The Immune System and the Gut Microbiota: Friends or Foes?" *Nature Reviews. Immunology* 10 (10): 735–44. doi:10.1038/nri2850.
- Chakraborti, Chandra Kanti. 2015. "Role of Adiponectin and Some Other Factors Linking Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity." *World Journal of Diabetes* 6 (15): 1296–1308. doi:10.4239/wjd.v6.i15.1296.
- Chan, J M, E B Rimm, G A Colditz, M J Stampfer, and W C Willett. 1994. "Obesity, Fat Distribution, and Weight Gain as Risk Factors for Clinical Diabetes in Men." *Diabetes Care* 17 (9): 961–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7988316>.
- Chaurasia, Bhagirath, and Scott A Summers. 2015. "Ceramides - Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 26 (10): 538–50. doi:10.1016/j.tem.2015.07.006.
- Chen, Gaili, Julien Broséus, Sébastien Hergalant, Audrey Donnart, Catherine Chevalier, Francisco Bolaños-Jiménez, Jean-Louis Guéant, and Rémi Houlgatte. 2015a. "Identification of Master Genes Involved in Liver Key Functions through Transcriptomics and Epigenomics of Methyl Donor Deficiency in Rat: Relevance to Nonalcoholic Liver Disease." *Molecular Nutrition & Food Research* 59 (2): 293–302. doi:10.1002/mnfr.201400483.
- Chen, Jingshu, Yuan Li, Yanan Tian, Chang Huang, Defa Li, Qing Zhong, and Xi Ma. 2015. "Interaction between Microbes and Host Intestinal Health: Modulation by Dietary Nutrients and Gut-Brain-Endocrine-Immune Axis." *Current Protein & Peptide Science* 16 (7): 592–603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26122779>.
- Chen, L H, M L Liu, H Y Hwang, L S Chen, J Korenberg, and B Shane. 1997. "Human Methionine Synthase. cDNA Cloning, Gene Localization, and Expression." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3628–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013615>.
- Clark, Jeanne M. 2006. "The Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults." *Journal of Clinical Gastroenterology* 40 Suppl 1 (March): S5-10. doi:10.1097/01.mcg.0000168638.84840.ff.
- Clerico, Aldo, Claudio Passino, Maria Franzini, and Michele Emdin. 2016. "Natriuretic Peptides as Biomarkers of Cardiac Endocrine Function in Heart Failure: New Challenges and Perspectives." *Future Cardiology* 12 (5): 573–84. doi:10.2217/fca-2016-0013.

- Coelho, David, Jaeseung C Kim, Isabelle R Miousse, Stephen Fung, Marcel du Moulin, Insa Buers, Terttu Suormala, et al. 2012. "Mutations in ABCD4 Cause a New Inborn Error of Vitamin B12 Metabolism." *Nature Genetics* 44 (10): 1152–55. doi:10.1038/ng.2386.
- Coelho, David, Terttu Suormala, Martin Stucki, Jordan P Lerner-ellis, D Ph, David S Rosenblatt, Robert F Newbold, Matthias R Baumgartner, and Brian Fowler. 2008. "Gene Identification for the cblD Defect of Vitamin B12 Metabolism." *The New England Journal of Medicine* 358 (14): pp 1454-64.
- Cordero, Paul, Javier Campion, Fermin I Milagro, Estibaliz Goyenechea, Thais Steemburgo, Biola M Javierre, and J Alfredo Martinez. 2011. "Leptin and TNF-Alpha Promoter Methylation Levels Measured by MSP Could Predict the Response to a Low-Calorie Diet." *Journal of Physiology and Biochemistry* 67 (3): 463–70. doi:10.1007/s13105-011-0084-4.
- Cox, Amanda J, Nicholas P West, and Allan W Cripps. 2015. "Obesity, Inflammation, and the Gut Microbiota." *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 3 (3): 207–15. doi:10.1016/S2213-8587(14)70134-2.
- Crown, Scott B, Nicholas Marze, and Maciek R Antoniewicz. 2015. "Catabolism of Branched Chain Amino Acids Contributes Significantly to Synthesis of Odd-Chain and Even-Chain Fatty Acids in 3T3-L1 Adipocytes." *PloS One* 10 (12): e0145850. doi:10.1371/journal.pone.0145850.
- Dahlhoff, Christoph, Stefanie Worsch, Manuela Sailer, Björn A. Hummel, Jarlei Fiamoncini, Kirsten Uebel, Rima Obeid, et al. 2014. "Methyl-Donor Supplementation in Obese Mice Prevents the Progression of NAFLD, Activates AMPK and Decreases Acyl-Carnitine Levels." *Molecular Metabolism* 3 (5). Elsevier GmbH: 565–80. doi:10.1016/j.molmet.2014.04.010.
- Dalmas, Elise, Nicolas Venteclef, Charles Caer, Christine Poitou, Isabelle Cremer, Judith Aron-Wisniewsky, Sébastien Lacroix-Desmazes, et al. 2014. "T Cell-Derived IL-22 Amplifies IL-1 β -Driven Inflammation in Human Adipose Tissue: Relevance to Obesity and Type 2 Diabetes." *Diabetes* 63 (6): 1966–77. doi:10.2337/db13-1511.
- Dam-Larsen, S, M Franzmann, I B Andersen, P Christoffersen, L B Jensen, T I A Sørensen, U Becker, and F Bendtsen. 2004. "Long Term Prognosis of Fatty Liver: Risk of Chronic Liver Disease and Death." *Gut* 53 (5): 750–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15082596>.
- De Bree, Angelika, W M Monique Verschuren, Daan Kromhout, Leo A J Kluijtmans, and Henk J Blom. 2002. "Homocysteine Determinants and the Evidence to What Extent Homocysteine Determines the Risk of Coronary Heart Disease." *Pharmacological Reviews* 54 (4): 599–618. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429870>.
- Dehkordi, Elham Hashemi, Morteza Sedehi, Zohre Gholipour Shahraki, and Reza Najafi. 2016. "Effect of Folic Acid on Homocysteine and Insulin Resistance of Overweight and Obese Children and Adolescents." *Advanced Biomedical Research* 5: 88. doi:10.4103/2277-9175.182219.
- DeMarco, Vincent G, Annayya R Aroor, and James R Sowers. 2014. "The Pathophysiology of Hypertension in Patients with Obesity." *Nature Reviews. Endocrinology* 10 (6): 364–76. doi:10.1038/nrendo.2014.44.
- Dhalla, N S, X Liu, V Panagia, and N Takeda. 1998. "Subcellular Remodeling and Heart Dysfunction in Chronic Diabetes." *Cardiovascular Research* 40 (2): 239–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893715>.
- Dick, Katherine J, Christopher P Nelson, Loukia Tsaprouni, Johanna K Sandling, Dylan Aïssi, Simone Wahl, Eshwar Meduri, et al. 2014. "DNA Methylation and Body-Mass Index: A Genome-Wide Analysis." *Lancet (London, England)* 383 (9933): 1990–98. doi:10.1016/S0140-6736(13)62674-4.
- Dodds, Linda, Deshayne B Fell, Kent C Dooley, B Anthony Armson, Alexander C Allen, Bassam A Nassar, Sherry Perkins, and K S Joseph. 2008. "Effect of Homocysteine Concentration in Early Pregnancy on Gestational Hypertensive Disorders and Other Pregnancy Outcomes." *Clinical Chemistry* 54 (2): 326–34. doi:10.1373/clinchem.2007.097469.
- Dolinoy, Dana C, Radhika Das, Jennifer R Weidman, and Randy L Jirtle. 2007. "Metastable Epialleles, Imprinting, and the Fetal Origins of Adult Diseases." *Pediatric Research* 61 (5 Pt 2): 30R–37R. doi:10.1203/pdr.0b013e31804575f7.
- Du Plessis, Johannie, Jos van Pelt, Hannelie Korf, Chantal Mathieu, Bart van der Schueren, Matthias Lannoo, Tom Oyen, et al. 2015. "Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Gastroenterology* 149 (3): 635–48.e14. doi:10.1053/j.gastro.2015.05.044.
- Dunn, Winston, Ronghui Xu, Deborah L Wingard, Christopher Rogers, Paul Angulo, Zobair M Younossi, and Jeffrey B Schwimmer. 2008. "Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mortality Risk in a Population-Based Cohort Study." *The American Journal of Gastroenterology* 103 (9): 2263–71. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02034.x.
- Eckel, R H. 1989. "Lipoprotein Lipase. A Multifunctional Enzyme Relevant to Common Metabolic Diseases." *The New England Journal of Medicine* 320 (16): 1060–68. doi:10.1056/NEJM198904203201607.
- Eckel, Robert H., KGMM G M M Alberti, Scott M. Grundy, and Paul Z. Zimmet. 2010. "The Metabolic Syndrome." *The Lancet* 375 (9710): 181–83. doi:10.1016/S0140-6736(09)61794-3.

- Eckel, Robert H, Scott M Grundy, and Paul Z Zimmet. 2005. "The Metabolic Syndrome." *Lancet (London, England)* 365 (9468): 1415–28. doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
- Egan, B M, E L Greene, and T L Goodfriend. 2001. "Insulin Resistance and Cardiovascular Disease." *American Journal of Hypertension* 14 (6 Pt 2): 116S–125S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411746>.
- El Kholty, S, J L Gueant, L Bressler, M Djalali, P Boissel, P Gerard, and J P Nicolas. 1991. "Portal and Biliary Phases of Enterohepatic Circulation of Corrinoids in Humans." *Gastroenterology* 101 (5): 1399–1408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1936810>.
- Esser, Nathalie, Sylvie Legrand-Poels, Jacques Piette, André J Scheen, and Nicolas Paquot. 2014. "Inflammation as a Link between Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes." *Diabetes Research and Clinical Practice* 105 (2): 141–50. doi:10.1016/j.diabres.2014.04.006.
- Everard, Amandine, Clara Belzer, Lucie Geurts, Janneke P Ouwerkerk, Céline Druart, Laure B Bindels, Yves Guiot, et al. 2013. "Cross-Talk between Akkermansia Muciniphila and Intestinal Epithelium Controls Diet-Induced Obesity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (22): 9066–71. doi:10.1073/pnas.1219451110.
- Everard, Amandine, Vladimir Lazarevic, Muriel Derrien, Myriam Girard, Giulio G Muccioli, Giulio M Muccioli, Audrey M Neyrinck, et al. 2011. "Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice." *Diabetes* 60 (11): 2775–86. doi:10.2337/db11-0227.
- Fabbrini, Elisa, Shelby Sullivan, and Samuel Klein. 2010. "Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic, and Clinical Implications." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (2): 679–89. doi:10.1002/hep.23280.
- Factor, S M, T Minase, S Cho, F Fein, J M Capasso, and E H Sonnenblick. 1984. "Coronary Microvascular Abnormalities in the Hypertensive-Diabetic Rat. A Primary Cause of Cardiomyopathy?" *The American Journal of Pathology* 116 (1): 9–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6742110>.
- Factor, S M, T Minase, and E H Sonnenblick. 1980. "Clinical and Morphological Features of Human Hypertensive-Diabetic Cardiomyopathy." *American Heart Journal* 99 (4): 446–58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6444776>.
- Fain, John N., Atul K. Madan, M. Lloyd Hiler, Paramjeet Cheema, and Suleiman W. Bahouth. 2004. "Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans." *Endocrinology* 145 (5): 2273–82. doi:10.1210/en.2003-1336.
- Falcão-Pires, Inês, and Adelino F Leite-Moreira. 2012. "Diabetic Cardiomyopathy: Understanding the Molecular and Cellular Basis to Progress in Diagnosis and Treatment." *Heart Failure Reviews* 17 (3): 325–44. doi:10.1007/s10741-011-9257-z.
- Fang, Zhi You, Johannes B Prins, and Thomas H Marwick. 2004. "Diabetic Cardiomyopathy: Evidence, Mechanisms, and Therapeutic Implications." *Endocrine Reviews* 25 (4): 543–67. doi:10.1210/er.2003-0012.
- Faria, Gil, Diogo Pestana, Marisa Aral, John Preto, Sónia Norberto, Conceição Calhau, João T Guimarães, and Antonio Taveira-Gomes. 2014. "Metabolic Score: Insights on the Development and Prediction of Remission of Metabolic Syndrome after Gastric Bypass." *Annals of Surgery* 260 (2): 279–86. doi:10.1097/SLA.0000000000000686.
- Fekete, Katalin, Cristiana Berti, Monica Trovato, Szimonetta Lohner, Carla Dullemeijer, Olga W Souverein, Irene Cetin, and Tamás Decsi. 2012. "Effect of Folate Intake on Health Outcomes in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis on Birth Weight, Placental Weight and Length of Gestation." *Nutrition Journal* 11: 75. doi:10.1186/1475-2891-11-75.
- Ferrannini, Ele, and Andrea Mari. 2014. "Beta-Cell Function in Type 2 Diabetes." *Metabolism: Clinical and Experimental* 63 (10). Elsevier Inc.: 1217–27. doi:10.1016/j.metabol.2014.05.012.
- Fezeu, Leopold, Beverley Balkau, André-Pascal Kengne, Eugène Sobngwi, and Jean-Claude Mbanya. 2007. "Metabolic Syndrome in a Sub-Saharan African Setting: Central Obesity May Be the Key Determinant." *Atherosclerosis* 193 (1): 70–76. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.037.
- Finer, S. 2015. "Fetal Programming via Maternal Diabetes: The Controversy Continues." *Diabetic Medicine* 32 (3): 291–94. doi:10.1111/dme.12675.
- Finer, S, P Saravanan, G Hitman, and C Yajnik. 2014. "The Role of the One-Carbon Cycle in the Developmental Origins of Type 2 Diabetes and Obesity." *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 31 (3): 263–72. doi:10.1111/dme.12390.
- Finucane, Mariel M, Gretchen A Stevens, Melanie J Cowan, Goodarz Danaei, John K Lin, Christopher J Paciorek, Gitanjali M Singh, et al. 2011. "National, Regional, and Global Trends in Body-Mass Index since 1980: Systematic Analysis of Health Examination Surveys and Epidemiological Studies with 960 Country-Years and

- 9-1 Million Participants.” *Lancet* (London, England) 377 (9765): 557–67. doi:10.1016/S0140-6736(10)62037-5.
- Fonseca, Vivian A, Louis M Fink, and Philip A Kern. 2003. “Insulin Sensitivity and Plasma Homocysteine Concentrations in Non-Diabetic Obese and Normal Weight Subjects.” *Atherosclerosis* 167 (1): 105–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618274>.
- Fontana, C, C Damonte, P Pregliasco, and C Roggi. 2016. “[Hypocaloric Diet and Normocaloric Diet in Outpatient Treatment in a Group of Children and Adolescents].” *La Pediatria Medica E Chirurgica : Medical and Surgical Pediatrics* 29 (6): 336–39. Accessed November 30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18410064>.
- Ford, Earl S. 2004. “The Metabolic Syndrome and Mortality from Cardiovascular Disease and All-Causes: Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study.” *Atherosclerosis* 173 (2): 309–14. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.022.
- Ford, Earl S. 2005. “Prevalence of the Metabolic Syndrome Defined by the International Diabetes Federation among Adults in the U.S.” *Diabetes Care* 28 (11): 2745–49. doi:10.2337/diacare.28.11.2745.
- Ford, Earl S, Wayne H Giles, and William H Dietz. 2002. “Prevalence of the Metabolic Syndrome among US Adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.” *JAMA* 287 (3): 356–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790215>.
- Forges, Thierry, P Monnier-Barbarino, J M Alberto, R M Guéant-Rodriguez, J L Daval, and J L Guéant. 2016. “Impact of Folate and Homocysteine Metabolism on Human Reproductive Health.” *Human Reproduction Update* 13 (3): 225–38. Accessed October 6. doi:10.1093/humupd/dml063.
- Foster, Gary D, Mark H Sanders, Richard Millman, Gary Zammit, Kelley E Borradaile, Anne B Newman, Thomas A Wadden, et al. 2009. “Obstructive Sleep Apnea among Obese Patients with Type 2 Diabetes.” *Diabetes Care* 32 (6): 1017–19. doi:10.2337/dc08-1776.
- Fouse, Tammy, and Stacy Brethauer. 2016. “Resolution of Comorbidities and Impact on Longevity Following Bariatric and Metabolic Surgery.” *The Surgical Clinics of North America* 96 (4): 717–32. doi:10.1016/j.suc.2016.03.007.
- Franco, Maria C P, Dulce E Casarini, Marcela S Carneiro-Ramos, Ana L Sawaya, Maria L M Barreto-Chaves, and Ricardo Sesso. 2008. “Circulating Renin-Angiotensin System and Catecholamines in Childhood: Is There a Role for Birthweight?” *Clinical Science (London, England : 1979)* 114 (5): 375–80. doi:10.1042/CS20070284.
- Frelut, Marie-Laure, Jean-Pierre Nicolas, Jean-Claude Guillard, and Genevieve Potier de Courcy. 2011. “Methylenetetrahydrofolate Reductase 677 C-&T Polymorphism: A Link between Birth Weight and Insulin Resistance in Obese Adolescents.” *International Journal of Pediatric Obesity : IJPO : An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 6 (2–2): e312–7. doi:10.3109/17477166.2010.486835.
- Fryer, Anthony A., Tamer M. Nafee, Khaled M K Ismail, William D. Carroll, Richard D. Emes, and William E. Farrell. 2009. “LINE-1 DNA Methylation Is Inversely Correlated with Cord Plasma Homocysteine in Man: A Preliminary Study.” *Epigenetics* 4 (6): 394–98. doi:10.4161/epi.4.6.9766.
- Gallistl, S, K Sudi, H Mangge, W Erwa, and M Borkenstein. 2000. “Insulin Is an Independent Correlate of Plasma Homocysteine Levels in Obese Children and Adolescents.” *Diabetes Care* 23 (9): 1348–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10977031>.
- Garcia, Maira Moreno, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Shabnam Pooya, Patrick Brachet, Jean-Marc Alberto, Elise Jeannesson, Fathia Maskali, et al. 2011. “Methyl Donor Deficiency Induces Cardiomyopathy through Altered Methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1.” *The Journal of Pathology* 225 (3): 324–35. doi:10.1002/path.2881.
- García, Olga P, Kurt Z Long, and Jorge L Rosado. 2009. “Impact of Micronutrient Deficiencies on Obesity.” *Nutrition Reviews* 67 (10): 559–72. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00228.x.
- Gastaldelli, Amalia. 2010. “Fatty Liver Disease: The Hepatic Manifestation of Metabolic Syndrome.” *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension* 33 (6): 546–47. doi:10.1038/hr.2010.60.
- Gatselis, Nikolaos K, George Ntaios, Konstantinos Makaritsis, and George N Dalekos. 2014. “Adiponectin: A Key Playmaker Adipocytokine in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.” *Clinical and Experimental Medicine* 14 (2): 121–31. doi:10.1007/s10238-012-0227-0.
- Genser, Laurent, James Rossario Casella Mariolo, Lidia Castagneto-Gissey, Spyros Panagiotopoulos, and Francesco Rubino. 2016. “Obesity, Type 2 Diabetes, and the Metabolic Syndrome: Pathophysiologic Relationships and Guidelines for Surgical Intervention.” *The Surgical Clinics of North America* 96 (4): 681–701. doi:10.1016/j.suc.2016.03.013.
- Ghoshal, Kalpana, Xin Li, Jharna Datta, Shoumei Bai, Igor Pogribny, Marta Pogribny, Yan Huang, Donn Young, and Samson T Jacob. 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.” *The Journal of Nutrition* 136 (6): 1522–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702315>.

- Greibe, Eva, Birgitte Horst Andreasen, Dorte L Lildballe, Anne L Morkbak, Anne-Mette Hvas, and Ebba Nexø. 2011. "Uptake of Cobalamin and Markers of Cobalamin Status: A Longitudinal Study of Healthy Pregnant Women." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49 (11): 1877–82. doi:10.1515/CCLM.2011.682.
- Grundy, Scott M. 2007. "Metabolic Syndrome: A Multiplex Cardiovascular Risk Factor." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (2): 399–404. doi:10.1210/jc.2006-0513.
- Grundy, Scott M, H Bryan Brewer, James I Cleeman, Sidney C Smith, and Claude Lenfant. 2004. "Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition Clinical Outcomes of Metabolic Syndrome." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2): e13-8. doi:10.1161/01.ATV.0000111245.75752.C6.
- Grundy, Scott M, James I Cleeman, Stephen R Daniels, Karen A Donato, Robert H Eckel, Barry A Franklin, David J Gordon, et al. 2005. "Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement: Executive Summary." *Critical Pathways in Cardiology* 4 (4): 198–203. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340209>.
- Gu, Ja K, Luenda E Charles, Michael E Andrew, Claudia C Ma, Tara A Hartley, John M Violanti, and Cecil M Burchfiel. 2016. "Prevalence of Work-Site Injuries and Relationship between Obesity and Injury among U.S. Workers: NHIS 2004-2012." *Journal of Safety Research* 58 (September): 21–30. doi:10.1016/j.jsr.2016.06.001.
- Guéant-Rodriguez, Rosa Maria, Rosario Spada, Maira Moreno-Garcia, Guido Anello, Paolo Bosco, Laurent Lagrost, Antonino Romano, Maurizio Elia, and Jean Louis Guéant. 2011. "Homocysteine Is a Determinant of ApoA-I and Both Are Associated with Ankle Brachial Index, in an Ambulatory Elderly Population." *Atherosclerosis* 214 (2): 480–85. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.11.031.
- Guéant, Jean-Louis, Maatem Caillerez-Fofou, Shyuefang Battaglia-Hsu, Jean-Marc Alberto, Jean-Noel Freund, Isabelle Dulluc, Charles Adjalla, et al. 2013. "Molecular and Cellular Effects of Vitamin B12 in Brain, Myocardium and Liver through Its Role as Co-Factor of Methionine Synthase." *Biochimie* 95 (5): 1033–40. doi:10.1016/j.biochi.2013.01.020.
- Guéant, Jean-Louis, L Hambaba, M Vidailhet, C Schaefer, V Wahlstedt, and J P Nicolas. 1989. "Concentration and Physicochemical Characterisation of Unsaturated Cobalamin Binding Proteins in Amniotic Fluid." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 181 (2): 151–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2736778>.
- Guéant, Jean-Louis, Fares Namour, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, and Jean-Luc Daval. 2013. "Folate and Fetal Programming: A Play in Epigenomics?" *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24 (6): 279–89. doi:10.1016/j.tem.2013.01.010.
- Guéant, Coelho, and Nicolas; 2014. "La Vitamine B12 et Les Maladies Génétiques Associées Vitamin B12 and Related Genetic Disorders." *Bull. Acad. Natle Méd* 198 (6): 1141–56.
- Guéant Rodriguez, R. M., R. Spada, S. Pooya, E. Jeannesson, M. a. Moreno Garcia, G. Anello, P. Bosco, et al. 2013. "Homocysteine Predicts Increased NT-pro-BNP through Impaired Fatty Acid Oxidation." *International Journal of Cardiology* 167 (3): 768–75. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.047.
- Guillard, JC, and B Lequeu. 1992. "Les Vitamines: Du Nutriment Au Médicament." <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015010734>.
- Gyakobo, Mawuli, Albert Gb Amoah, De-Anne Martey-Marbell, and Rachel C Snow. 2012. "Prevalence of the Metabolic Syndrome in a Rural Population in Ghana." *BMC Endocrine Disorders* 12 (October): 25. doi:10.1186/1472-6823-12-25.
- Hajer, Gideon R, Timon W van Haeften, and Frank L J Visseren. 2008. "Adipose Tissue Dysfunction in Obesity, Diabetes, and Vascular Diseases." *European Heart Journal* 29 (24): 2959–71. doi:10.1093/eurheartj/ehn387.
- Halle, M, A Berg, M W Baumstark, D König, M Huonker, and Keul Joseph. 1999. "Influence of Mild to Moderately Elevated Triglycerides on Low Density Lipoprotein Subfraction Concentration and Composition in Healthy Men with Low High Density Lipoprotein Cholesterol Levels." *Atherosclerosis* 143 (1): 185–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208494>.
- Harakeh, Steve M, Imran Khan, Taha Kumosani, Elie Barbour, Saad B Almasaudi, Suhad M Bahijri, Sulaiman M Alfadul, Ghada M A Ajabnoor, and Esam I Azhar. 2016. "Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6: 95. doi:10.3389/fcimb.2016.00095.
- Harmancey, Romain, Truong N Lam, Genna M Lubrano, Patrick H Guthrie, Deborah Vela, and Heinrich Taegtmeyer. 2012. "Insulin Resistance Improves Metabolic and Contractile Efficiency in Stressed Rat Heart." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (8): 3118–26. doi:10.1096/fj.12-208991.
- Haugen, E, J Chen, J Wikström, J Grönros, L M Gan, and L X M Fu. 2007. "Parallel Gene Expressions of IL-6 and BNP during Cardiac Hypertrophy Complicated with Diastolic Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats." *International Journal of Cardiology* 115 (1): 24–28. doi:10.1016/j.ijcard.2006.01.031.

- Henstridge, Darren C, Martin Whitham, and Mark A Febbraio. 2014. "Chaperoning to the Metabolic Party: The Emerging Therapeutic Role of Heat-Shock Proteins in Obesity and Type 2 Diabetes." *Molecular Metabolism* 3 (8): 781–93. doi:10.1016/j.molmet.2014.08.003.
- HERBERT, V. 1962. "Experimental Nutritional Folate Deficiency in Man." *Transactions of the Association of American Physicians* 75: 307–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13953904>.
- Hernsdorff, Helen Hermana Miranda, Blanca Puchau, María Angeles Zulet, and José Alfredo Martínez. 2010. "Association of Body Fat Distribution with Proinflammatory Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Young Adult Subjects." *Omics : A Journal of Integrative Biology* 14 (3): 297–307. doi:10.1089/omi.2009.0125.
- Higashi, Y, S Sasaki, K Nakagawa, H Matsuura, K Chayama, and T Oshima. 2001. "Effect of Obesity on Endothelium-Dependent, Nitric Oxide-Mediated Vasodilation in Normotensive Individuals and Patients with Essential Hypertension." *American Journal of Hypertension* 14 (10): 1038–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710783>.
- Hogeveen, Marije, Henk J. Blom, and Martin Den Heijer. 2012. "Maternal Homocysteine and Small-for-Gestational-Age Offspring: Systematic Review and Meta-Analysis." *American Journal of Clinical Nutrition* 95 (1): 130–36. doi:10.3945/ajcn.111.016212.
- Höppener, J. W. M., H. M. Jacobs, N. Wierup, G. Sotthwes, M. Sprong, P. de Vos, R. Berger, F. Sundler, and B. Åhrén. 2008. "Human Islet Amyloid Polypeptide Transgenic Mice: In Vivo and Ex Vivo Models for the Role of hIAPP in Type 2 Diabetes Mellitus." *Experimental Diabetes Research* 2008: 1–8. doi:10.1155/2008/697035.
- Höppener, Jo W M, and Cees J M Lips. 2006. "Role of Islet Amyloid in Type 2 Diabetes Mellitus." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (5–6): 726–36. doi:10.1016/j.biocel.2005.12.009.
- Horn, Margaux A, and Andrew W Trafford. 2016. "Aging and the Cardiac Collagen Matrix: Novel Mediators of Fibrotic Remodelling." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 93 (April): 175–85. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.11.005.
- Hotamisligil, G S. 2008. "Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in Obesity and Diabetes." *International Journal of Obesity (2005)* 32 Suppl 7 (December): S52–4. doi:10.1038/ijo.2008.238.
- Hoyumpa, A M, H L Greene, G D Dunn, and S Schenker. 1975. "Fatty Liver: Biochemical and Clinical Considerations." *The American Journal of Digestive Diseases* 20 (12): 1142–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1200009>.
- Hoyumpa AM Jr, Greene HL, Dunn GD, Schenker S. 2010. "Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications NIH Public Access." *Hepatology* 51 (2): 679–89. doi:10.1002/hep.23280.Obesity.
- Hu, Gang, Qing Qiao, Jaakko Tuomilehto, Beverley Balkau, Knut Borch-Johnsen, Kalevi Pyörälä, and DECODE Study Group. 2004. "Prevalence of the Metabolic Syndrome and Its Relation to All-Cause and Cardiovascular Mortality in Nondiabetic European Men and Women." *Archives of Internal Medicine* 164 (10): 1066–76. doi:10.1001/archinte.164.10.1066.
- Hubackova, Sona, Katerina Krejčíková, Jiri Bartek, and Zdenek Hodny. 2012. "IL1- and TGFβ-Nox4 Signaling, Oxidative Stress and DNA Damage Response Are Shared Features of Replicative, Oncogene-Induced, and Drug-Induced Paracrine 'Bystander Senescence'." *Aging* 4 (12): 932–51. doi:10.18632/aging.100520.
- Hunder, G, K Schumann, G Strugala, J Gropp, B Fichtl, and W Forth. 1991. "Influence of Subchronic Exposure to Low Dietary Deoxynivalenol, a Trichothecene Mycotoxin, on Intestinal Absorption of Nutrients in Mice." *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 29 (12): 809–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1765325>.
- Ikeda, Shuntaro, Hiroyuki Koyama, Miki Sugimoto, and Shinichi Kume. 2012. "Roles of One-Carbon Metabolism in Preimplantation Period--Effects on Short-Term Development and Long-Term Programming--." *The Journal of Reproduction and Development* 58 (1): 38–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450283>.
- International Diabetes Federation. 2006. "The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome." *The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome* 28: 1–7. doi:10.1159/000282084.
- Iqbal, Mohammad Perwaiz. 2012. "Lead Pollution - a Risk Factor for Cardiovascular Disease in Asian Developing Countries." *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 25 (1): 289–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22186343>.
- Isfort, Michael, Sarah C W Stevens, Stephen Schaffer, Chian Ju Jong, and Loren E Wold. 2014. "Metabolic Dysfunction in Diabetic Cardiomyopathy." *Heart Failure Reviews* 19 (1): 35–48. doi:10.1007/s10741-013-9377-8.
- Isomaa, B, P Almgren, T Tuomi, B Forsén, K Lahti, M Nissén, M R Taskinen, and L Groop. 2001. "Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated with the Metabolic Syndrome." *Diabetes Care* 24 (4): 683–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315831>.

- Jacobsen, D W, V J Gatautis, R Green, K Robinson, S R Savon, M Secic, J Ji, J M Otto, and L M Taylor. 1994. "Rapid HPLC Determination of Total Homocysteine and Other Thiols in Serum and Plasma: Sex Differences and Correlation with Cobalamin and Folate Concentrations in Healthy Subjects." *Clinical Chemistry* 40 (6): 873–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8087981>.
- Jain, Swati S, Sabina Paglialunga, Chris Vigna, Alison Ludzki, Eric A Herbst, James S Lally, Patrick Schrauwen, et al. 2014. "High-Fat Diet-Induced Mitochondrial Biogenesis Is Regulated by Mitochondrial-Derived Reactive Oxygen Species Activation of CaMKII." *Diabetes* 63 (6): 1907–13. doi:10.2337/db13-0816.
- Jair, Kam-Wing, Kurtis E Bachman, Hiromu Suzuki, Angela H Ting, Ina Rhee, Ray-Whay Chiu Yen, Stephen B Baylin, and Kornel E Schuebel. 2006. "De Novo CpG Island Methylation in Human Cancer Cells." *Cancer Research* 66 (2): 682–92. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1980.
- Jensen, M D, M Caruso, V Heiling, and J M Miles. 1989. "Insulin Regulation of Lipolysis in Nondiabetic and IDDM Subjects." *Diabetes* 38 (12): 1595–1601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573554>.
- Jia, Guanghong, Annayya R Aroor, Luis A Martinez-Lemus, and James R Sowers. 2014. "Overnutrition, mTOR Signaling, and Cardiovascular Diseases." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (10): R1198-206. doi:10.1152/ajpregu.00262.2014.
- Jiang, Wenxia, Yasumi Nakayama, Jeffrey M. Sequeira, and Edward V. Quadros. 2013. "Mapping the Functional Domains of TCBLR/CD320, the Receptor for Cellular Uptake of Transcobalamin-Bound Cobalamin." *FASEB Journal* 27 (8): 2988–94. doi:10.1096/fj.13-230185.
- Jiang, Xinyin, Haim Y. Bar, Jian Yan, Sara Jones, Patsy M. Brannon, Allyson A. West, Cydne A. Perry, et al. 2013. "A Higher Maternal Choline Intake among Third-Trimester Pregnant Women Lowers Placental and Circulating Concentrations of the Antiangiogenic Factor Fms-like Tyrosine Kinase-1 (sFLT1)." *FASEB Journal* 27 (3): 1245–53. doi:10.1096/fj.12-221648.
- Jo, Junghyo, Oksana Gavrilova, Stephanie Pack, William Jou, Shawn Mullen, Anne E Sumner, Samuel W Cushman, and Vipul Periwal. 2009. "Hypertrophy And/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth." *PLoS Computational Biology* 5 (3): e1000324. doi:10.1371/journal.pcbi.1000324.
- Jolivet, J, F Faucher, and M F Pinard. 1987. "Influence of Intracellular Folates on Methotrexate Metabolism and Cytotoxicity." *Biochemical Pharmacology* 36 (19): 3310–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2444232>.
- Jonas, Jean-christophe, Arun Sharma, Wendy Hasenkamp, Hasan Ilkova, Giovanni Patane, Ross Laybutt, Susan Bonner-weir, and Gordon C Weir. 1999. "Chronic Hyperglycemia Triggers Loss of Pancreatic β Cell Differentiation in an Animal Model of Diabetes *." 274 (20): 14112–21.
- Kahleová, Regina, Daniela Palyzová, Karel Zvára, Jana Zvárová, Karel Hrach, Iva Nováková, Josef Hyánek, Iva Bendlová, and Viktor Kořín. 2002. "Essential Hypertension in Adolescents: Association with Insulin Resistance and with Metabolism of Homocysteine and Vitamins." *American Journal of Hypertension* 15 (10 Pt 2): 857–64. doi:10.1016/S0895-7061(02)02984-9.
- Kahn, R, J Buse, E Ferrannini, and M Stern. 2005. "The Metabolic Syndrome: Time for a Critical Appraisal: Joint Statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." *Diabetes Care* 28 (9): 2289–2304. doi:10.2337/diacare.28.9.2289.
- Kahn, S E. 2001. "Clinical Review 135: The Importance of Beta-Cell Failure in the Development and Progression of Type 2 Diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (9): 4047–58. doi:10.1210/jcem.86.9.7713.
- Kahn, S E, R L Prigeon, D K McCulloch, E J Boyko, R N Bergman, M W Schwartz, J L Neifing, W K Ward, J C Beard, and J P Palmer. 1993. "Quantification of the Relationship between Insulin Sensitivity and Beta-Cell Function in Human Subjects. Evidence for a Hyperbolic Function." *Diabetes* 42 (11): 1663–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8405710>.
- Kahn, Steven E, Rebecca L Hull, and Kristina M Utzschneider. 2006. "Mechanisms Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes." *Nature* 444 (7121): 840–46. doi:10.1038/nature05482.
- Kalhan, Satish C. 2016. "One Carbon Metabolism in Pregnancy: Impact on Maternal, Fetal and Neonatal Health." *Molecular and Cellular Endocrinology* 435. Elsevier Ireland Ltd: 48–60. doi:10.1016/j.mce.2016.06.006.
- Kapadia, C R. 1995. "Vitamin B12 in Health and Disease: Part I--Inherited Disorders of Function, Absorption, and Transport." *The Gastroenterologist* 3 (4): 329–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8775094>.
- Keller, Kaitlyn M, and Susan E Howlett. 2016. "Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart." *The Canadian Journal of Cardiology* 32 (9): 1065–73. doi:10.1016/j.cjca.2016.03.017.
- Kemse, N, A Kale, and S Joshi. 2016. "Maternal Supplementation of Omega-3 Fatty Acids and Micronutrients Reduces Cardiometabolic Variables in Pregnancy Induced Hypertension Rats." *Life Sciences* 155 (June): 85–93. doi:10.1016/j.lfs.2016.05.016.

- Kengne, Andre P, Serge N Limen, Eugene Sobngwi, Cathérine Ft Djouogo, and Christophe Nouedoui. 2012. "Metabolic Syndrome in Type 2 Diabetes: Comparative Prevalence according to Two Sets of Diagnostic Criteria in Sub-Saharan Africans." *Diabetology & Metabolic Syndrome* 4 (1): 22. doi:10.1186/1758-5996-4-22.
- Kenyon, S H, A Nicolaou, and W A Gibbons. 1998. "The Effect of Ethanol and Its Metabolites upon Methionine Synthase Activity in Vitro." *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 15 (4): 305–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9590515>.
- Kerek, R, A Geoffroy, A Bison, N Martin, N Akchiche, G Pourié, D Helle, J-L Guéant, C Bossenmeyer-Pourié, and J-L Daval. 2013. "Early Methyl Donor Deficiency May Induce Persistent Brain Defects by Reducing Stat3 Signaling Targeted by miR-124." *Cell Death & Disease* 4 (August): e755. doi:10.1038/cddis.2013.278.
- Kim, Kyong-chol, Simonetta Friso, and Sang-Woon Choi. 2009. "DNA Methylation, an Epigenetic Mechanism Connecting Folate to Healthy Embryonic Development and Aging." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (12): 917–26. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.06.008.
- Kim, Young-Bum, Gerald I Shulman, and Barbara B Kahn. 2002. "Fatty Acid Infusion Selectively Impairs Insulin Action on Akt1 and Protein Kinase C Lambda/zeta but Not on Glycogen Synthase Kinase-3." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 32915–22. doi:10.1074/jbc.M204710200.
- Kleiner, David E, Elizabeth M Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J Contos, Oscar W Cummings, Linda D Ferrell, et al. 2005. "Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (6): 1313–21. doi:10.1002/hep.20701.
- Knight, Bridget Ann, Beverley M Shields, Adam Brook, Anita Hill, Dattatray S Bhat, Andrew T Hattersley, and Chittaranjan S Yajnik. 2015. "Lower Circulating B12 Is Associated with Higher Obesity and Insulin Resistance during Pregnancy in a Non-Diabetic White British Population." *PloS One* 10 (8): e0135268. doi:10.1371/journal.pone.0135268.
- Kouzarides, Tony. 2007. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128 (4): 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Kräutler, Bernhard. 2005. "Vitamin B12: Chemistry and Biochemistry." *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 4): 806–10. doi:10.1042/BST0330806.
- Krishnaveni, G V, J C Hill, S R Veena, D S Bhat, A K Wills, C L S Karat, C S Yajnik, and C H D Fall. 2009. "Low Plasma Vitamin B12 in Pregnancy Is Associated with Gestational 'Diabesity' and Later Diabetes." *Diabetologia* 52 (11): 2350–58. doi:10.1007/s00125-009-1499-0.
- Krishnaveni, Ghattu V, Sargoor R Veena, Samuel C Karat, Chittaranjan S Yajnik, and Caroline H D Fall. 2014. "Association between Maternal Folate Concentrations during Pregnancy and Insulin Resistance in Indian Children." *Diabetologia* 57 (1): 110–21. doi:10.1007/s00125-013-3086-7.
- Kwiterovich, Peter O. 2002. "Clinical Relevance of the Biochemical, Metabolic, and Genetic Factors That Influence Low-Density Lipoprotein Heterogeneity." *The American Journal of Cardiology* 90 (8A): 30i–47i. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419479>.
- Kwong, W. Y., S. J. Adamiak, A. Gwynn, R. Singh, and K. D. Sinclair. 2010. "Endogenous Folates and Single-Carbon Metabolism in the Ovarian Follicle, Oocyte and Pre-Implantation Embryo." *Reproduction* 139 (4): 705–15. doi:10.1530/REP-09-0517.
- Lakka, H M, D E Laaksonen, T A Lakka, L K Niskanen, E Kumpusalo, J Tuomilehto, and J T Salonen. 2002. "The Metabolic Syndrome and Total and Cardiovascular Disease Mortality in Middle Aged Men." *Jama* 288 (21): 2709–16.
- Lapidus, L, C Bengtsson, B Larsson, K Pennert, E Rybo, and L Sjöström. 1984. "Distribution of Adipose Tissue and Risk of Cardiovascular Disease and Death: A 12 Year Follow up of Participants in the Population Study of Women in Gothenburg, Sweden." *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 289 (6454): 1257–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6437507>.
- Laraqui, Abdelilah, Abdellatif Allami, Alain Carrié, Alain Raisonnier, Anne-Sofie Coiffard, Fatima Benkouka, Abdenabi Bendriss, et al. 2007. "Relation between Plasma Homocysteine, Gene Polymorphisms of Homocysteine Metabolism-Related Enzymes, and Angiographically Proven Coronary Artery Disease." *European Journal of Internal Medicine* 18 (6): 474–83. doi:10.1016/j.ejim.2007.02.020.
- Le Chatelier, E, T Nielsen, J Qin, E Prifti, F Hildebrand, G Falony, M Almeida, et al. 2013. "Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers." *Nature* 500 (7464): 541–46. doi:10.1038/nature12506.
- Lemoine, Maud, Vlad Ratziu, Minji Kim, Mustapha Maachi, Dominique Wendum, François Paye, Jean Philippe Bastard, et al. 2009. "Serum Adipokine Levels Predictive of Liver Injury in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 29 (9): 1431–38. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02022.x.

- Leon, Benjamin M, and Thomas M Maddox. 2015. "Diabetes and Cardiovascular Disease: Epidemiology, Biological Mechanisms, Treatment Recommendations and Future Research." *World Journal of Diabetes* 6 (13): 1246–58. doi:10.4239/wjd.v6.i13.1246.
- Levy, J C, D R Matthews, and M P Hermans. 1998. "Correct Homeostasis Model Assessment (HOMA) Evaluation Uses the Computer Program." *Diabetes Care* 21 (12): 2191–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839117>.
- Lewis, Sarah J, Debbie A Lawlor, Børge G Nordestgaard, Anne Tybjaerg-Hansen, Shah Ebrahim, Jeppe Zacho, Andy Ness, Sam Leary, and George Davey Smith. 2008. "The Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genotype and the Risk of Obesity in Three Large Population-Based Cohorts." *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 159 (1): 35–40. doi:10.1530/EJE-08-0056.
- Lewis, Sarah J, Sam Leary, George Davey Smith, and Andy Ness. 2009. "Body Composition at Age 9 Years, Maternal Folate Intake during Pregnancy and Methyltetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Genotype." *The British Journal of Nutrition* 102 (4): 493–96. doi:10.1017/S0007114509231746.
- Leychenko, Anna, Eugene Konorev, Mayumi Jijiwa, and Michelle L Matter. 2011. "Stretch-Induced Hypertrophy Activates NFκB-Mediated VEGF Secretion in Adult Cardiomyocytes." *PloS One* 6 (12): e29055. doi:10.1371/journal.pone.0029055.
- Li, Lei, Yi Chen, Jing Li, Haifeng Yin, Xiaoyun Guo, Jessica Doan, Jeffery D Molkenin, and Qinghang Liu. 2015. "TAK1 Regulates Myocardial Response to Pathological Stress via NFAT, NFκB, and Bnip3 Pathways." *Scientific Reports* 5 (November): 16626. doi:10.1038/srep16626.
- Li, Mingzhou, Honglong Wu, Tao Wang, Yudong Xia, Long Jin, Anan Jiang, Li Zhu, Lei Chen, Ruiqiang Li, and Xuewei Li. 2012. "Co-Methylated Genes in Different Adipose Depots of Pig Are Associated with Metabolic, Inflammatory and Immune Processes." *International Journal of Biological Sciences* 8 (6): 831–37. doi:10.7150/ijbs.4493.
- Li, R K, G Li, D A Mickle, R D Weisel, F Merante, H Luss, V Rao, G T Christakis, and W G Williams. 1997. "Overexpression of Transforming Growth Factor-beta1 and Insulin-like Growth Factor-I in Patients with Idiopathic Hypertrophic Cardiomyopathy." *Circulation* 96 (3): 874–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9264495>.
- Lillioja, S, D M Mott, B V Howard, P H Bennett, H Yki-Järvinen, D Freymond, B L Nyomba, F Zurlo, B Swinburn, and C Bogardus. 1988. "Impaired Glucose Tolerance as a Disorder of Insulin Action. Longitudinal and Cross-Sectional Studies in Pima Indians." *The New England Journal of Medicine* 318 (19): 1217–25. doi:10.1056/NEJM198805123181901.
- Lindsey, Merry L, Danielle K Goshorn, Christina E Squires, G Patricia Escobar, Jennifer W Hendrick, Joseph T Mingoia, Sarah E Sweterlitsch, and Francis G Spinale. 2005. "Age-Dependent Changes in Myocardial Matrix Metalloproteinase/tissue Inhibitor of Metalloproteinase Profiles and Fibroblast Function." *Cardiovascular Research* 66 (2): 410–19. doi:10.1016/j.cardiores.2004.11.029.
- Liu, Bo, Yihui Lin, Agus Darwanto, Xuehui Song, Guoliang Xu, and Kangling Zhang. 2009. "Identification and Characterization of Propionylation at Histone H3 Lysine 23 in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (47): 32288–95. doi:10.1074/jbc.M109.045856.
- Liu, Jiankang, Weili Shen, Baolu Zhao, Ying Wang, Karin Wertz, Peter Weber, and Peifang Zhang. 2009. "Targeting Mitochondrial Biogenesis for Preventing and Treating Insulin Resistance in Diabetes and Obesity: Hope from Natural Mitochondrial Nutrients." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (14): 1343–52. doi:10.1016/j.addr.2009.06.007.
- Machado, Mariana Verdelho, Duarte M S Ferreira, Rui E Castro, Ana Rita Silvestre, Teresinha Evangelista, João Coutinho, Fátima Carepa, Adília Costa, Cecília M P Rodrigues, and Helena Cortez-Pinto. 2012. "Liver and Muscle in Morbid Obesity: The Interplay of Fatty Liver and Insulin Resistance." *PloS One* 7 (2): e31738. doi:10.1371/journal.pone.0031738.
- Maclean, Neil, B Ch, and Robertson F Ogilvie. 1955. "Quantitative Estimation of the Pancreatic Islet Tissue in Diabetic Subjects."
- Magalhaes, Isabelle, Karine Pingris, Christine Poitou, Stéphanie Bessoles, Nicolas Venticlef, Badr Kiaf, Lucie Beaudoin, et al. 2015. "Mucosal-Associated Invariant T Cell Alterations in Obese and Type 2 Diabetic Patients." *The Journal of Clinical Investigation* 125 (4): 1752–62. doi:10.1172/JCI78941.
- Maisch, B, P Alter, and S Pankuweit. 2011. "Diabetic Cardiomyopathy--Fact or Fiction?" *Herz* 36 (2): 102–15. doi:10.1007/s00059-011-3429-4.
- Malayala, Srikrishna Varun, and Ambreen Raza. 2016. "Health Behavior and Perceptions among African American Women with Metabolic Syndrome." *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives* 6 (1): 30559. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908390>.

- Malik, Vasanti S, Walter C Willett, and Frank B Hu. 2013. "Global Obesity: Trends, Risk Factors and Policy Implications." *Nature Reviews. Endocrinology* 9 (1). Nature Publishing Group: 13–27. doi:10.1038/nrendo.2012.199.
- Mancia, Giuseppe, Pascal Bousquet, Jean Luc Elghozi, Murray Esler, Guido Grassi, Stevo Julius, John Reid, and Peter A Van Zwieten. 2007. "The Sympathetic Nervous System and the Metabolic Syndrome." *Journal of Hypertension* 25 (5): 909–20. doi:10.1097/HJH.0b013e328048d004.
- Manzato, E, S Zambon, A Zambon, A Cortella, G Sartore, and G Crepaldi. 1993. "Levels and Physicochemical Properties of Lipoprotein Subclasses in Moderate Hypertriglyceridemia." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 219 (1–2): 57–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306464>.
- Martin, Yvette N, Oreste E Salavaggione, Bruce W Eckloff, Eric D Wieben, Daniel J Schaid, and Richard M Weinshilboum. 2006. "Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Pharmacogenomics: Gene Resequencing and Functional Genomics." *Pharmacogenetics and Genomics* 16 (4): 265–77. doi:10.1097/01.fpc.0000194423.20393.08.
- Martinez-Aguayo, Alejandro, Marlene Aglony, Rodrigo Bancalari, Carolina Avalos, Lillian Bolte, Hernan Garcia, Carolina Loureiro, et al. 2012. "Birth Weight Is Inversely Associated with Blood Pressure and Serum Aldosterone and Cortisol Levels in Children." *Clinical Endocrinology* 76 (5): 713–18. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04308.x.
- Martos, Rosario, Miguel Valle, Rosario Morales, Ramón Cañete, M Inmaculada Gavilan, and Víctor Sánchez-Margalet. 2006. "Hyperhomocysteinemia Correlates with Insulin Resistance and Low-Grade Systemic Inflammation in Obese Prepubertal Children." *Metabolism: Clinical and Experimental* 55 (1): 72–77. doi:10.1016/j.metabol.2005.07.008.
- Matsuzawa, Yuji. 2006. "The Metabolic Syndrome and Adipocytokines." *FEBS Letters* 580 (12): 2917–21. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.028.
- McCabe, Dale C, and Marie A Caudill. 2005. "DNA Methylation, Genomic Silencing, and Links to Nutrition and Cancer." *Nutrition Reviews* 63 (6 Pt 1): 183–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16028562>.
- McCullough, Arthur J. 2006. "Pathophysiology of Nonalcoholic Steatohepatitis" 40 (March): 17–29.
- McCullough, Lauren E, Erlene E Miller, Michelle A Mendez, Amy P Murtha, Susan K Murphy, and Cathrine Hoyo. 2016. "Maternal B Vitamins: Effects on Offspring Weight and DNA Methylation at Genomically Imprinted Domains." *Clinical Epigenetics* 8: 8. doi:10.1186/s13148-016-0174-9.
- McGarry, J Denis. 2002. "Banting Lecture 2001: Dysregulation of Fatty Acid Metabolism in the Etiology of Type 2 Diabetes." *Diabetes* 51 (1): 7–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756317>.
- McNulty, Breige, Helene McNulty, Barry Marshall, Mary Ward, Anne M Molloy, John M Scott, James Dornan, and Kristina Pentieva. 2013. "Impact of Continuing Folic Acid after the First Trimester of Pregnancy: Findings of a Randomized Trial of Folic Acid Supplementation in the Second and Third Trimesters." *The American Journal of Clinical Nutrition* 98 (1): 92–98. doi:10.3945/ajcn.112.057489.
- Mels, Catharina M C, Aletta E Schutte, Elardus Erasmus, Hugo W Huisman, Rudolph Schutte, Carla M T Fourie, Ruan Kruger, et al. 2013. "L-Carnitine and Long-Chain Acylcarnitines Are Positively Correlated with Ambulatory Blood Pressure in Humans: The SABPA Study." *Lipids* 48 (1): 63–73. doi:10.1007/s11745-012-3732-8.
- Miele, Luca, Valentina Giorgio, Maria Adele Alberelli, Erica De Candia, Antonio Gasbarrini, and Antonio Grieco. 2015. "Impact of Gut Microbiota on Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease Risk." *Current Cardiology Reports* 17 (12). doi:10.1007/s11886-015-0671-z.
- Mihalik, Stephanie J, Sara F Michaliszyn, Javier de las Heras, Fida Bacha, SoJung Lee, Donald H Chace, Victor R DeJesus, Jerry Vockley, and Silva A Arslanian. 2012. "Metabolomic Profiling of Fatty Acid and Amino Acid Metabolism in Youth with Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence for Enhanced Mitochondrial Oxidation." *Diabetes Care* 35 (3): 605–11. doi:10.2337/DC11-1577.
- Milagro, Fermin I, Javier Campión, Paúl Cordero, Estíbaliz Goyenechea, Ana M Gómez-Uriz, Itziar Abete, Maria a Zulet, and J Alfredo Martínez. 2011. "A Dual Epigenomic Approach for the Search of Obesity Biomarkers: DNA Methylation in Relation to Diet-Induced Weight Loss." *The FASEB Journal* 25 (4): 1378–89. doi:10.1096/fj.10-170365.
- Monteiro-Sepulveda, Milena, Sothea Touch, Carla Mendes-Sá, Sébastien André, Christine Poitou, Omran Allatif, Aurélie Cotillard, et al. 2015. "Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling." *Cell Metabolism* 22 (1): 113–24. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.020.
- Morino, Katsutaro, Kitt Falk Petersen, and Gerald I Shulman. 2006. "Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links with Mitochondrial Dysfunction." *Diabetes* 55 Suppl 2 (December): S9–15. doi:10.2337/db06-S002.

- Murphy, Michelle M, John M Scott, Victoria Arija, Anne M Molloy, and Joan D Fernandez-Ballart. 2004. "Maternal Homocysteine before Conception and throughout Pregnancy Predicts Fetal Homocysteine and Birth Weight." *Clinical Chemistry* 50 (8): 1406–12. doi:10.1373/clinchem.2004.032904.
- Mytas, Dimitrios Z, Pavlos N Stougiannos, Michael N Zairis, Stefanos G Foussas, Vlassios N Pyrgakis, and Ioannis A Kyriazis. 2009. "Diabetic Myocardial Disease: Pathophysiology, Early Diagnosis and Therapeutic Options." *Journal of Diabetes and Its Complications* 23 (4): 273–82. doi:10.1016/j.jdiacomp.2007.12.005.
- Nagapoornima, P, A Ramesh, Srilakshmi, Suman Rao, P L Patricia, Madhuri Gore, M Dominic, and Swarnarekha. 2007. "Universal Hearing Screening." *Indian Journal of Pediatrics* 74 (6): 545–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17595496>.
- Namour, F., J. L. Olivier, I. Abdelmouttaleb, C. Adjalla, R. Debard, C. Salvat, and J. L. Guéant. 2001. "Transcobalamin Codon 259 Polymorphism in HT-29 and Caco-2 Cells and in Caucasians: Relation to Transcobalamin and Homocysteine Concentration in Blood." *Blood* 97 (4): 1092–98. doi:10.1182/blood.V97.4.1092.
- Neufcourt, L, K E Assmann, L K Fezeu, M Touvier, L Graffouillère, N Shivappa, J R Hébert, et al. 2015. "Prospective Association between the Dietary Inflammatory Index and Metabolic Syndrome: Findings from the SU.VI.MAX Study." *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* 25 (11): 988–96. doi:10.1016/j.numecd.2015.09.002.
- Newgard, Christopher B, Jie An, James R Bain, Michael J Muehlbauer, Robert D Stevens, Lillian F Lien, Andrea M Haqq, et al. 2009. "A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature That Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance." *Cell Metabolism* 9 (4): 311–26. doi:10.1016/j.cmet.2009.02.002.
- Ng, Marie, Tom Fleming, Margaret Robinson, Blake Thomson, Nicholas Graetz, Christopher Margono, Erin C Mullany, et al. 2014. "Global, Regional, and National Prevalence of Overweight and Obesity in Children and Adults during 1980-2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013." *Lancet (London, England)* 384 (9945): 766–81. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8.
- Nicolas, J P, and J L Guéant. 1995. "Gastric Intrinsic Factor and Its Receptor." *Baillière's Clinical Haematology* 8 (3): 515–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8534960>.
- Nielsen, Marianne J, Mie R Rasmussen, Christian B F Andersen, Ebba Nexø, and Søren K Moestrup. 2012. "Vitamin B12 Transport from Food to the Body's Cells—a Sophisticated, Multistep Pathway." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 9 (6). Nature Publishing Group: 345–54. doi:10.1038/nrgastro.2012.76.
- Nilsson, Emma, Ashok Matte, Alexander Perfilyev, Vanessa D. de Mello, Pirjo Käkälä, Jussi Pihlajamäki, and Charlotte Ling. 2015. "Epigenetic Alterations in Human Liver from Subjects with Type 2 Diabetes in Parallel with Reduced Folate Levels." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (November): jc20153204. doi:10.1210/jc.2015-3204.
- Nistala, Ravi, and James R Sowers. 2013. "Hypertension: Synergy of Antihypertensives in Elderly Patients with CKD." *Nature Reviews. Nephrology* 9 (1): 13–15. doi:10.1038/nrneph.2012.264.
- O'Neill, S, and L O'Driscoll. 2015. "Metabolic Syndrome: A Closer Look at the Growing Epidemic and Its Associated Pathologies." *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 16 (1): 1–12. doi:10.1111/obr.12229.
- ObEpi-Roche. 2012. "ObEpi-Roche 2012: Enquête Nationale Sur L'obésité et Le Surpoids." <http://www.roche.fr/innovation-recherche-medicale/decouverte-scientifique-medicale/cardio-metabolisme/enquete-nationale-obepi-2012.html>.
- Olivetti, G, G Giordano, D Corradi, M Melissari, C Lagrasta, S R Gambert, and P Anversa. 1995. "Gender Differences and Aging: Effects on the Human Heart." *Journal of the American College of Cardiology* 26 (4): 1068–79. doi:10.1016/0735-1097(95)00282-8.
- Onalan, Reside, Gogsen Onalan, Ziya Gunenc, and Erdem Karabulut. 2006. "Combining 2nd-Trimester Maternal Serum Homocysteine Levels and Uterine Artery Doppler for Prediction of Preeclampsia and Isolated Intrauterine Growth Restriction." *Gynecologic and Obstetric Investigation* 61 (3): 142–48. doi:10.1159/000090432.
- Oussalah, A., J. L. Guéant, and L. Peyrin-Biroulet. 2011. "Meta-Analysis: Hyperhomocysteinaemia in Inflammatory Bowel Diseases." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 34 (10): 1173–84. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04864.x.
- Palm, Noah W, Marcel R de Zoete, and Richard A Flavell. 2015. "Immune-Microbiota Interactions in Health and Disease." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 159 (2): 122–27. doi:10.1016/j.clim.2015.05.014.
- Park, Seung Ha, Byung Ik Kim, Jung Won Yun, Jeong Wook Kim, Dong Il Park, Yong Kyun Cho, In Kyung Sung, et al. 2004. "Insulin Resistance and C-Reactive Protein as Independent Risk Factors for Non-Alcoholic Fatty Liver

- Disease in Non-Obese Asian Men.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 19 (6): 694–98. doi:10.1111/j.1440-1746.2004.03362.x.
- Paulus, Walter J., and Carsten Tschöpe. 2013. “A Novel Paradigm for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Comorbidities Drive Myocardial Dysfunction and Remodeling through Coronary Microvascular Endothelial Inflammation.” *Journal of the American College of Cardiology* 62 (4): 263–71. doi:10.1016/j.jacc.2013.02.092.
- Pellanda, Hélène, Thierry Forges, Aude Bressenot, Abalo Chango, Jean Pierre Bronowicki, Jean Louis Guéant, and Fares Namour. 2012. “Fumonisin FB1 Treatment Acts Synergistically with Methyl Donor Deficiency during Rat Pregnancy to Produce Alterations of H3- and H4-Histone Methylation Patterns in Fetuses.” *Molecular Nutrition and Food Research* 56 (6): 976–85. doi:10.1002/mnfr.201100640.
- Peppard, Paul E, Terry Young, Jodi H Barnet, Mari Palta, Erika W Hagen, and Khin Mae Hla. 2013. “Increased Prevalence of Sleep-Disordered Breathing in Adults.” *American Journal of Epidemiology* 177 (9): 1006–14. doi:10.1093/aje/kws342.
- Petersen, Ann-Kristin, Sonja Zeilinger, Gabi Kastenmüller, Werner Römisch-Margl, Markus Brugger, Annette Peters, Christine Meisinger, et al. 2014. “Epigenetics Meets Metabolomics: An Epigenome-Wide Association Study with Blood Serum Metabolic Traits.” *Human Molecular Genetics* 23 (2): 534–45. doi:10.1093/hmg/ddt430.
- Plumptre, Lesley, Shannon P Masih, Anna Ly, Susanne Aufreiter, Kyoung-jin Sohn, Ruth Croxford, and Y Andrea. 2015. “The American Journal of Clinical Nutrition Version 3 High Concentrations of Folate and Unmetabolized Folic Acid in a Cohort of Pregnant Canadian Women and Umbilical Cord Blood Corresponding Author : Young-In Kim Lausman , Howard Berger , Deborah L O ’ Con.” *The American Journal of Clinical Nutrition*, 848–57. doi:10.3945/ajcn.115.110783.
- Poitou, Christine, Elise Dalmas, Mariana Renovato, Vanessa Benhamo, Froogh Hajdouch, Meriem Abdenmour, Jean-François Kahn, et al. 2011. “CD14^{dim}CD16⁺ and CD14⁺CD16⁺ Monocytes in Obesity and during Weight Loss: Relationships with Fat Mass and Subclinical Atherosclerosis.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (10): 2322–30. doi:10.1161/ATVBAHA.111.230979.
- Pooya, Shabnam, Sébastien Blaise, Maira Moreno Garcia, Jean Giudicelli, Jean-Marc Alberto, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Elise Jeannesson, et al. 2012. “Methyl Donor Deficiency Impairs Fatty Acid Oxidation through PGC-1 α Hypomethylation and Decreased ER-A, ERR-A, and HNF-4 α in the Rat Liver.” *Journal of Hepatology* 57 (2): 344–51. doi:10.1016/j.jhep.2012.03.028.
- Porte, D. 1996. “Normal Physiology and Phenotypic Characterization of Beta-Cell Function in Subjects at Risk for Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.” *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association* 13 (9 Suppl 6): S25–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8894477>.
- Prentki, Marc, and Barbara E Corkey. 1996. “Perspectives in Diabetes Are the (S-Cell Signaling Molecules Malonyl-CoA and Cytosolic Long-Chain Acyl-CoA Implicated in Multiple Tissue Defects of Obesity and NIDDM ?” 45 (November 1995).
- Qin, Junjie, Yingrui Li, Zhiming Cai, Shenghui Li, Jianfeng Zhu, Fan Zhang, Suisha Liang, et al. 2012. “A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes.” *Nature* 490 (7418): 55–60. doi:10.1038/nature11450.
- Raaf, Lamia, Christophe Noll, Mohamed El Hadi Cherifi, Jane-Lise Samuel, Claude Delcayre, Jean-Maurice Delabar, Yasmina Benazzoug, and Nathalie Janel. 2011. “Myocardial Fibrosis and TGFB Expression in Hyperhomocysteinemic Rats.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 347 (1–2): 63–70. doi:10.1007/s11010-010-0612-5.
- Rajan, Preethi, and Harly Greenberg. 2015. “Obstructive Sleep Apnea as a Risk Factor for Type 2 Diabetes Mellitus.” *Nature and Science of Sleep* 7 (January). Dove Press: 113–25. doi:10.2147/NSS.S90835.
- Rakyan, Vardhman K, Thomas A Down, David J Balding, and Stephan Beck. 2011. “Epigenome-Wide Association Studies for Common Human Diseases.” *Nature Reviews. Genetics* 12 (8): 529–41. doi:10.1038/nrg3000.
- Raman, Maitreyi, Iftikhar Ahmed, Patrick M Gillevet, Chris S Probert, Norman M Ratcliffe, Steve Smith, Rosemary Greenwood, et al. 2013. “Fecal Microbiome and Volatile Organic Compound Metabolome in Obese Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease.” *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 11 (7): 868–75-3. doi:10.1016/j.cgh.2013.02.015.
- Ramos-Roman, Maria A, Lawrence Sweetman, Maressa J Valdez, and Elizabeth J Parks. 2012. “Postprandial Changes in Plasma Acylcarnitine Concentrations as Markers of Fatty Acid Flux in Overweight and Obesity.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 61 (2): 202–12. doi:10.1016/j.metabol.2011.06.008.
- Rantalainen, Mattias, Blanca M Herrera, George Nicholson, Rory Bowden, Quin F Wills, Josine L Min, Matt J Neville, et al. 2011. “MicroRNA Expression in Abdominal and Gluteal Adipose Tissue Is Associated with mRNA Expression Levels and Partly Genetically Driven.” *PloS One* 6 (11): e27338. doi:10.1371/journal.pone.0027338.

- Rao, L, B Puschner, and T A Prolla. 2001. "Gene Expression Profiling of Low Selenium Status in the Mouse Intestine: Transcriptional Activation of Genes Linked to DNA Damage, Cell Cycle Control and Oxidative Stress." *The Journal of Nutrition* 131 (12): 3175–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739862>.
- Rauschert, Sebastian, Olaf Uhl, Berthold Koletzko, and Christian Hellmuth. 2014. "Metabolomic Biomarkers for Obesity in Humans: A Short Review." *Annals of Nutrition & Metabolism* 64 (3–4): 314–24. doi:10.1159/000365040.
- Reaven, G M. 1988. "Banting Lecture 1988. Role of Insulin Resistance in Human Disease." *Diabetes* 37 (12): 1595–1607. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3056758>.
- Refsum, H, P M Ueland, O Nygård, and S E Vollset. 1998. "Homocysteine and Cardiovascular Disease." *Annual Review of Medicine* 49: 31–62. doi:10.1146/annurev.med.49.1.31.
- Regan, T J. 1983. "Congestive Heart Failure in the Diabetic." *Annual Review of Medicine* 34: 161–68. doi:10.1146/annurev.me.34.020183.001113.
- Relton, Caroline L, Mark S Pearce, and Louise Parker. 2005. "The Influence of Erythrocyte Folate and Serum Vitamin B12 Status on Birth Weight." *The British Journal of Nutrition* 93 (5): 593–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975157>.
- Reuter, Stephanie E, and Allan M Evans. 2012. "Carnitine and Acylcarnitines: Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects." *Clinical Pharmacokinetics* 51 (9): 553–72. doi:10.2165/11633940-000000000-00000.
- Reynolds, Kristi, Dongfeng Gu, Paul K Whelton, Xigui Wu, Xiufang Duan, Jingping Mo, and Jiang He. 2007. "Prevalence and Risk Factors of Overweight and Obesity in China." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 15 (1): 10–18. doi:10.1038/oby.2007.527.
- Rinaldo, Piero, Dietrich Matern, and Michael J Bennett. 2002. "Fatty Acid Oxidation Disorders." *Annual Review of Physiology* 64: 477–502. doi:10.1146/annurev.physiol.64.082201.154705.
- Rinaudo, Paolo, and Erica Wang. 2012. "Fetal Programming and Metabolic Syndrome." *Annual Review of Physiology* 74: 107–30. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153245.
- Roberts, Aled W, Andrew L Clark, and Klaus K Witte. 2009. "Review Article: Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure in Metabolic Syndrome and Diabetes without Overt Coronary Artery Disease--Do We Need to Screen Our Patients?" *Diabetes & Vascular Disease Research* 6 (3): 153–63. doi:10.1177/1479164109338774.
- Robertson, K D. 2001. "DNA Methylation, Methyltransferases, and Cancer." *Oncogene* 20 (24): 3139–55. doi:10.1038/sj.onc.1204341.
- Roden, Michael, Thomas B Price, Gianluca Perseghin, Kitt Falk Petersen, Douglas L Rothman, Gary W Cline, and Gerald I Shulman. 1996. "Rapid Publication Mechanism of Free Fatty Acid – Induced Insulin Resistance in Humans" 97 (12): 2859–65.
- Ross Laybutt, D., Hideaki Kaneto, Wendy Hasenkamp, Shane Grey, Jean Christophe Jonas, Dennis C. Sgroi, Adam Groff, et al. 2002. "Increased Expression of Antioxidant and Antiapoptotic Genes in Islets That May Contribute to β -Cell Survival during Chronic Hyperglycemia." *Diabetes* 51 (2): 413–23.
- Rubler, S, J Dlugash, Y Z Yuceoglu, T Kumral, A W Branwood, and A Grishman. 1972. "New Type of Cardiomyopathy Associated with Diabetic Glomerulosclerosis." *The American Journal of Cardiology* 30 (6): 595–602. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4263660>.
- Ruderman, N B, S H Schneider, and P Berchtold. 1981. "The 'metabolically-Obese,' Normal-Weight Individual." *The American Journal of Clinical Nutrition* 34 (8): 1617–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7270486>.
- Ruderman, N, D Chisholm, X Pi-Sunyer, and S Schneider. 1998. "The Metabolically Obese, Normal-Weight Individual Revisited." *Diabetes* 47 (5): 699–713. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9588440>.
- Russo, G T, A Di Benedetto, E Alessi, R Ientile, A Antico, G Nicocia, R La Scala, E Di Cesare, G Raimondo, and D Cucinotta. 2006. "Mild Hyperhomocysteinemia and the Common C677T Polymorphism of Methylene Tetrahydrofolate Reductase Gene Are Not Associated with the Metabolic Syndrome in Type 2 Diabetes." *Journal of Endocrinological Investigation* 29 (3): 201–7. doi:10.1007/BF03345540.
- Salinari, S, a Bertuzzi, and S Asnaghi. 2009. "First-Phase Insulin Secretion Restoration and Differential Response to Glucose Load Depending on the Route of Administration in Type 2 Diabetic Subjects after Bariatric." *Diabetes ...* 32 (3). doi:10.2337/dc08-1314.
- Salinari, Serenella, Alessandro Bertuzzi, Caterina Guidone, Elena Previti, Francesco Rubino, and Geltrude Mingrone. 2013. "Insulin Sensitivity and Secretion Changes after Gastric Bypass in Normotolerant and Diabetic Obese Subjects." *Annals of Surgery* 257 (3): 462–68. doi:10.1097/SLA.0b013e318269cf5c.
- Samocha-Bonet, D, V D Dixit, C R Kahn, R L Leibel, X Lin, M Nieuwdorp, K H Pietiläinen, et al. 2014. "Metabolically Healthy and Unhealthy Obese--the 2013 Stock Conference Report." *Obesity Reviews: An*

- Saric, Jasmina, Yulan Wang, Jia Li, Muireann Coen, Jürg Utzinger, Julian R Marchesi, Jennifer Keiser, et al. 2008. "Species Variation in the Fecal Metabolome Gives Insight into Differential Gastrointestinal Function." *Journal of Proteome Research* 7 (1): 352–60. doi:10.1021/pr070340k.
- Sawaengsri, Hathairat, Peter R Bergethon, Wei Qiao Qiu, Tammy M Scott, Paul F Jacques, Jacob Selhub, and Ligi Paul. 2016. "Transcobalamin 776C→G Polymorphism Is Associated with Peripheral Neuropathy in Elderly Individuals with High Folate Intake." *The American Journal of Clinical Nutrition*, October. doi:10.3945/ajcn.116.139030.
- Sawan, Carla, and Zdenko Herceg. 2010. "Histone Modifications and Cancer." *Advances in Genetics* 70: 57–85. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4.
- Schaffer, S W. 1991. "Cardiomyopathy Associated with Noninsulin-Dependent Diabetes." *Molecular and Cellular Biochemistry* 107 (1): 1–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1664489>.
- Schlaich, Markus, Nora Straznicky, Elisabeth Lambert, and Gavin Lambert. 2015. "Metabolic Syndrome: A Sympathetic Disease?" *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 3 (2): 148–57. doi:10.1016/S2213-8587(14)70033-6.
- Selhub, J. 1999. "Homocysteine Metabolism." *Annual Review of Nutrition* 19: 217–46. doi:10.1146/annurev.nutr.19.1.217.
- Selhub, Jacob, Martha Savaria Morris, and Paul F Jacques. 2007. "In Vitamin B12 Deficiency, Higher Serum Folate Is Associated with Increased Total Homocysteine and Methylmalonic Acid Concentrations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (50): 19995–0. doi:10.1073/pnas.0709487104.
- Selhub, Jacob, and Irwin H Rosenberg. 2016. "Excessive Folic Acid Intake and Relation to Adverse Health Outcome." *Biochimie* 126 (July): 71–78. doi:10.1016/j.biochi.2016.04.010.
- Selhub, J, P F Jacques, P W Wilson, D Rush, and I H Rosenberg. 1993. "Vitamin Status and Intake as Primary Determinants of Homocysteinemia in an Elderly Population." *JAMA* 270 (22): 2693–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8133587>.
- Sharma, Shruti, and Stephen M Black. 2009. "CARNITINE HOMEOSTASIS, MITOCHONDRIAL FUNCTION, AND CARDIOVASCULAR DISEASE." *Drug Discovery Today. Disease Mechanisms* 6 (1–4): e31–39. doi:10.1016/j.ddmec.2009.02.001.
- Shimoura, Hiroyuki, Hidekazu Tanaka, Kensuke Matsumoto, Yasuhide Mochizuki, Yutaka Hatani, Keiko Hatazawa, Hiroki Matsuzoe, et al. 2016. "Effects of a Changeover from Other Angiotensin II Receptor Blockers to Olmesartan on Left Ventricular Hypertrophy in Heart Failure Patients." *Heart and Vessels*, October. doi:10.1007/s00380-016-0904-0.
- Shin, Na-Ri, June-Chul Lee, Hae-Youn Lee, Min-Soo Kim, Tae Woong Whon, Myung-Shik Lee, and Jin-Woo Bae. 2014. "An Increase in the Akkermansia Spp. Population Induced by Metformin Treatment Improves Glucose Homeostasis in Diet-Induced Obese Mice." *Gut* 63 (5): 727–35. doi:10.1136/gutjnl-2012-303839.
- Shoelson, Steven E, Jongsoon Lee, and Allison B Goldfine. 2006. "Inflammation and Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1793–1801. doi:10.1172/JCI29069.
- Shojania, A M, G Hornady, and P H Barnes. 1968. "Oral Contraceptives and Serum-Folate Level." *Lancet (London, England)* 1 (7556): 1376–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4172676>.
- Sinclair, Kevin D, Cinzia Allegrucci, Ravinder Singh, David S Gardner, Sonia Sebastian, Jayson Bispham, Alexandra Thurston, et al. 2007. "DNA Methylation, Insulin Resistance, and Blood Pressure in Offspring Determined by Maternal Periconceptional B Vitamin and Methionine Status." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49): 19351–56. doi:10.1073/pnas.0707258104.
- Smith, A David, Young-In Kim, and Helga Refsum. 2008. "Is Folic Acid Good for Everyone?" *The American Journal of Clinical Nutrition* 87 (3): 517–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326588>.
- Smith, A David, Helga Refsum, Jacob Selhub, and Irwin H Rosenberg. 2016. "Decision on Folic Acid Fortification in Europe Must Consider Both Risks and Benefits." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 352 (February): i734. doi:10.1136/bmj.i734.
- Snijder, M B, M Visser, J M Dekker, B H Goodpaster, T B Harris, S B Kritchevsky, N De Rekeneire, et al. 2005. "Low Subcutaneous Thigh Fat Is a Risk Factor for Unfavourable Glucose and Lipid Levels, Independently of High Abdominal Fat. The Health ABC Study." *Diabetologia* 48 (2): 301–8. doi:10.1007/s00125-004-1637-7.
- Sodjinou, Roger, Victoire Agueh, Benjamin Fayomi, and Hélène Delisle. 2008. "Obesity and Cardio-Metabolic Risk Factors in Urban Adults of Benin: Relationship with Socio-Economic Status, Urbanisation, and Lifestyle Patterns." *BMC Public Health* 8 (March): 84. doi:10.1186/1471-2458-8-84.

- Solé-Navais, Pol, Pere Cavallé-Busquets, Joan D. Fernandez-Ballart, and Michelle M. Murphy. 2016. "Early Pregnancy B Vitamin Status, One Carbon Metabolism, Pregnancy Outcome and Child Development." *Biochimie* 126: 91–96. doi:10.1016/j.biochi.2015.12.003.
- Song, Yiqing, Nancy R Cook, Christine M Albert, Martin Van Denburgh, and Joann E Manson. 2009. "Effect of Homocysteine-Lowering Treatment With Folic Acid and B Vitamins on Risk of Type 2 Diabetes in Women." *Diabetes* 58 (19): 1921–28. doi:10.2337/db09-0087.
- Sookoian, Silvia, Maria Soledad Rosselli, Carolina Gemma, Adriana L Burgueño, Tomas Fernández Gianotti, Gustavo O Castaño, and Carlos J Pirola. 2010. "Epigenetic Regulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Impact of Liver Methylation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α Promoter." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (6): 1992–2000. doi:10.1002/hep.23927.
- Sreckovic, Branko, Vesna Dimitrijevic Sreckovic, Ivan Soldatovic, Emina Colak, Mirjana Sumarac-Dumanovic, Hristina Janeski, Nenad Janeski, Jasna Gacic, and Igor Mrdovic. 2016. "Homocysteine Is a Marker for Metabolic Syndrome and Atherosclerosis." *Diabetes & Metabolic Syndrome*, August. doi:10.1016/j.dsx.2016.08.026.
- Stahl, Eli a, Daniel Wegmann, Gosia Trynka, Javier Gutierrez-Achury, Ron Do, Benjamin F Voight, Peter Kraft, et al. 2012. "Bayesian Inference Analyses of the Polygenic Architecture of Rheumatoid Arthritis." *Nature Genetics* 44 (5). Nature Publishing Group: 483–89. doi:10.1038/ng.2232.
- Steegers-Theunissen, Régine P, Sylvia A Obermann-Borst, Dennis Kremer, Jan Lindemans, Cissy Siebel, Eric A Steegers, P Eline Slagboom, and Bastiaan T Heijmans. 2009. "Periconceptional Maternal Folic Acid Use of 400 Microg per Day Is Related to Increased Methylation of the IGF2 Gene in the Very Young Child." *PloS One* 4 (11): e7845. doi:10.1371/journal.pone.0007845.
- Stern, M. P, K Williams, C Gonzalez-Villalpando, K. J Hunt, and S. M Haffner. 2004. "Does the Metabolic Syndrome Improve Identification of Individuals at Risk of Type 2 Diabetes and / or Cardiovascular Disease?" *Diabetes Care* 27 (11): 2676–81. doi:10.2337/diacare.27.11.2676.
- Stewart, C P, P Christian, K J Schulze, M Arguello, S C LeClerq, S K Khattri, and K P West. 2011. "Low Maternal Vitamin B-12 Status Is Associated with Offspring Insulin Resistance regardless of Antenatal Micronutrient Supplementation in Rural Nepal." *Journal of Nutrition* 141 (10): 1912–17. doi:10.3945/jn.111.144717.
- Stewart, Christine P, Parul Christian, Kerry J Schulze, Margia Arguello, Steven C LeClerq, Subarna K Khattri, and Keith P West. 2011. "Low Maternal Vitamin B-12 Status Is Associated with Offspring Insulin Resistance regardless of Antenatal Micronutrient Supplementation in Rural Nepal." *The Journal of Nutrition* 141 (10): 1912–17. doi:10.3945/jn.111.144717.
- Sturm, R, and A Hattori. 2013a. "Morbid Obesity Rates Continue to Rise Rapidly in the United States." *International Journal of Obesity (2005)* 37 (6). Nature Publishing Group: 889–91. doi:10.1038/ijo.2012.159.
- Sturm, Roland. 2003. "Increases in Clinically Severe Obesity in the United States, 1986-2000." *Archives of Internal Medicine* 163 (18): 2146–48. doi:10.1001/archinte.163.18.2146.
- Subichin, Michael, Jesse Clanton, Marta Makuszewski, Ashley Bohon, John G Zografakis, and Adrian Dan. 2015. "Liver Disease in the Morbidly Obese: A Review of 1000 Consecutive Patients Undergoing Weight Loss Surgery." *Surgery for Obesity and Related Diseases : Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery* 11 (1): 137–41. doi:10.1016/j.soard.2014.06.015.
- Sudchada, Patcharaporn, Surasak Saokaew, Sorattaya Sridetch, Siriwan Incampa, Sopida Jaiyen, and Warangkana Khaithong. 2012. "Effect of Folic Acid Supplementation on Plasma Total Homocysteine Levels and Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Diabetes Research and Clinical Practice* 98 (1): 151–58. doi:10.1016/j.diabres.2012.05.027.
- Suhre, Karsten, and Christian Gieger. 2012. "Genetic Variation in Metabolic Phenotypes: Study Designs and Applications." *Nature Reviews. Genetics* 13 (11): 759–69. doi:10.1038/nrg3314.
- Summers, Scott A. 2006. "Ceramides in Insulin Resistance and Lipotoxicity." *Progress in Lipid Research* 45 (1): 42–72. doi:10.1016/j.plipres.2005.11.002.
- Tabassum, Rubina, Alok Jaiswal, Ganesh Chauhan, Om Prakash Dwivedi, Saurabh Ghosh, Raman K Marwaha, Nikhil Tandon, and Dwaipayan Bharadwaj. 2012. "Genetic Variant of AMD1 Is Associated with Obesity in Urban Indian Children." *PloS One* 7 (4): e33162. doi:10.1371/journal.pone.0033162.
- Taniguchi, Cullen M., Brice Emanuelli, and C. Ronald Kahn. 2006. "Critical Nodes in Signalling Pathways: Insights into Insulin Action." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2): 85–96. doi:10.1038/nrm1837.
- Tchernof, André, and Jean-Pierre Després. 2013. "Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update." *Physiological Reviews* 93 (1): 359–404. doi:10.1152/physrev.00033.2011.
- Thürmann, P A, P Kenedi, A Schmidt, S Harder, and N Rietbrock. 1998. "Influence of the Angiotensin II Antagonist Valsartan on Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Essential Hypertension." *Circulation* 98 (19): 2037–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808602>.

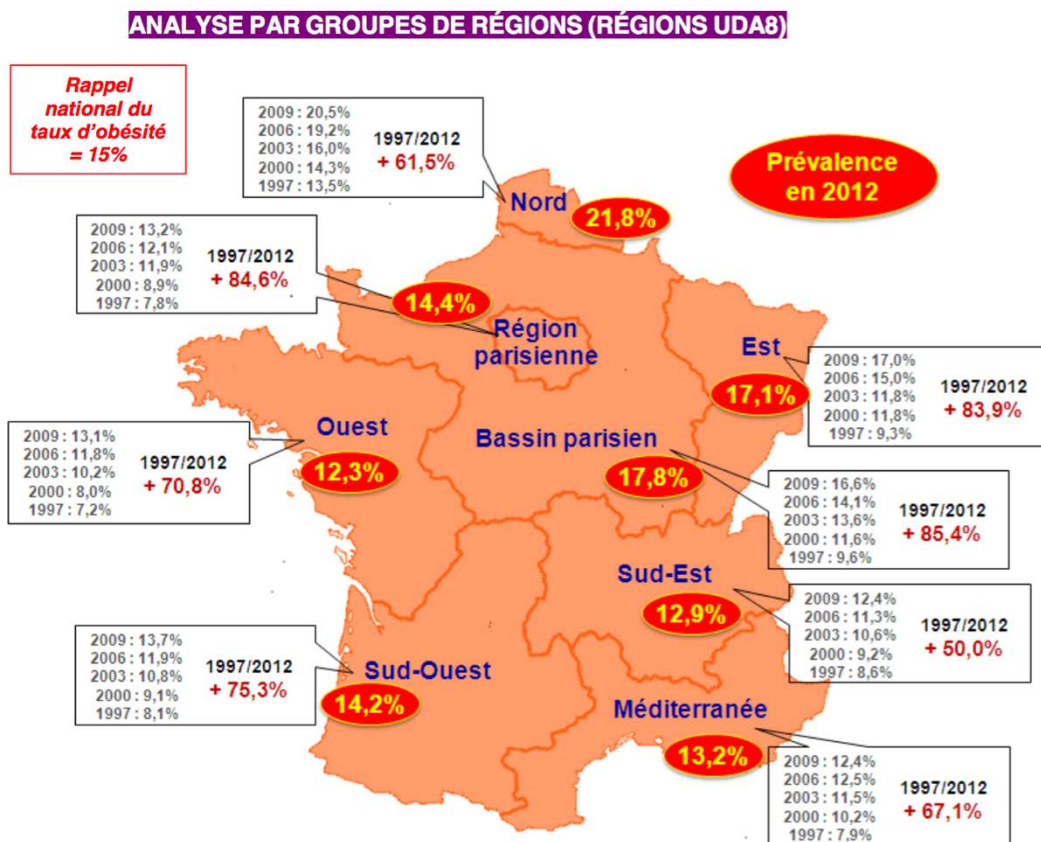
- Tran, A, B Gelaye, B Girma, S Lemma, Y Berhane, T Bekele, A Khali, and M A Williams. 2011. "Prevalence of Metabolic Syndrome among Working Adults in Ethiopia." *International Journal of Hypertension* 2011: 193719. doi:10.4061/2011/193719.
- Tremaroli, Valentina, and Fredrik Bäckhed. 2012. "Functional Interactions between the Gut Microbiota and Host Metabolism." *Nature* 489 (7415): 242–49. doi:10.1038/nature11552.
- Tryndyak, Volodymyr P., Tao Han, Levan Muskhelishvili, James C. Fuscoe, Sharon A. Ross, Frederick A. Beland, and Igor P. Pogribny. 2011. "Coupling Global Methylation and Gene Expression Profiles Reveal Key Pathophysiological Events in Liver Injury Induced by a Methyl-Deficient Diet." *Molecular Nutrition and Food Research* 55 (3): 411–18. doi:10.1002/mnfr.201000300.
- Tsuprykov, Oleg, Lyubov Chaykovska, Axel Kretschmer, Johannes-Peter Stasch, Thiemo Pfab, Katharina Krause-Relle, Christoph Reichetzeder, Philipp Kalk, Jerzy Adamski, and Berthold Hocher. 2015. "Endothelin-1 Overexpression Improves Renal Function in eNOS Knockout Mice." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 37 (4): 1474–90. doi:10.1159/000438516.
- Tsuruda, Toshihiro, Guido Boerrigter, Brenda K Huntley, Josh A Noser, Alessandro Cataliotti, Lisa C Costello-Boerrigter, Horng H Chen, and John C Burnett. 2002. "Brain Natriuretic Peptide Is Produced in Cardiac Fibroblasts and Induces Matrix Metalloproteinases." *Circulation Research* 91 (12): 1127–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480813>.
- Turnbaugh, Peter J, Fredrik Bäckhed, Lucinda Fulton, and Jeffrey I Gordon. 2008. "Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome." *Cell Host & Microbe* 3 (4): 213–23. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015.
- Turnbaugh, Peter J, Ruth E Ley, Michael A Mahowald, Vincent Magrini, Elaine R Mardis, and Jeffrey I Gordon. 2006. "An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest." *Nature* 444 (7122): 1027–31. doi:10.1038/nature05414.
- Uchil, Deepa, D Pipalia, M Chawla, R Patel, Sonali Maniar, Narayani, and Archana Juneja. 2009. "Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)--the Hepatic Component of Metabolic Syndrome." *The Journal of the Association of Physicians of India* 57 (March): 201–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19588647>.
- Unwin, Nigel, Delice Gan, and David Whiting. 2010. "The IDF Diabetes Atlas: Providing Evidence, Raising Awareness and Promoting Action." *Diabetes Research and Clinical Practice* 87 (1): 2–3. doi:10.1016/j.diabres.2009.11.006.
- Van den Veyver, Ignatia B. 2002. "Genetic Effects of Methylation Diets." *Annual Review of Nutrition* 22: 255–82. doi:10.1146/annurev.nutr.22.010402.102932.
- Vioigt, M N, J D Clarke, A V Jain, J C Ayres, P E Koehler, and R C Hatch. 1981. "Abnormal Concentrations of B Vitamins and Amino Acids in Plasma and B Vitamins in Bile of Rabbits with Aflatoxicosis." *Applied and Environmental Microbiology* 41 (4): 919–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6786221>.
- Virtue, Sam, and Antonio Vidal-Puig. 2010. "Adipose Tissue Expandability, Lipotoxicity and the Metabolic Syndrome - An Allostatic Perspective." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801 (3). Elsevier B.V.: 338–49. doi:10.1016/j.bbalip.2009.12.006.
- Vors, C??cile, Ga??lle Pineau, Jocelyne Draï, Emmanuelle Meugnier, Sandra Pesenti, Martine Laville, Fabienne Laugerette, Corinne Malpuech-Brug??re, Hubert Vidal, and Marie Caroline Michalski. 2015. "Postprandial Endotoxemia Linked with Chylomicrons and Lipopolysaccharides Handling in Obese versus Lean Men: A Lipid Dose-Effect Trial." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100 (9): 3427–35. doi:10.1210/jc.2015-2518.
- Voulgari, Christina, Dimitrios Papadogiannis, and Nicholas Tentolouris. 2010. "Diabetic Cardiomyopathy: From the Pathophysiology of the Cardiac Myocytes to Current Diagnosis and Management Strategies." *Vascular Health and Risk Management* 6: 883–903. doi:10.2147/VHRM.S11681.
- Wajchenberg, B L. 2000. "Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome." *Endocrine Reviews* 21 (6): 697–738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415.
- Waly, Mostafa I, Kusum K Kharbanda, and Richard C Deth. 2011. "Ethanol Lowers Glutathione in Rat Liver and Brain and Inhibits Methionine Synthase in a Cobalamin-Dependent Manner." *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 35 (2): 277–83. doi:10.1111/j.1530-0277.2010.01343.x.
- Wang, Jianxun, Ye Song, Qianwen Wang, Patricia M Kralik, and Paul N Epstein. 2006. "Causes and Characteristics of Diabetic Cardiomyopathy." *The Review of Diabetic Studies: RDS* 3 (3): 108–17. doi:10.1900/RDS.2006.3.108.
- Wang, Meijing, Paul R Crisostomo, Troy A Markel, Yue Wang, and Daniel R Meldrum. 2008. "Mechanisms of Sex Differences in TNFR2-Mediated Cardioprotection." *Circulation* 118 (14 Suppl): S38-45. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.756890.

- Wang, Zeneng, Elizabeth Klipfell, Brian J Bennett, Robert Koeth, Bruce S Levison, Brandon Dugar, Ariel E Feldstein, et al. 2011. "Gut Flora Metabolism of Phosphatidylcholine Promotes Cardiovascular Disease." *Nature* 472 (7341): 57–63. doi:10.1038/nature09922.
- Wanless, I R, and J S Lentz. 1990. "Fatty Liver Hepatitis (Steatohepatitis) and Obesity: An Autopsy Study with Analysis of Risk Factors." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 12 (5): 1106–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2227807>.
- Ware, Bruce, Marie Bevier, Yoshinori Nishijima, Suzanne Rogers, Cynthia A Carnes, and Véronique A Lacombe. 2011. "Chronic Heart Failure Selectively Induces Regional Heterogeneity of Insulin-Responsive Glucose Transporters." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301 (5): R1300–6. doi:10.1152/ajpregu.00822.2010.
- Warram, J H, B C Martin, a S Krolewski, J S Soeldner, and C R Kahn. 1990. "Slow Glucose Removal Rate and Hyperinsulinaemia Precede the Development of Type II Diabetes in the Offspring of Diabetic Patients." *Ann Inter Med* 113: 909–15. doi:10.1059/0003-4819-113-12-909.
- Waterland, Robert A, and Randy L Jirtle. 2003. "Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation." *Molecular and Cellular Biology* 23 (15): 5293–5300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861015>.
- Waterland, Robert A, and Karin B Michels. 2007. "Epigenetic Epidemiology of the Developmental Origins Hypothesis." *Annual Review of Nutrition* 27: 363–88. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705.
- Weikert, Cornelia, Norbert Stefan, Matthias B Schulze, Tobias Pischon, Klaus Berger, Hans-Georg Joost, Hans-Ulrich Häring, Heiner Boeing, and Andreas Fritsche. 2008. "Plasma Fetuin-a Levels and the Risk of Myocardial Infarction and Ischemic Stroke." *Circulation* 118 (24): 2555–62. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814418.
- Weir, Gordon C., David Ross Laybutt, Hideaki Kaneto, Susan Bonner-Weir, and Arun Sharma. 2001. "Beta-Cell Adaptation and Decompensation During the Progression of Diabetes." *Diabetes* 50 (SUPPL. 1). doi:10.2337/diabetes.50.2007.S154.
- Wendel, U. 1989. "Abnormality of Odd-Numbered Long-Chain Fatty Acids in Erythrocyte Membrane Lipids from Patients with Disorders of Propionate Metabolism." *Pediatric Research* 25 (2): 147–50. doi:10.1203/00006450-198902000-00014.
- WHO. 2013. "World Health Organization (WHO) , Fact Sheet No.311.2013. Media Center; Obesity and Overweight." *WHO*. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Witteles, Ronald M, and Michael B Fowler. 2008. "Insulin-Resistant Cardiomyopathy Clinical Evidence, Mechanisms, and Treatment Options." *Journal of the American College of Cardiology* 51 (2): 93–102. doi:10.1016/j.jacc.2007.10.021.
- Wolff, George L., Ralph L. Kodell, Stephen R. Moore, and Craig A. Cooney. 1998. "Maternal Epigenetics and Methyl Supplements Affect Agouti Gene Expression in Avy/a Mice." *Faseb J.* 12 (11): 949–57. <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/12/11/949> \nabout:blank \nhttp://www.fasebj.org/cgi/content/full/12/11/949.
- Wolk, A, M Furuheim, and B Vessby. 2001. "Fatty Acid Composition of Adipose Tissue and Serum Lipids Are Valid Biological Markers of Dairy Fat Intake in Men." *The Journal of Nutrition* 131 (3): 828–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238766>.
- Wong, Aaron K F, Matlooba A AlZadjali, Anna-Maria J Choy, and Chim C Lang. 2008. "Insulin Resistance: A Potential New Target for Therapy in Patients with Heart Failure." *Cardiovascular Therapeutics* 26 (3): 203–13. doi:10.1111/j.1755-5922.2008.00053.x.
- Y. Wu. 2006. "Overweight and Obesity in China." *BMJ* 62 (12): 333–62. doi:10.1136/bmj.38938.412593.80.
- Yajnik, C S, S S Deshpande, A A Jackson, H Refsum, S Rao, D J Fisher, D S Bhat, et al. 2008. "Vitamin B12 and Folate Concentrations during Pregnancy and Insulin Resistance in the Offspring: The Pune Maternal Nutrition Study." *Diabetologia* 51 (1): 29–38. doi:10.1007/s00125-007-0793-y.
- Yajnik, Chittaranjan S., Giriraj R. Chandak, Charudatta Joglekar, Prachi Katre, Dattatray S. Bhat, Suraj N. Singh, Charles S. Janipalli, et al. 2014. "Maternal Homocysteine in Pregnancy and Offspring Birthweight: Epidemiological Associations and Mendelian Randomization Analysis." *International Journal of Epidemiology* 43 (5): 1487–97. doi:10.1093/ije/dyu132.
- Yajnik, Chittaranjan Sakerlal, and Urmila Shailesh Deshmukh. 2012. "Fetal Programming: Maternal Nutrition and Role of One-Carbon Metabolism." *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 13 (2): 121–27. doi:10.1007/s11154-012-9214-8.
- Yang, Ivana V., and David A. Schwartz. 2011. "Epigenetic Control of Gene Expression in the Lung." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (10): 1295–1301. doi:10.1164/rccm.201010-1579PP.

- Yusuf, Salim, and Sonia Anand. 2011. "Body-Mass Index, Abdominal Adiposity, and Cardiovascular Risk." *The Lancet* 378 (9787). Elsevier Ltd: 226–27. doi:10.1016/S0140-6736(11)61120-3.
- Zhang, Yanan, Chengwei Song, Haiou Li, Jingdong Hou, and Dongliang Li. 2016. "Ursolic Acid Prevents Augmented Peripheral Inflammation and Inflammatory Hyperalgesia in High-Fat Diet-Induced Obese Rats by Restoring Downregulated Spinal PPAR α ." *Molecular Medicine Reports* 13 (6): 5309–16. doi:10.3892/mmr.2016.5172.
- Zhou, ShiSheng, Da Li, Na-Na Chen, and Yiming Zhou. 2015. "Vitamin Paradox in Obesity: Deficiency or Excess?" *World Journal of Diabetes* 6 (10): 1158–67. doi:10.4239/wjd.v6.i10.1158.
- Zhou, Xinli, Lixin Ma, Javad Habibi, Adam Whaley-Connell, Melvin R Hayden, Roger D Tilmon, Ashley N Brown, Jeong-A Kim, Vincent G Demarco, and James R Sowers. 2010. "Nebivolol Improves Diastolic Dysfunction and Myocardial Remodeling through Reductions in Oxidative Stress in the Zucker Obese Rat." *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 55 (4): 880–88. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.145136.
- Zhou, Yan, Suxian Lin, Lihe Zhang, and Yongji Li. 2016. "Resveratrol Prevents Renal Lipotoxicity in High-Fat Diet-Treated Mouse Model through Regulating PPAR- α Pathway." *Molecular and Cellular Biochemistry* 411 (1–2): 143–50. doi:10.1007/s11010-015-2576-y.

7. Annexes

7.1. Annexe 1. Prévalence de l'obésité par région et son évolution depuis 1997. (Modifié d'après ObEpi 2012)



7.2. Annexe 2. Apports nutritionnels journalières en folates

Tableau supplémentaire 1. Apports nutritionnels conseillés journalières (ANCJ) en folates (ug/j) pour la population française. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec &Doc.

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

7.3. Annexe 3. Apports nutritionnels journalières en Vitamine B12

Tableau supplémentaire 2. Apports nutritionnel conseillés journalière(ANCJ) en Vitamine B12 (ug/j) pour la population française. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 3ème édition, Ed. Tec &Doc.

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

7.4. Annexe 4. Protocole enregistré à clinicaltrials.gov

ClinicalTrials.gov Protocol and Results Registration System (PRS) Receipt
Release Date: 01/20/2016

ClinicalTrials.gov ID: NCT02663388

Study Identification

Unique Protocol ID: 2015-A01175-44

Brief Title: Epigenetic Mechanisms and Severe Obesity (Biological Tissue Collection) (OBESEPI)

Official Title: Influence of Vitamins Status on Severe Obesity Related Complications

Secondary IDs:

Study Status

Record Verification: January 2016

Overall Status: Recruiting

Study Start: January 2016

Primary Completion: January 2026 [Anticipated]

Study Completion:

Sponsor/Collaborators

Sponsor: University of Lorraine

Responsible Party: Principal Investigator

Investigator: Laurent Brunaud [lbrunaud]

Official Title: Pr Laurent BRUNAUD, MD, PhD

Affiliation: University of Lorraine

Collaborators:

Oversight

FDA Regulated?: No

IND/IDE Protocol?: No

Review Board: Approval Status: Approved

Approval Number: PSS 2015/OBESEPI-BRUNAUD/MS

Board Name: DRI - Direction Recherche et Innovation

Board Affiliation: CHU Nancy

Phone:

Email: m.starck@chu-nancy.fr

Data Monitoring?:

Plan to Share Data?:

Oversight Authorities: France: CPP Est III le 29/09/2015

France: ANSM le 10/08/2015

Study Description

Brief Summary: The purpose of this study is to evaluate the role of vitamins status, epigenetic mechanisms on severe obesity related-complications.

Detailed Description:

Conditions

Conditions: Obesity
Diabetes
Metabolic Diseases
Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Keywords:

Study Design

Study Type: Observational [Patient Registry]

Observational Study Model: Cohort

Time Perspective: Prospective

Biospecimen Retention: Samples With DNA

Biospecimen Description: blood, liver, fat tissue (subcutaneous, visceral, mesenteric), small bowel, feces

Enrollment: 20000 [Anticipated]

Number of Groups/Cohorts: 1

Target Follow-Up Duration: 10 Years

Groups and Interventions

Intervention Details:

Procedure/Surgery: gastric bypass, sleeve, gastric banding

Outcome Measures

Primary Outcome Measure:

1. Evaluation of folate mediated one-carbon metabolic pathway parameters (Folates, Vitamin B12, Methionine, Homocysteine) on severe obesity-related complications before and after bariatric surgery
[Time Frame: 10 years] [Safety Issue: No]

Secondary Outcome Measure:

2. Evaluation of DNA Methylation on severe obesity-related complications before and after bariatric surgery
[Time Frame: 10 years] [Safety Issue: No]

Eligibility

Study Population: Patients who undergo bariatric surgery following french national guidelines (HAS 2009)

Sampling Method: Non-Probability Sample

Minimum Age: 18 Years

Maximum Age: 65 Years

Gender: Both

Accepts Healthy Volunteers?: Yes

Criteria: Inclusion Criteria:

- indication for bariatric surgery with BMI > 35 kg/m2

Exclusion Criteria:

- unable to receive clear information
- refusal to sign the consent form

Contacts/Locations

Central Contact: Laurent BRUNAUD, MD, PhD

Email: l.brunaud@chu-nancy.fr

Central Contact Backup: laurent BRUNAUD, MD, PhD

Email: l.brunaud@chu-nancy.fr

Study Officials: laurent BRUNAUD, MD, PhD

Study Principal Investigator

University of Lorraine, CHU Nancy

Locations: France

University of Lorraine, CHU Nancy

[Recruiting]

Vandoeuvre Les Nancy, France, 54511

Contact: laurent brunaud l.brunaud@chu-nancy.fr

Contact: laurent brunaud

References

Citations:

Links:

Study Data/Documents:

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet

Received: 09 March 2016
Accepted: 13 October 2016
Published: 17 November 2016

Anaïs Bison, Aude Marchal-Bressenot, Zhen Li, Illef Elamouri, Eva Feigerlova, Lu Peng, Remi Houlgatte, Bernard Beck, Gregory Pourié, Jean-Marc Alberto, Remy Umoret, Guillaume Conroy, Jean-Pierre Bronowicki, Jean-Louis Guéant* & Rosa-Maria Guéant-Rodriguez*

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a manifestation of metabolic syndrome, which emerges as a major public health problem. Deficiency in methyl donors (folate and vitamin B12) during gestation and lactation is frequent in humans and produces foetal programming effects of metabolic syndrome, with small birth weight and liver steatosis at day 21 (d21), in rat pups. We investigated the effects of fetal programming on liver of rats born from deficient mothers (IMDD) and subsequently subjected to normal diet after d21 and high fat diet (HF) after d50. We observed increased abdominal fat, ASAT/ALAT ratio and angiotensin blood level, but no histological liver abnormality in d50 IMDD rats. In contrast, d185 IMDD/HF animals had hallmarks of steato-hepatitis, with increased markers of inflammation and fibrosis (caspase1, cleaved IL-1 β , α 1(I) and α 2(I) collagens and α -SMA), insulin resistance (HOMA-IR and Glut 2) and expression of genes involved in stellate cell stimulation and remodelling and key genes triggering NASH pathomechanisms (transforming growth factor beta super family, angiotensin and angiotensin receptor type 1). Our data showed a foetal programming effect of MDD on liver inflammation and fibrosis, which suggests investigating whether MDD during pregnancy is a risk factor of NASH in populations subsequently exposed to HF diet.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a major consequence of central obesity and metabolic syndrome, with a spectrum that ranges from simple steatosis to steatohepatitis (NASH). The metabolic syndrome is a cluster of components, which includes abdominal obesity, high triglycerides and insulin resistance. NASH is considered as a visceral manifestation of metabolic syndrome, which emerges as one of the major public health problem, in the context of the epidemic of severe obesity in Western countries¹. It results from complex mechanisms, which trigger steatosis, inflammation, cellular stress and remodelling of liver tissue². The concept of developmental origins of health and disease (DOHaD) considers that the foetal programming during pregnancy and early post-natal life has a long-term impact on the risk of central obesity and other components of metabolic syndrome. This concept is now evidenced by many experimental and epidemiological studies³. However, little is known on the influence of nutritional conditions during pregnancy and the subsequent post-natal risk of NAFLD and more specifically of NASH.

Over the past decade, epidemiological and experimental studies have clearly demonstrated an association between nutritional metabolites of the one carbon metabolism (1-CM) and manifestations of foetal programming³. Cellular methionine originates from the remethylation pathway of homocysteine by methionine synthase, which uses vitamin B12 (methyl-cobalamin) as a cofactor. The deficit in methyl donors, in particular folate and vitamin B12 leads to decreased synthesis of S-adenosylmethionine (SAM), the methyl donor involved in methylation of DNA and proteins, which regulate gene expression, including histones, nuclear receptors and their co-regulators³.

Inserm U954, Nutrition-Genetics-Environmental Risk Exposure (N-GERE), University of Lorraine, BP 184, 54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-L.G. (email: jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr) or R.-M.G.-R. (email: rosa-maria.gueant-rodriguez@univ-lorraine.fr)

Recent large epidemiological studies have shown that 1-CM markers and methyl donor deficiency (MDD) during pregnancy influence the risk of small birth weight and subsequent events related to foetal programming, including metabolic syndrome and insulin resistance. Studies in India and Nepal found vitamin B12 deficiency during pregnancy to be the most significant predictor of small birth weight, abdominal fat and insulin resistance in children aged 6 to 8 years^{4–6}. A variant of SAM decarboxylase was associated with childhood obesity, in another Indian study⁷. In addition, the rates of methylation of homocysteine and transmethylation of methionine were significantly lower in 15 subjects with NASH compared with 19 healthy age-matched controls⁸. Experimental models have also highlighted the influence of methyl donors, vitamin B12 and folate on foetal programming and related components of metabolic syndrome. We showed that deficiency in folate and vitamin B12 during gestation and lactation of rat dams produces small birth weight, increased central fat mass, liver steatosis and cardiac hypertrophy in pups^{9,10}. The liver steatosis resulted from impaired fatty acid β -oxidation and impaired energy metabolism. It was reversible when animals were fed subsequently a normal diet. The underlying molecular mechanisms were linked to the hypomethylation of PGC1- α and the subsequent dysregulation of its interaction with nuclear receptors, ER α , PPARs, ERR α and HNF-4. Consistently, another study showed that the lack of PPAR- α enhanced steatohepatitis, while PPAR- α agonist had the opposite effect, in a transgenic mice model¹¹. In addition, a study of liver biopsies from NAFLD patients showed that the methylation of PGC1- α promoter was linked to HOMA-IR and plasma fasting insulin levels¹². Recently, we analyzed the profile of the liver transcriptome and methylome of 21-day pups from rat dams with deficiency in folate and vitamin B12 during gestation and lactation¹³. Changes in both gene expression and DNA methylation were limited to 266 genes, most of which participated in pathomechanisms of NASH. It is noticeable that methyl donor supplementation protects from liver steatosis in rats fed a high fat-sucrose diet, in contrast to the risk associated with MDD¹⁴.

In summary, MDD during pregnancy predicts central obesity and insulin resistance in children and produces liver steatosis through dysregulations of fatty acid oxidation in pups from rat females subjected to deficiency during gestation and lactation. Whether a foetal programming effect of MDD influences the subsequent risk of NASH remains unknown. In this study, we evaluated the foetal programming effects of MDD on the risk of NASH in rats subjected subsequently to normal diet during the post-weaning period and high-fat (HF) diet between day (D)50 and D185 of adult life.

Results

Rats born from dams with MDD diet during pregnancy and lactation and subjected to HF diet after D50 had increased abdominal fat and ASAT/ALAT ratio at D50 and biochemical and histological hallmarks of NASH at D185. Dams were subjected either to an MDD diet (iMDD) or a control diet during pregnancy and lactation and pups received a normal diet after weaning, between D21 and D50. The respective weight of Controls and MDD mothers at D14 of gestation was 214.7 ± 5.5 g and 149.9 ± 7.1 g, ($p = 0.0034$). We reported 14.4 ± 1.3 and 7.3 ± 1.6 pups in Controls and MDD litters, respectively ($p = 0.0150$) and a sex ratio (males vs females) of 1.66 and 0.70, respectively ($p = 0.0165$). We found no litter effect on size and weight of pups from each group. The iMDD rats had no change of body weight/liver weight ratio, compared to control animals (Fig. 1A). In contrast, they had a central obesity reflected by an increased ratio abdominal/body fat, in DEXA examination (Fig. 1A,C). Plasma concentration of homocysteine was lower and ASAT/ALAT ratio was higher in iMDD rats at D50, compared to control animals (Fig. 2A,B). MMA, triglycerides, cholesterol and free fatty acids concentration were similar to those of control animals (Fig. 2A). Histological examination of liver tissues stained by HES, Masson's trichrome and Sirius Red showed no difference between iMDD and controls and absence of steatosis (Fig. 3A). Taken together, the increase of abdominal fat and ASAT/ALAT ratio was consistent with a foetal programming effect of MDD during pregnancy and lactation, in iMDD rats subjected to a normal diet between D21 and D50. This led us to investigate whether this foetal programming effect could subsequently aggravate the consequences of a high fat diet in the liver of iMDD rats, between D50 and D185. The four groups, control, control/HF, iMDD and iMDD/HF had a similar body weight/liver weight ratio. The control/HF and iMDD/HF had an increased ratio of abdominal/body fat determined by DEXA examination compared to their respective control groups (Fig. 1C). The HF diet did not increase the blood concentration of triglycerides and cholesterol of iMDD/HF rats. In contrast, it produced a 6-fold increase of ASAT/ALAT ratio (Fig. 2B), an increased concentration of free fatty acids (Fig. 2C) and an increase of SAM/SAH ratio (6.5 ± 0.7 versus 4.1 ± 0.3 , $p < 0.01$). Histological analysis of the livers from iMDD/HF rats showed a much more dramatic steatosis, compared to control/HF and iMDD, with a high density of lipid droplets in the cytoplasm of hepatocytes (Fig. 3B). The steatosis was accompanied by a slight fibrosis only in iMDD/HF rats, in histological examination of liver tissues stained by Masson's trichrome (Fig. 3B). Consistently, the liver of iMDD/HF rats expressed higher protein level of $\alpha 1(I)$ collagen, $\alpha 2(I)$ collagen and α -SMA, compared to iMDD rats and control/HF rats (Fig. 4A,B). Taken together these data showed that HF produced hallmarks of NASH in iMDD/HF rats, which were not observed in D50 iMDD rats, D50 control and D185 control/HF animals. This led us to investigate the mechanisms related to NASH, including the expression of genes involved in metabolism dysregulation, inflammation, remodeling and fibrosis.

iMDD/HF rats had insulin resistance and impaired expression of genes involved in metabolism regulation. The iMDD/HF animals had a 1.8-fold and 1.4-fold increase of HOMA-IR, when comparing them to iMDD and D185 control/HF rats, respectively (Fig. 5A). Consistently, Glut 2 protein expression of iMDD/HF animals was increased in a much greater extent than in control/HF rats, when comparing the two groups to their respective control groups (Fig. 5B,C). We observed a decreased protein expression of ER- α , ERR- α and PPAR- α in D50 iMDD rats (Fig. 6A). The subsequent exposure to HF diet produced an increased expression of PGC1- α and PPAR- α and a decreased protein expression of ER- α and HNF-4 α in control/HF and iMDD/HF rats, suggesting an adaptive regulation of energy metabolism to HF diet (Fig. 6A). We subsequently investigated

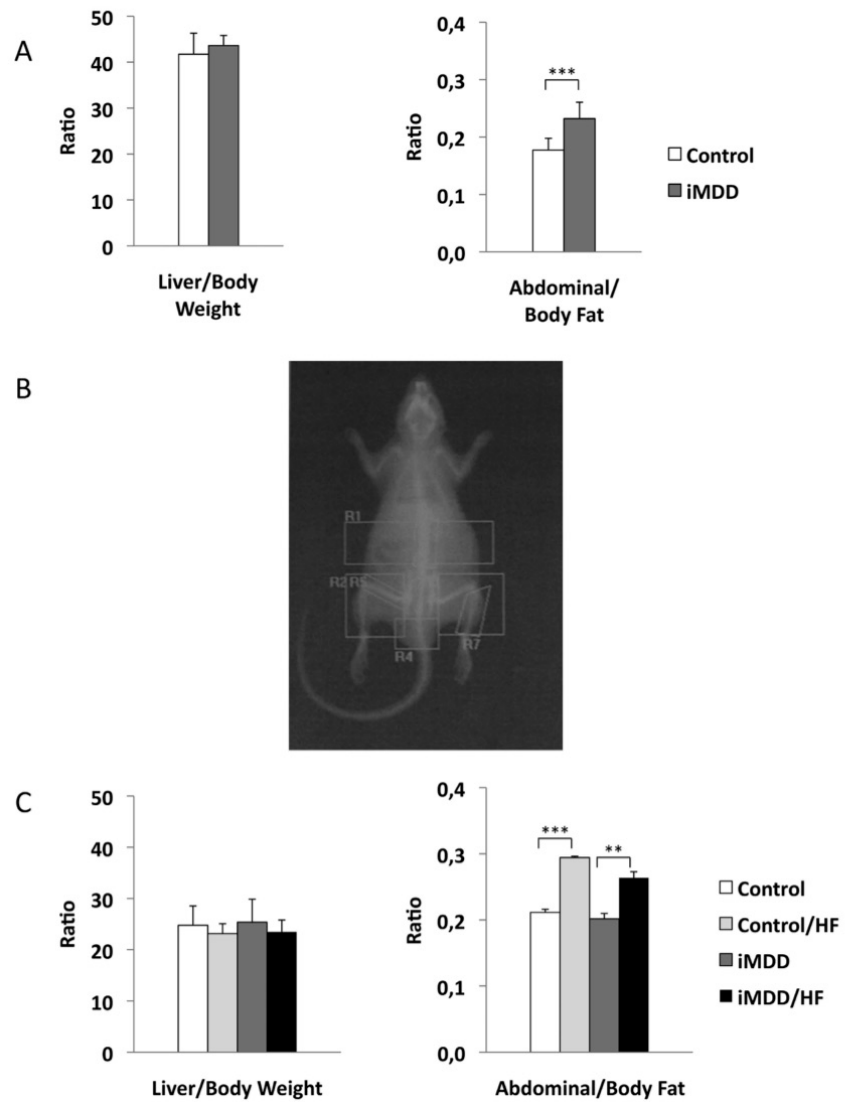


Figure 1. Biophysical features of D50 and D185 rats. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) Body weight/liver weight ratio was similar in iMDD, compared to control D50 animals. In contrast, the ratio of abdominal/body fat determined by DEXA was greater. (B) Example of DEXA examination in an iMDD animal. (C) The liver weight/body weight ratio were similar in iMDD/HF, compared to control D185 animals. In contrast, the ratio of abdominal/body fat determined by DEXA was greater, as observed in D50 animals. Data are reported as means $\pm$ SD ($n = 8$ in each group), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

the expression of proteins involved in liver import of free fatty acids. MSR1 was significantly increased compared to other groups. A same trend was observed for CD36, FATP2 and FATP5, but these changes did not reach significance (Fig. 6B).

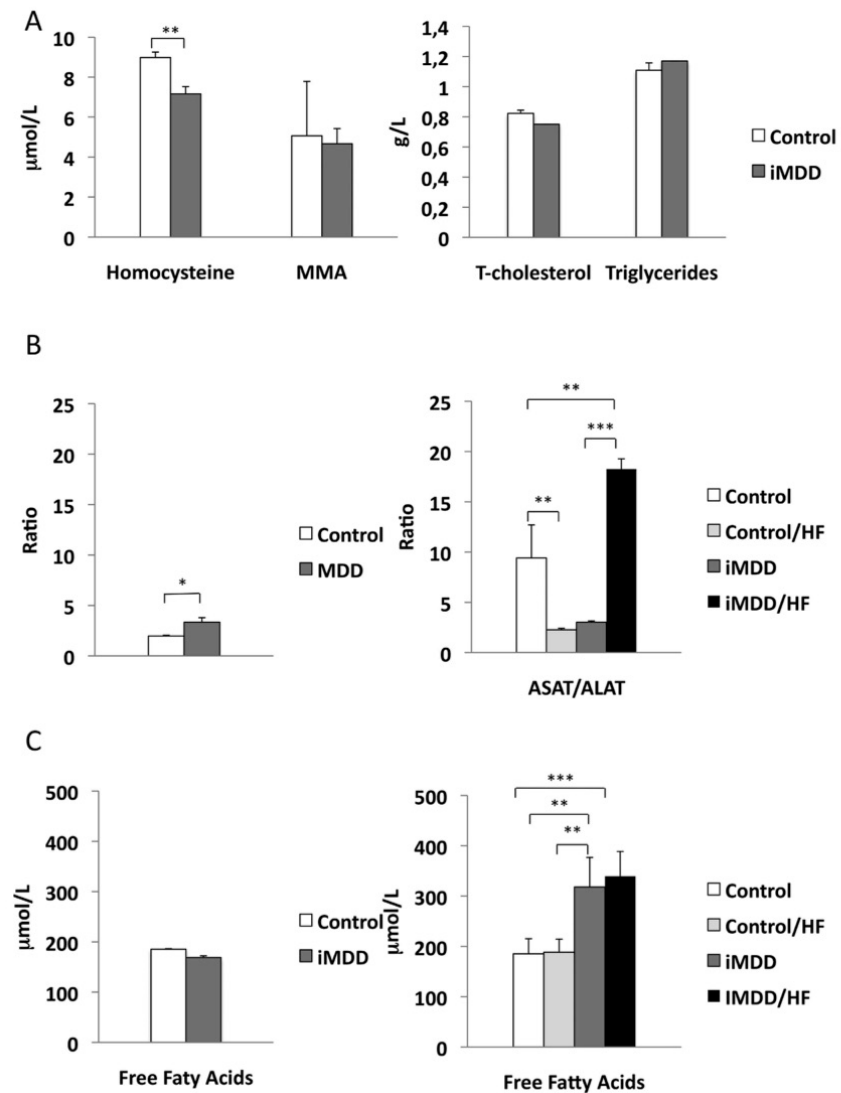


Figure 2. Biochemical parameters of D50 and D185 rats. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) Plasma concentrations of methylmalonic acid (MMA), homocysteine, triglycerides and cholesterol of iMDD rats were similar to those of control animals. (B) ASAT/ALAT ratio of iMDD D50 and iMDD/HF D185 rats were increased, compared to the respective control animals. (C) Free fatty acids concentration among groups was similar at D50. At D185 the free fatty acid concentration was higher in iMDD and iMDD/HF groups, compared to their respective control groups. Data are reported as means $\pm$ SD (n = 8 in each group), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Liver fibrosis was related to activation of inflammasome and fibrogenic pathways in RT-PCR array analysis of iMDD/HF liver rats. We used a RT-qPCR array to perform the quantitative analysis of transcripts from genes related to inflammation, fibrosis and remodelling pathways. Gene expression in liver tissue from iMDD/HF rats was compared to that in control, control/HF and iMDD animals. The predominant changes (fold change higher than 2) were observed with *Ccl11*, *Cxcr4*, *Il1b* and *Il1a* among proinflammatory genes, *Nfkb1*

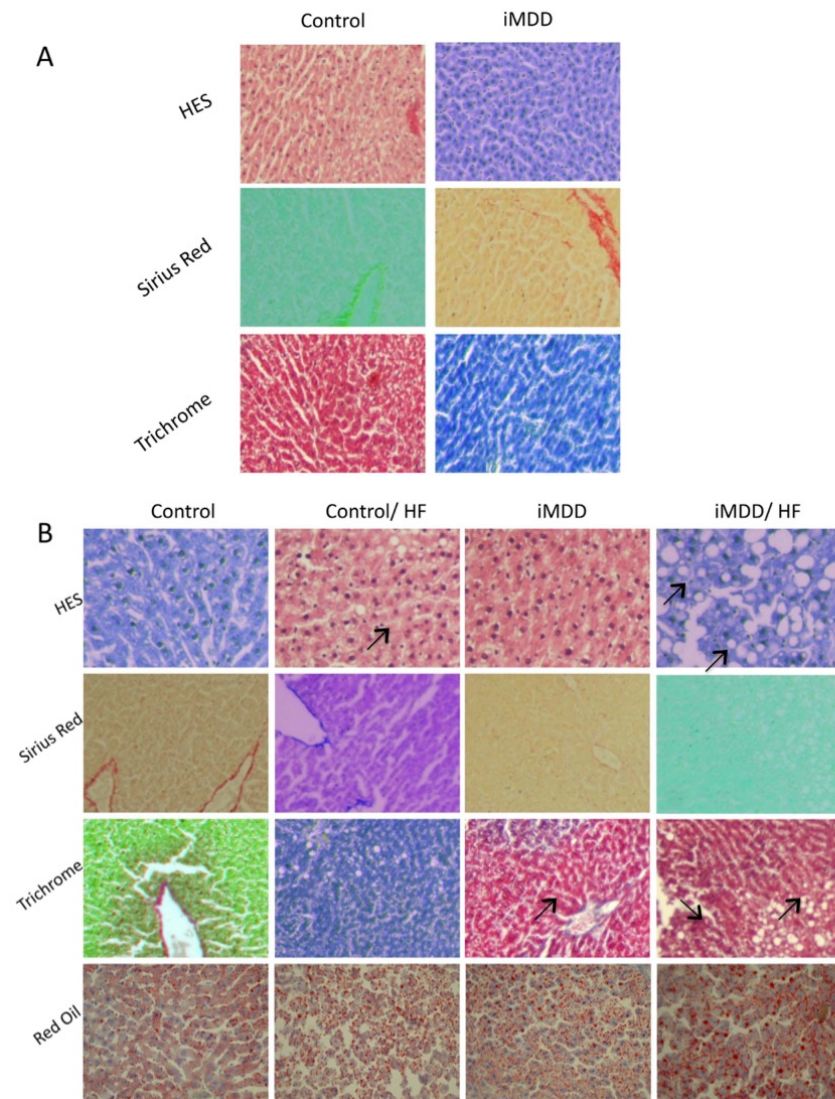


Figure 3. Liver histology of D50 and D185 rats. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) Histological analysis in liver from D50 iMDD and control animals, with Hematoxylin Eosine (HES), Sirius Red staining (specific for collagen and reticulin fibers) and Masson Trichrome staining (specific for collagen fibers). Neither microvesicular steatosis nor fibrosis was detected in iMDD and control animals. (B) Histological analysis in liver from D185 iMDD/HF animals, with Hematoxylin Eosine (HES), Sirius Red staining (specific for collagen and reticulin fibers), Masson Trichrome staining (specific for collagen fibers) and red oil (for visualization of fat cells). We observed a dramatic microvesicular steatosis and fibrosis (indicated by arrows) in tissue samples from iMDD/HF rats, and a much weaker steatosis in control/HF and iMDD rats.

among the transregulators of inflammation, *Agt* (angiotensinogen), *Agtr1* (angiotensin receptor type 1), *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3* and *Bmp7* (transforming growth factor beta super family) and *Edn1* (endothelin 1) among genes involved in stellate cell activation, *Akt1* as a signalling protein of *Tgfb* pathways in epithelial-to-mesenchymal cell

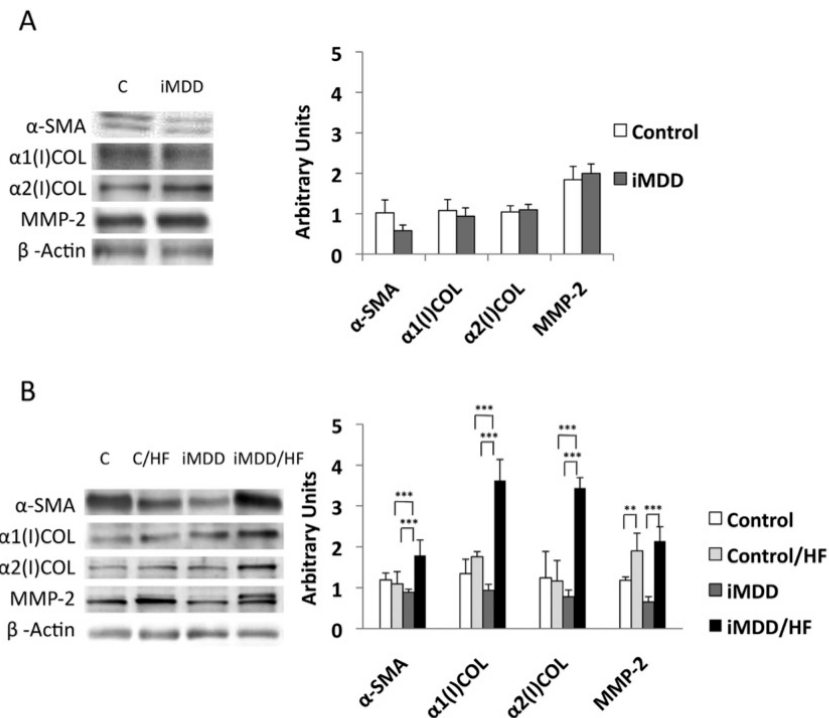


Figure 4. Markers of liver fibrosis. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) The protein expression of α-SMA (Smooth Muscle Actin), α1(I) collagen, α2(I) collagen and MMP-2 was similar in the liver of D50 iMDD and control animals. (B) In contrast, a higher protein expression of α-SMA, α1(I) collagen, α2(I) collagen, MMP-2 was reported in liver from D185 iMDD/HF, compared with other groups. The protein bands were quantified densitometrically, normalized with β-Actin and expressed as arbitrary units; n = 8 in each group, means ± SD, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

transition, *Acta2* (SMA) and *Col1a2* among profibrotic genes, *Plat* (plasminogen activator), *Timp1* and *Timp2* (Tissue inhibitor of metalloproteases), *Itga3* and *Itgb8* (integrins) and *Thbs2* (thrombospondin 2) among genes involved in extracellular matrix and cell adhesion (Fig. 7A–C and Supplementary Table S1). These genes have a high level of interactions, including co-expression, co-localization and they are involved in common pathways triggered by angiotensin (Supplementary Table S1). All together, these data suggested an influence of iMDD/HF on the components of NASH pathomechanisms, including inflammation, stellate cell stimulation and subsequent fibrosis and remodelling, through activation of inflammasome, transforming growth factor beta super family and renin-angiotensin system (Supplementary Table S1). We investigated further whether the changes in the main components of these pathways were confirmed at the protein expression level.

Activation of fibrogenic pathways was related to inflammasome and angiotensinogen/angiotensin receptor, type 1 (AT1) in liver from iMDD/HF rats. We observed an increased protein expression of NFκB in iMDD and iMDD/HF rats and a dramatic increase of the protein markers of inflammasome, Caspase 1 and cleaved IL-1β in iMDD/HF rats, compared to the 2 control groups (Fig. 8A). The expression of angiotensinogen, angiotensin receptor, type 1 (AT1) and BMP7, but not TGFβ1, were increased in the D50 iMDD animals (Fig. 8B). In agreement with the RT-PCR data, we confirmed the increased expression of angiotensin, TGFβ1 and BMP7 in the D185 iMDD/HF animals, compared to D185 control, control/HF and iMDD animals (Fig. 8B). We found also an increased blood concentration of angiotensin in D50 iMDD rats and in D185 iMDD/HF (Fig. 8C). These data are consistent with the critical role of angiotensin in fibrogenic pathways of NASH by stimulation of TGFβ1 expression¹⁵.

Discussion

Compared to the huge number of epidemiological and experimental studies on overnutrition in the generation of metabolic syndrome, type-2 diabetes and NASH, little attention has been paid to the foetal programming effect

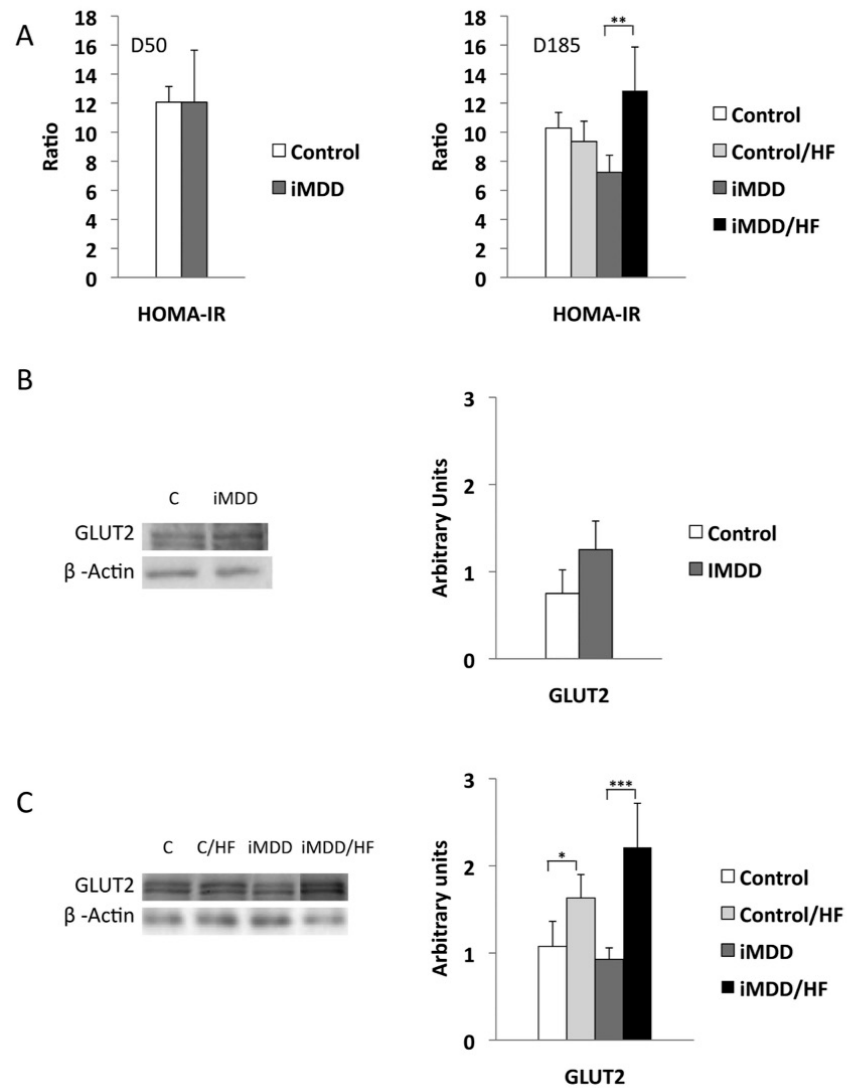


Figure 5. Markers of insulin resistance. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) HOMA-IR was similar in D50 iMDD rats and increased in D185 iMDD/HF rats, compared to their respective control groups. (B) Glut 2 protein expression was similar in D50 iMDD and control animals (C) In contrast, protein expression of Glut 2 was increased in control/HF and iMDD/HF, compared to control and iMDD groups, respectively. The protein bands were quantified densitometrically, normalized with β -Actin and expressed as arbitrary units (right); examples of illustrative western blots are showed (left); $n = 8$ in each group, means $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

of micronutrients restriction on these diseases. Five to 15% of pregnant women have a deficit in folate and/or Cbl, which can lead to fetal programming manifestations³. Subsequent over nutrition is becoming epidemic in childhood. Our study was therefore designed to evaluate the links and pathomechanisms between foetal programming and NASH according to these two pre-natal and post-natal dietary windows, in an MDD experimental rat model of foetal programming.

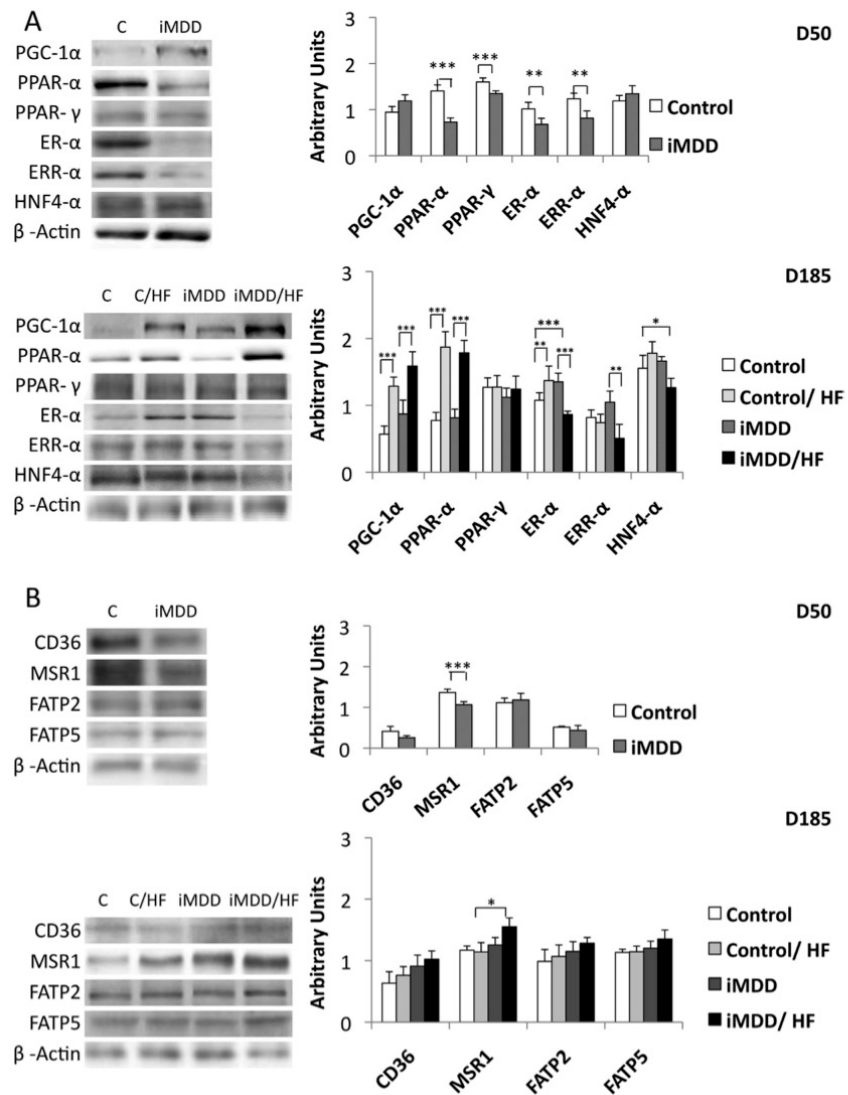


Figure 6. Protein expression of genes related to fatty acid metabolism. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) ER-α, ERR-α, PPAR-α and PPAR-γ had lower protein expression in iMDD than in control D50 rats. In contrast ER-α and HNF-4α were decreased in iMDD/HF rats, compared to control/HF animals. (B) MSR1 has an increased protein expression in iMDD/HF rats, compared to their respective controls. The same trend was observed for CD36, FATP2 and FATP5, but without significance. The protein bands were quantified densitometrically, normalized with β-Actin and expressed as arbitrary units (right); examples of illustrative western blots are showed (left); $n = 8$ in each group, means $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

We observed a weight difference between control and MDD dams at D14 of pregnancy. This difference was the consequence of the restriction diet initiated one month before mating, as observed with other restriction diets used to produce rat models of foetal programming². As expected the normal diet between D21 and D50 erased most of the metabolic changes and the liver steatosis of iMDD D21 pups^{10,16,17}. The prominent abnormalities of

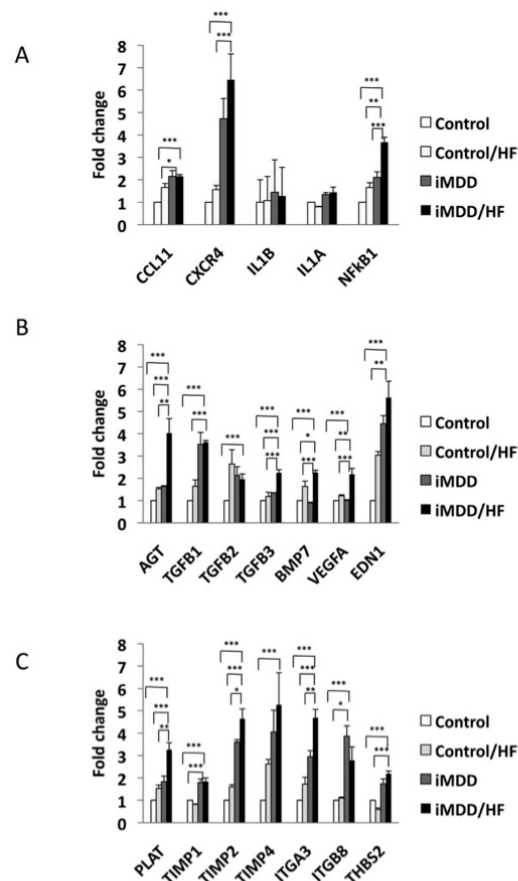


Figure 7. Quantitative analysis of the transcripts from genes related to inflammation, fibrogenic and remodelling pathways. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) The predominant changes (fold change higher than 2) were observed with *Ccl11*, *Cxcr4*, *Il1b*, *Il1a* and *Nfkb1* for inflammatory genes. (B) *Agt* (angiotensinogen), *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3* and *Bmp7* (transforming growth factor beta super family), *Vegfa* (Vascular endothelial growth factor A) and *Edn1* (endothelin 1) for genes involved in stellate cell activation. (C) *Plat* (plasminogen activator), *Timp1*, *Timp2* and *Timp4* (Tissue inhibitor of metalloproteases), *Itga3* and *Itgb8* (integrins) and *Thbs2* (thrombospondin 2) for genes involved in extracellular matrix and cell adhesion; n = 4 in each group, means $\pm$ SD, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

D50 animals were the permanence of the decreased weight observed previously at birth and D21^{10,16,17} and the increased proportion of abdominal fat. These abnormalities suggested a higher predisposition of D50 MDD rats to metabolic syndrome outcomes. To assess this hypothesis, we subjected the animals to a HF diet, which had a more limited fat content (50%) than other HF diets currently used in NASH animal models. This HF diet produced mild metabolic and histological abnormalities, but no increase of protein markers of inflammasome, in control/HF rats.

The synergic influence of iMDD programming and HF diet produced hallmarks of NASH, with steatosis, inflammation and fibrosis in liver, compared to control/HF. We found previously that the manifestations of MDD foetal programming, including central abdominal fat and liver and myocardium steatosis resulted from impaired fatty acid beta-oxidation and energy metabolism through the dysregulation of PGC1 α co-activation of nuclear receptors, in pups from MDD rats^{9,10}. These findings are consistent with the increased abdominal fat and ASAT/ALAT ratio observed in iMDD rats. The higher serum concentration of fatty acids and the increased expression of MSR1 produced by HF could favour the import of fatty acids¹⁸. The liver inflammation was evidenced by the increased protein expression of NFkB and protein markers of inflammasome, Caspase 1 and cleaved IL-1 β ,

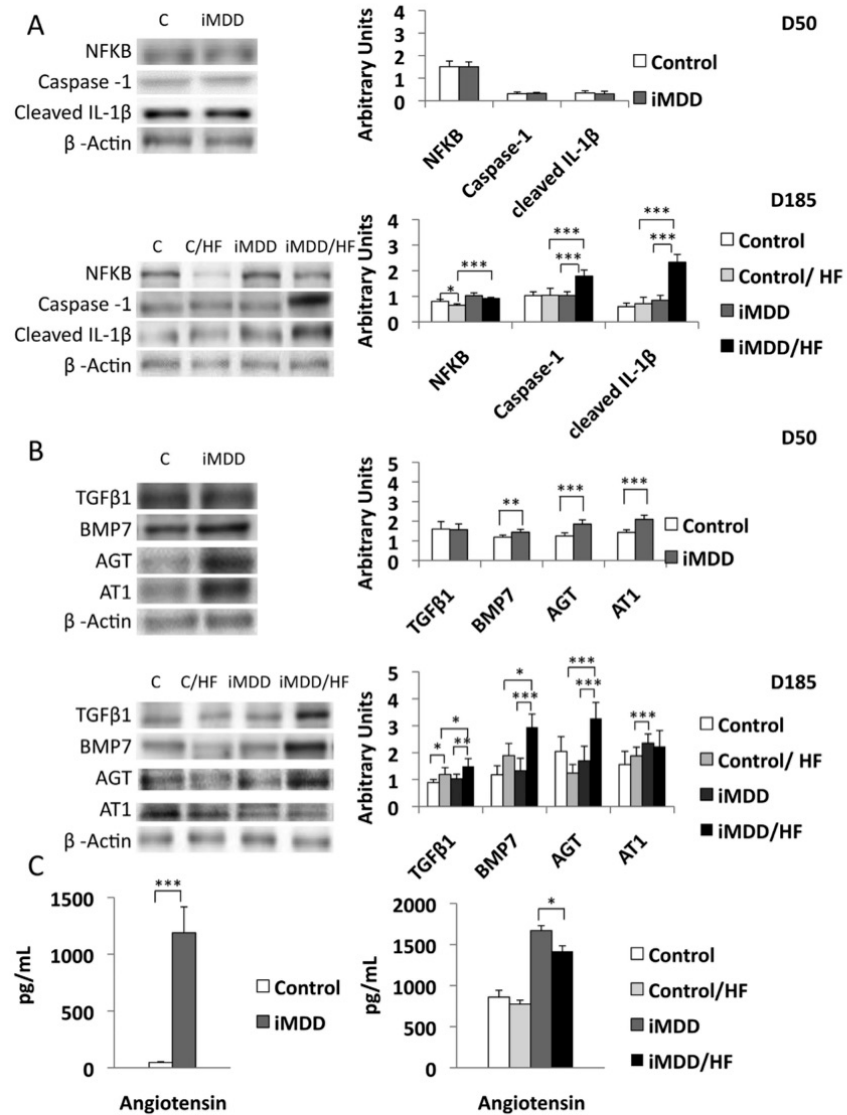


Figure 8. Protein expression of gene related to inflammasome and fibrogenic pathways. D50 rats were born from dams fed a methyl donor deficient diet (iMDD) diet during pregnancy and lactation and subsequently subjected to high fat (HF) diet between D50 and D185. (A) expression of NFKB, Caspase 1 and cleaved IL-1β was similar in iMDD and increased in iMDD/HF rats, compared to their respective control groups. (B) Angiotensinogen (AGT), angiotensin receptor, type 1 (AT1) and BMP7, but not TGFβ1, were increased in the D50 iMDD animals, while TGFβ1, angiotensin and BMP7 were increased in the D185 iMDD/HF animals, compared to their respective control groups. (C) Blood concentration of angiotensin was increased in D50 iMDD rats and D185 iMDD/HF, compared to their respective control groups. The protein bands were quantified densitometrically, normalized with β-Actin and expressed as arbitrary units (right); examples of illustrative western blots are showed (left); $n = 8$ in each group, means $\pm$ SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

in iMDD/HF rats. The greater activation of NFKB has been previously observed in obese patients with NASH¹⁹, in obese (ob/ob) mice²⁰ and in a NASH model of rodents fed a diet deficient in methionine-choline²¹. Caspase-1

and IL-1 β play also a master role in NASH of rodents subjected to methionine and choline deficient diet²² or high fat diet²³. In these models, it has been showed that free fatty acids activate NF κ B pathway and leads to cytokine production.

Beside the downstream activation of IL-1 β in inflammasome, the members of transforming growth factor beta super family play also a master role in stellate cell stimulation and subsequent fibrosis²⁴. In consistence with this role, we found an increased transcription expression of the members of this super family, *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3* and *Bmp7*, in the liver tissue of the iMDD/HF group, compared to other groups. TGF β 1 activated hepatic stellate cells and their transformation into myofibroblasts, as reflected by the increased expression of α -SMA in iMDD/HF rats (Fig. 4B)²⁵. The activation of hepatic stellate cells was also consistent with the increased expression of genes of inflammatory chemokines, *Ccl11*, *Cxcr4* and the increased gene expression of integrins (Fig. 7)²⁴. Although the critical role of TGF- β 1 in hepatic fibrogenesis is well established, the potential role of BMP7 is less clear. BMP7-stimulated HSCs have an increased expression of type I collagen and fibronectin²⁶. Conversely, BMP-7 can attenuate and even prevent the level of hepatic fibrosis in rats through inhibition of the expression of TGF- β 1²⁷. This preventing effect was limited in regard to the increased fibrosis, in iMDD/HF rats.

Insulin resistance is strongly associated to the pathogenesis of NASH. It was evidenced by increased HOMA-IR and increased GLUT2 expression, in iMDD/HF rats, but not in the D50 iMDD and control/HF rats. It was therefore produced by the two consecutive hits, the foetal programming effect of iMDD and the subsequent exposure of predisposed animals to HF. GLUT2 expression is required for the physiological control of glucose-sensitive genes, and its inactivation in the liver leads to impaired glucose-stimulated insulin secretion through a liver-beta cell axis, which is likely to control beta cell secretion capacity²⁸.

Agt is one of the master genes involved in the pathogenesis of NASH. The dysregulation of the renin-angiotensin system is known to produce and/or favour most of the changes, which were observed in the iMDD/HF rats, including inflammation, increased expression of TGF- β 1 and related markers of fibrosis, insulin resistance and central obesity. The foetal programming effects of iMDD produced synergic effects on the renin-angiotensin system in the liver. The liver expression of *Agt* and the angiotensin blood concentration were dramatically increased in D50 and D185 iMDD rats. In addition, we found an increase of protein expression of AT1 receptor, which is thought to be responsible for most of the adverse effects of angiotensin. These effects were not related to the effect of HF diet only, since they were observed in iMDD/HF but not in control/HF rats. Angiotensin is synthesized by activated hepatic stellate cells²⁹. Furthermore, it improves the contraction and proliferation of myofibroblasts and promotes the release of inflammatory and pro-fibrotic cytokines, including TGF- β 1, and the deposition of extracellular matrix³⁰. The activation of NF κ B inflammatory pathway by angiotensin plays also a critical role in insulin resistance of rats subjected to HF³¹. The deleterious angiotensin-AT1 axis impairs glucose homeostasis and favours insulin resistance. Its activation triggers liver inflammation and fibrosis through NF κ B and TGF- β 1-dependent pathways, as observed in the liver tissue of iMDD/HF rats. The increased angiotensin/AT1 pathway is also consistent with the increased abdominal fat of iMDD/HF rats through its multi-facet influence on visceral metabolism. It modulates adipogenesis, lipogenesis, and white adipose tissue content of the body³². Taken together, our data suggest therefore that the dysregulation of renin-angiotensin system played a key role in the foetal programming effects of MDD on liver inflammation and fibrosis and insulin resistance. However, this system is only one piece of the complex puzzle of the pathways that trigger NASH, considering the contrasted effects of angiotensin inhibitors in NASH animal models^{15,23} and their inefficacy in recent clinical trials³³.

Our model provides new clues in the observations made in populations from India and Nepal, where the prevalence of B12 deficiency is very high during pregnancy^{4–6}. It has been showed that this deficiency produces foetal programming effects, which are very similar to those observed in our model, including small birth weight, increased abdominal fat and subsequent insulin resistance in childhood⁵. Children and adolescents are increasingly exposed to high fat intake in western countries and countries with emerging economies. In these populations, the subsequent exposure to high fat diet could be the secondary hit, which participates to the increased prevalence of insulin resistance observed in children born from mothers who had a B12 deficit during pregnancy. Our data suggest that the foetal programming effect of MDD could be one of the early conditions, which trigger the subsequent risk of NASH in obese patients. This hypothesis should deserve further attention in population studies.

Conclusions

MDD during gestation and lactation produced NASH in adult animals subjected to high fat diet, despite the recovery of a normal histological and metabolic presentation by a control diet between weaning and D50. Insulin resistance and increased expression of angiotensin/AT1 and TGF β 1 were major changes related to inflammasome activation, increased NF κ B, activation of stellate cells and increased fibrosis. These results suggest that foetal programming produced by iMDD is a risk factor of NASH. They should be considered in the study of populations, in which the deficit in B12 and/or folate during pregnancy and lactation is frequent.

Methods

Animal Treatments. Animal experiments were performed on Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) and were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, in an accredited establishment (Inserm U 954), according to governmental guidelines N86/609/CEE. The animal study has been registered and approved in the French Ministry of higher education and research under the reference APAFIS#1498-2015082015582707vl and has been accepted by the Ethical Committee of Lorraine (N° 66), France. Adult female rats were maintained under standard laboratory conditions, on a 12-hour light/dark cycle, with food and water available ad libitum. One month before pregnancy, animals (n = 8 in each control and MDD group) were fed with either a standard diet (with 16% proteins and 60%

nitrogen free extract, caloric intake: 2 800 kcal/kg) or the same diet lacking vitamin B12 (0.0 mg/kg) and folate (0.04 mg/kg) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). The diet provides choline and methionine (220 mg/kg and 0.4% of total content respectively). We equilibrated the number of pups in both groups by sacrificing pups in excess in the control group. The assigned diet was constantly maintained until weaning of the offspring (i.e., postnatal day 21). Pups (16 male pups per group, 2 pups per litter) were fed a normal diet after weaning, from day (D) 21 to D50 and half of them were subsequently exposed to a HF diet between D50 and D185. Ingredients included starch: 113 g/kg, sucrose: 225 g/kg, margarine/oil (50/50): 263 g/kg, casein: 209 g/kg, sweet condensed milk: 100 g/kg, salts: 40 g/kg, vitamins: 10 g/kg, cellulose: 40 g/kg. Carbohydrates supplied 32% of energy, fat, 50% and proteins, 18%. The animals were euthanized at D50 and D185, respectively. This protocol permitted to define 4 study groups, control conditions with normal diet in dams and pups (control), methyl donor deficiency in dams and control diet in pups (iMDD), control diet in dams and high fat in pups (control/HF) and MDD diet in dams and high fat in pups (iMDD/HF), with 6 males per groups. Rats were sacrificed by decapitation after exposure to halothane and the liver were rapidly removed. At the same time, we examined the weight of the body and liver. Immediately after sacrifice, intracardiac blood samples were collected and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Aliquots of serum heparin plasma were stored frozen at -80°C until analysis. The liver was rapidly collected, washed in PBS1X (2.7 mmol/L KCl, 140 mmol/L NaCl, 6.8 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.4), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until protein and RNA analysis. The tissue samples used for histological studies were fixed in formol and included in paraffin.

Whole body composition using DEXA analysis. DEXA analysis was achieved using a QDR-4500A densitometer (Hologic Inc., Waltham, MA, USA) with a module for small animal measurements. The software identifies and estimates global lean mass (g), global fat mass (g), global percentage of fat (%), global mass (g). Rats were anesthetized with an inhalational anaesthesia with 1.5–3 Vol% isoflurane (Forene® 100% (V/V), Abbott, Wiesbaden, Germany) at maintenance, terminated after 40 minutes. After anesthesia, rats were positioned ventrally. Five repeated measurements were performed.

Biochemical analyses. Plasma concentrations of vitamin B12 and folate were determined by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN, Costa Mesa, USA). Homocysteine, Methylmalonic acid, Succinic acid, SAM and SAH concentrations were measured in plasma by High Performance Liquid Chromatography (Waters, St Quentin, France) coupled to mass spectrometry (Api 4000 Qtrap Applied Biosystems, Courtabœuf, France), as described previously³⁴. Insulin was assayed by radioimmunoassay (MP, Biomedicals, Solon, OH, USA). HOMA-IR was calculated using the formula $[\text{fasting plasma glucose (mmol/L)} \times \text{fasting plasma insulin } (\mu\text{IU/mL})] / 22.5$. Lipids, glycemia, ASAT, ALAT and other routine biochemical parameters were determined in plasma as described previously¹⁰.

Histopathological analysis. Histological examination of Hematoxylin-eosin, Masson's trichrome (Sigma) and Sirius Red stained tissues were performed as described previously¹⁷. Histological analysis was performed using semi-quantitative items focusing on necroinflammatory lesions, fibrosis and steatosis¹⁷.

Real-time quantitative RT-PCR. Rneasy plus Mini Kit (Qiagen, Paris, France) was used for the total RNA extraction by including treatment with DNase. Reverse transcription was done by using the RT2 First Strand Kit (Qiagen, Paris, France). Quantitative RT-PCR was performed on RT2 Profiler PCR Array Rat Fibrosis using RT2 SYBR Green Mastermix kit from Qiagen and reactions were run on the Step One Plus (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) using a two-step standard protocol: activation of HotStart DNA Taq Polymerase at $95^{\circ}\text{C}/10$ min and PCR was performed in 40 cycles (one cycle = denaturation at $95^{\circ}\text{C}/15$ s, annealing and extension at $60^{\circ}\text{C}/1$ min). β -actin was used as internal standard, and differences in expression were calculated using the following formula:

$$\frac{(1 + \text{efficiency}(\text{gene to study}))^{\text{Ct standard} - \text{Ct sample}}}{(1 + \text{efficiency}(\text{reference gene}))^{\text{Ct standard} - \text{Ct sample}}}$$

To check for possible DNA contamination of the RNA samples, reactions were also performed in control condition without Omniscript RT enzyme (Qiagen, Courtabœuf, France).

Western blot analyses. The extraction of total proteins from the liver was completed by lysing homogenized tissue in RIPA buffer (sodium phosphate anhydrous dibasic, potassium dihydrogen phosphate, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate and Complete Protease Inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France) after washing twice with ice-cold 1X PBS) and then quantified using the bicinchoninic acid assay method. A total of 15–30 μg of protein (30 μg for the analyses of nuclear receptors at D50 and 15 μg for all other analyses) were mixed with an equal volume of 2x Laemmli buffer, denatured by heating the mixture for 5 min at 100°C , and then resolved by 12% SDS-PAGE. After electrophoretic separation, proteins were transferred to a membrane (polyvinylidene fluoride (PVDF) or nitrocellulose) as described previously^{10,35}. The proteins were pictured using an ECL detection kit (Amersham, Velizy-Villacoublay, France) and bands were measured by densitometry using Image J 5.1 program. β -Actine was used as an internal reference control, according to our previous evaluations of other proteins, including tubulin and GAPDH¹⁰.

Statistical Analyses. Statistical analysis was performed using Statview V.5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, California, USA). Continuous variables from RT-qPCR and densitometry analyses of western

blots were reported as mean $\pm$ S.D. Raw data were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher test. The level of significance was set at p -value < 0.05 . Results were indicated by asterisks in figures (* p -value < 0.05 ; ** p -value < 0.01 and *** p -value < 0.001).

References

- Day, C. P. Clinical spectrum and therapy of non-alcoholic steatohepatitis. *Dig Dis* **30** Suppl 1, 69–73 (2012).
- Milic, S., Lulic, D. & Stimac, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World journal of gastroenterology: WJG* **20**, 9330–9337 (2014).
- Gueant, J. L., Namour, F., Gueant-Rodriguez, R. M. & Daval, J. L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **24**, 279–289 (2013).
- Stewart, C. P. et al. Low maternal vitamin B-12 status is associated with offspring insulin resistance regardless of antenatal micronutrient supplementation in rural Nepal. *J Nutr* **141**, 1912–1917 (2011).
- Yajnik, C. S. & Deshmukh, U. S. Fetal programming: maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **13**, 121–127 (2012).
- Yajnik, C. S. et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* **51**, 29–38 (2008).
- Tabassum, R. et al. Genetic variant of AMD1 is associated with obesity in urban Indian children. *PLoS One* **7**, e33162 (2012).
- Kalhan, S. C. et al. Methionine and protein metabolism in non-alcoholic steatohepatitis: evidence for lower rate of transmethylation of methionine. *Clin Sci (Lond)* **121**, 179–189 (2011).
- Garcia, M. M. et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *The Journal of Pathology* **225**, 324–335 (2011).
- Pooya, S. et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ER- α , and HNF-4 α in the rat liver. *Journal of hepatology* **57**, 344–351 (2012).
- Lowell, B. B. & Shulman, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* **307**, 384–387 (2005).
- Sookoian, S. et al. Epigenetic regulation of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α promoter. *Hepatology* **52**, 1992–2000 (2010).
- Chen, G. et al. Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Molecular nutrition & food research* **59**, 293–302 (2015).
- Cordero, P., Campion, J., Milagro, F. I. & Martinez, J. A. Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: effect of dietary methyl donor supplementation. *Mol Genet Metab* **110**, 388–395 (2013).
- Matthew Morris, E., Fletcher, J. A., Thyfault, J. P. & Rector, R. S. The role of angiotensin II in nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Cell Endocrinol* **378**, 29–40 (2013).
- Blaise, S. A. et al. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* **170**, 667–679 (2007).
- Blaise, S. A., Alberto, J. M., Audonnet-Blaise, S., Gueant, J. L. & Daval, J. L. Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1492–E1502 (2007).
- Bechmann, L. P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *Journal of hepatology* **56**, 952–964 (2012).
- Videla, L. A. et al. Liver NF- κ B and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 973–979 (2009).
- Velayudham, A. et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* **49**, 989–997 (2009).
- Dela Pena, A. et al. NF- κ B activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. *Gastroenterology* **129**, 1663–1674 (2005).
- Csak, T. et al. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology* **54**, 133–144 (2011).
- Dixon, L. J., Flask, C. A., Papouchado, B. G., Feldstein, A. E. & Nagy, L. E. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One* **8**, e56100 (2013).
- Czaja, A. J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG* **20**, 2515–2532 (2014).
- Hayashi, H. & Sakai, T. Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases. *Frontiers in physiology* **3**, 12 (2012).
- Tacke, F. et al. Bone morphogenetic protein 7 is elevated in patients with chronic liver disease and exerts fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci* **52**, 3404–3415 (2007).
- Wang, S. L. et al. Inhibitory effect of bone morphogenetic protein-7 on hepatic fibrosis in rats. *Int J Clin Exp Pathol* **6**, 897–903 (2013).
- Thorens, B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* **58**, 221–232 (2015).
- Battaller, R. et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* **112**, 1383–1394 (2003).
- Lubel, J. S., Herath, C. B., Burrell, L. M. & Angus, P. W. Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications. *Journal of gastroenterology and hepatology* **23**, 1327–1338 (2008).
- Zhou, M. S., Liu, C., Tian, R., Nishiyama, A. & Raji, L. Skeletal muscle insulin resistance in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II activation of NF- κ B. *Cardiovasc Diabetol* **14**, 45 (2015).
- Favre, G. A., Esnault, V. L. & Van Obberghen, E. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**, E435–E449 (2015).
- Torres, D. M. et al. Rosiglitazone versus rosiglitazone and metformin versus rosiglitazone and losartan in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis in humans: a 12-month randomized, prospective, open-label trial. *Hepatology* **54**, 1631–1639 (2011).
- Battaglia-Hsu, S. F. et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 21930–21935 (2009).
- Bossenmeyer-Pourie, C. et al. Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through N-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation. *Faseb J* **27**, 2185–2197 (2013).

Acknowledgements

This study was supported by Inserm and the Region Lorraine.

Author Contributions

R.M.G.R. and J.L.G. designed and coordinated the study, interpreted the data and wrote the paper. A.B.I. performed the experiments, interpreted the data and wrote the paper. A.B.R., E.F., Z.L., I.E., R.H., B.B., G.P. and G.C. participated in designing the study, performed analyses, interpreted the data and participated in the preparation of the paper. J.M.A. and R.U. performed metabolic, cellular, molecular and animal experiments, J.P.B. participated in the study design, interpreted the data and revised the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Bison, A. *et al.* Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet. *Sci. Rep.* **6**, 37207; doi: 10.1038/srep37207 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

8. FICHES TECHNIQUES

8.1. Fiche technique n°1 : Protocole animal

- Les animaux ont été traités en accord avec la directive 2010/63/UE transposée en décret français (décret 2013-118 ainsi que ses 4 arrêtés) et de la charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale.
- Provenance des animaux : Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France.
- Espèce utilisée : rats Wistar.
- Poids à l'arrivée : 180-210 g.
- Age à l'arrivée : 2 mois.
- Acclimatation : 10 jours.
- Environnement : conditions standard d'élevage dans une animalerie contrôlée 22 +/- 1°C avec un cycle nyctéméral programmé de 12h (8h-20h) et accès à volonté à la nourriture et à l'eau.
- Rats mâles reproducteurs : alimentés avec de la nourriture standard avant l'accouplement.
- Adaptation : un mois avant la mise en accouplement, un groupe de rates a été soumis à un régime alimentaire standard et un second groupe a reçu un régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles (folates et vitamine B12).
- Accouplement : Après un mois d'adaptation les rates sont mises en accouplement avec les mâles pendant 5 jours.
- Gestation : Le poids des rates est surveillé durant la gestation, celle-ci durant 21 jours.
- Naissance: Les ratons sont laissés avec leur mère, sauf s'il y a besoin de rééquilibrer les portées, jusqu'au jour J21 post-partum où les ratons sont sevrés.
- Sevrage (J21): A partir du sevrage, tous les ratons reçoivent un régime alimentaire standard et sont placés à deux dans une cage jusqu'au jour J50.
- Stade J50: Correspond à la puberté chez le rat. A ce stade, deux groupes sont toujours identifiables: le groupe de ratons "contrôles" nés de mères ayant reçu le régime alimentaire standard et le groupe de ratons "iMDDs" nés de mères initialement carencées en donneurs de méthyles. Plusieurs ratons J50 sont mis à mort (cf. fiche technique 2) afin de prélever leur sang et différents organes, essentiellement le foie, dans le but de découvrir les conséquences d'un retour à une alimentation standard. Les ratons restants sont à nouveau séparés en deux groupes, un groupe recevant toujours un régime alimentaire standard et un autre groupe recevant un régime hyper-énergétique (HF) riche en sucres et lipides de 50 jours à 185 jours.
- Stade J185 et J400 : Les ratons à ce stade sont devenus adultes et vieillissent. Tous les rats J185 ou J400 sont mis à mort (cf. fiche 2) afin de prélever leur sang et différents

organes, essentiellement le foie et le coeur, dans le but de découvrir les conséquences du régime hyper-énergétique suite à un régime carencé en donneurs de méthyles ou non. (Figure 21)

A ce stade ultime J185 et J400 on compte quatre groupes:

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

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL – CHEBO

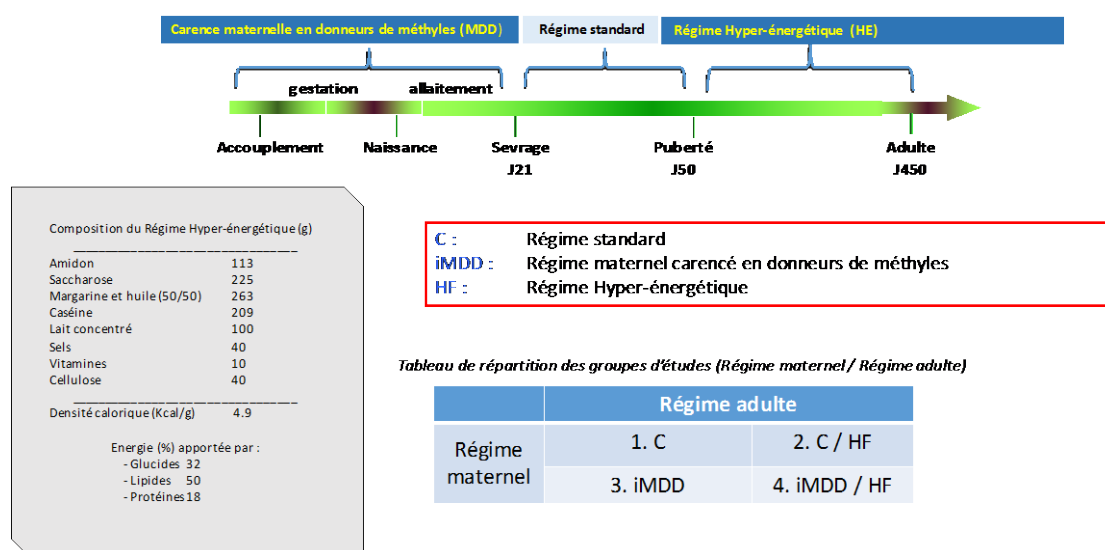


Figure 21. Le schéma du protocole du modèle animal.

① Régime alimentaire normal : SAFE, Augy, France

vitamine B12 (0,04 mg/kg), folates (0,9 mg/kg), choline (2100 mg/kg).

② Régime carencé, Special Diet Service, Saint- Gratien, France

vitamine B12 (0 µg/kg), folates (0,01 mg/kg), choline (0,06 mg/kg).

8.2. Fiche technique n°2 : Prélèvement des échantillons

- La veille au soir des mises à mort à J50 et J185, les rats sont mis à jeun. Le lendemain, les rats sont pesés puis anesthésiés avec un mélange isoflurane-air ^① (3-4% Isoflurane et 1L/min d'air pour véhiculer le gaz)
- Après s'être assuré que chaque animal soit bien endormi (en pinçant une patte par exemple), effectuer la mise à mort par décapitation et recueillir directement le sang dans des tubes héparinés ^② contenant 50 µL d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) pour l'analyse biochimique plasmatique:
 - Centrifuger les tubes à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C pour récupérer le plasma.
 - Aliquoter le plasma par 100 µL.
 - Acidifier un seul tube de plasma en ajoutant 10 µL d'acide acétique 1N.
 - Conserver tous les tubes de plasma à -80°C.
- Disséquer chaque rat afin de récupérer un maximum d'organes (foie, cœur, cerveau...).
- Les organes sont pesés puis directement congelés dans l'azote liquide puis placés à -80°C (pour les analyses de biologie moléculaire, western blot, dosages tissulaires) ou fixés dans du formol à 10% ^③ (pour les analyses histologiques) ou fixé dans 4% PAF (Paraformaldehyde) pour analyse histochimique .

① Isoflurane, Baxter.

② Tubes héparinés, Dutscher.

③ Formol à 10% (v/v) pH 7,4 (LABONORD S.A., Templemars).

8.3. Fiche technique n°3 : Absorption bi-photonique à rayons X: méthode DXA

Principe :

La méthode DXA (*Dual energy X-ray Absorptiometry*) est une méthode d'imagerie médicale basée sur la comparaison de l'atténuation de rayons X de deux énergies différentes. Il s'agit en effet de mesurer l'atténuation de deux faisceaux de rayon X d'énergies différentes à travers les tissus. L'absorption dépendant à la fois de la quantité et de la nature de la matière traversée, le rapport d'absorption selon l'énergie permet de décorrélérer la nature de la matière de sa quantité. Elle est très utilisée en ostéodensitométrie du fait de sa performance en termes d'exactitude, de reproductibilité et de linéarité. La DXA est devenue une technique très utile pour les études animales car elle permet, en particulier, un suivi longitudinal évitant ainsi la mort de l'animal. (Figure 43)

La DXA mesure la composition corporelle totale et régionale de trois compartiments :

la masse grasse (MG), la masse non grasse (MM) des tissus mous et l'os. Tous les appareils DXA sont composés d'un générateur émettant des rayons X de deux énergies, une table d'examen, un détecteur et un système informatique. La DXA mesure la transmission à travers le corps de rayons X à basse et haute énergie. Dans les pixels contenant de l'os, la DXA détermine les densités de surface de l'os et des tissus mous en utilisant deux énergies différentes. Dans les pixels ne contenant pas d'os, la DXA mesure directement les pourcentages de masses grasse et maigre des tissus mous. La DXA compare le rapport de l'atténuation du faisceau de basse et de haute énergie avec des valeurs expérimentales de masses grasse et maigre des tissus mous, obtenues par calibration avec des fantômes équivalant à 100 % de masse grasse et 100% de masse maigre. La mesure par DXA du corps entier est rapide (3-10 minutes selon les appareils), non invasive, précise et elle induit une irradiation de 2-5 μSv , ce qui est faible par rapport à l'irradiation naturelle journalière (5-7 μSv).

Le ralentissement de la croissance longitudinale chez le rat survient à environ 64 jours d'âge, avec un léger retard par rapport à l'âge de maturité sexuelle. La maturité sexuelle chez les rats est déterminée pour les mâles par l'apparition de spermatozoïdes matures dans les canaux déférents (45-55 jours), et pour les femelles par la première ovulation (35-40 jours).

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

Procédure expérimentale :

- Placer un fantôme (conçu pour analyser les rats) sur l'appareil^① et lancer la calibration (à faire une seule fois par jour).
- Anesthésier le rat avec un mélange d'isoflurane^② et d'air en utilisant un appareil à anesthésie mobile^③.
- Déposer le rat anesthésié, en décubitus ventral, sur une plaque en verre positionnée sur la table d'examen. Le rat est maintenu sous anesthésie grâce à un masque relié à l'appareil d'anesthésie afin qu'il reste immobile pour un meilleur résultat.
- Marquer la position du premier rat sur la plaque en verre et disposer, par la suite, les autres rats toujours de la même manière.
- Lancer la mesure. Les mesures sont répétées de manière consécutive 5 fois pour chaque animal (utiliser le logiciel « petits animaux »). La durée de chaque passage est de 2 minutes et la durée totale de l'examen pour chaque animal est de 15 minutes.
- Une fois toutes les mesures effectuées pour un même rat, retirer le masque anesthésiant et reposer le rat dans sa cage, la tête bien dégagée et surveiller son réveil.

Résultats :

Le corps entier du rat est analysé lors d'une mesure avec le DXA, puis le corps est divisé en plusieurs régions. Pour chacune de ces régions, la surface, le contenu minéral osseux (CMO), la densité minérale osseuse (DMO) et la composition corporelle (la masse grasse, la masse musculaire et le pourcentage de graisse) sont mesurés et calculés. (Figure 44)

La densité osseuse, MG et MM sont exprimées en moyenne $\pm$ Ecart type pour chaque point de mesure. La densité minérale osseuse (DMO) (g/cm^2) et le contenu minéral osseux (CMO ; g) sont évalués, par la suite, à l'aide d'un logiciel dédié pour le corps entier, et les trois régions d'intérêt: la région lombaire (L1-L4), le fémur et le tibia. La composition corporelle est évaluée pour la région abdominale, la jambe gauche et la région gonadique. Les données sont exprimées pour chaque animal en pourcentage de la MG et MM et changement du CMO sur la durée de l'étude. La longueur de fémur est mesurée à partir des images numérisées. Chaque animal est utilisé comme son propre contrôle et les variations internes des mesures répétées sont définies.



Figure 43. Photographie prise lors de l'examen d'un rat au DXA.



Figure 44. Exemple d'image obtenue après analyse au DXA où les différentes régions nous intéressent ont été délimitées.



①Appareil DXA, Hologic QDR4500A (Waltham, MA, USA).

②Isoflurane, Baxter.

③Appareil d'anesthésie, CAR 600H, TEM (Lormont France).

8.4. Fiche technique n°4 : La tomographie par émission de positons (TEP)

La tomographie par émission de positons (TEP) est une méthode d'imagerie médicale qui permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe grâce aux émissions produites par les positons issus de la désintégration d'un produit radioactif injecté au préalable. (Terminologie anglo-saxonne : « positron emission tomography » - PET ou PETscan-). La TEP repose sur le principe général de la scintigraphie qui consiste à injecter un traceur dont on connaît le comportement et les propriétés biologiques pour obtenir une image du fonctionnement d'un organe. Ce traceur est marqué par un atome radioactif (carbone, fluor, azote, oxygène...) qui émet des positons dont l'annihilation produit elle-même deux photons. La détection de la trajectoire de ces photons par le collimateur de la caméra TEP permet de localiser le lieu de leur émission et donc la concentration du traceur en chaque point de l'organe. C'est cette information quantitative que l'on représente sous la forme d'une image faisant apparaître en couleurs les zones de forte concentration du traceur, ce traceur est le plus souvent le fluor (^{18}F) incorporé dans une molécule de glucose formant le Fluorodeoxyglucose marqué au Fluor 18 (^{18}F -FDG), un sucre semblable au glucose, mais rendu radioactif. C'est la radioactivité de ce fluor particulier rajouté au glucose qui permet sa détection par la caméra TEP. Pour vivre, fonctionner et se reproduire, les cellules ont besoin d'énergie sous forme de glucose, sucre assimilable par l'organisme. Cette source énergétique est essentielle aux nombreuses cellules de l'organisme et elle se trouve naturellement dans le sang. Plus l'activité des cellules est importante, plus leur consommation de glucose augmente. Le ^{18}F -FDG se comporte comme le glucose, mais contrairement à celui-ci, il n'est pas une source d'énergie utilisable par la cellule. Il s'accumule dans la cellule qui devient radioactive. En effet, la molécule ^{18}F -FDG est phosphorylée par la cellule qui "tente" de l'assimiler dans son métabolisme, ce qui l'empêche de ressortir de la cellule et le ^{18}F -FDG-6P s'y accumule. En devenant radioactive, la cellule émet des rayonnements qui peuvent être détectés par la caméra TEP. Toutes les informations recueillies par la caméra TEP reposent sur la radioactivité repérée dans les tissus après l'injection du ^{18}F -FDG à l'animal. Le système informatique relié à la caméra TEP produit des coupes et des images en trois dimensions des sites du corps où le ^{18}F -FDG s'est accumulé, la figure montre le processus d'acquisition. (Figure 45)

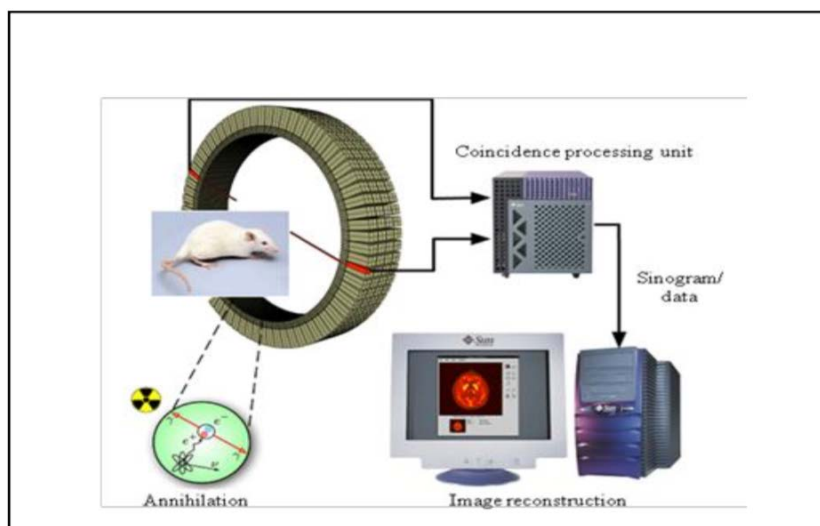


Figure 45. Schéma du processus d'acquisition d'une TEP.

Protocole : La tomographie par émission de positons a été effectuée en utilisant un animal Small monitoring and gating system M 1025T, (Inveon Siemens Medical USA, Inc). Les animaux (rat de sexe male) ont été pesés et anesthésiés en fonction du poids de son corps, ensuite on injecte au rat 74 MBq de ^{18}F -FPRGD4 (injection intraveineuse par voie péniennne). L'animal anesthésié est placé en position ventrale sur le lit d'examen et 4 électrodes sont placées sur les pattes de l'animal. L'examen est réalisé en orbite circulaire sur 180° en allant de 110° jusqu'à 290° , les acquisitions se font pendant 25 min, 30 min après l'injection de ^{18}F -FPRGD4. Pour chaque scan TEP, les régions d'intérêt au niveau cardiaque ont été dessinées en employant le logiciel de fournisseur (ASI Pro 5.2.4.0; Siemens Medical). Une fois l'examen terminé, les animaux sont placés dans l'enceinte pendant 24 heures avant d'être transportés vers une animalerie radioactive pendant une semaine, jusqu'au sevrage du radiomarqueur.

8.5. Fiche technique n°5 : Mesure de la tension artérielle par la méthode du manchon caudal «Tail cuff method»

La mesure de la pression artérielle systolique au niveau de l'artère caudale peut se faire in vivo chez un rat vigile grâce au système tail-cuff méthode automatisé et informatisé. Cette méthode permet de mesurer les pulsations du flux sanguin au niveau de l'artère caudale et de déterminer la pression artérielle systolique correspondant à la disparition de ce flux à la suite du gonflement d'un manchon en latex autour de la queue du rat.

Protocole :

L'examen est réalisé que sur des animaux ayant une queue suffisamment longue et en bon état. L'animal est placé dans une boîte de contention aimantée sur une plateforme chauffante (Hatteras Instruments, Blood Pressure Analysis System, model SC-1000). La queue du rat qui dépasse du compartiment est glissée à travers un ballonnet puis posée sur un capteur photoélectrique (Figure 46). Le ballonnet est gonflé par de l'air envoyé par l'enregistreur, et il est relié à un manomètre (qui permet de calibrer l'enregistreur et de vérifier la pression du ballonnet à tout moment). Lorsque la pression dans le ballonnet augmente, il comprime l'artère caudale, empêchant progressivement le sang de passer. Lorsque la pression du ballonnet est égale à la pression systolique de l'artère, celle-ci est écrasée ce qui empêche la circulation du sang.

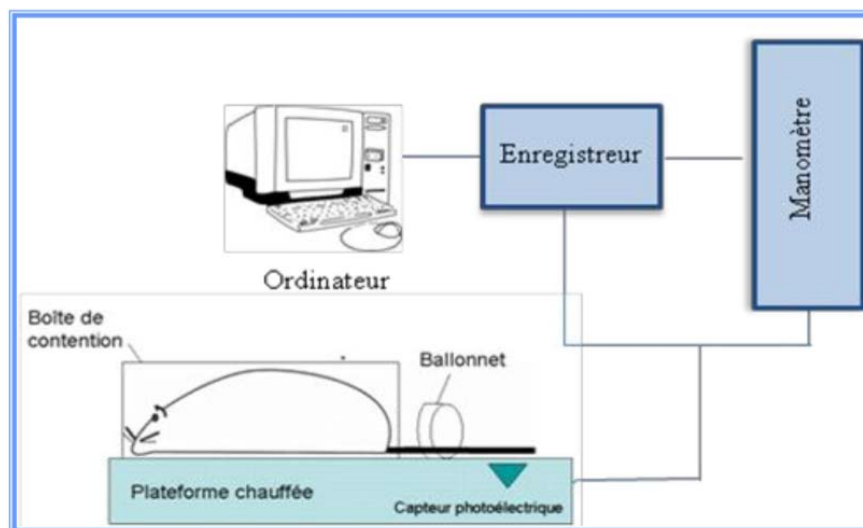


Figure 46. Schéma du montage pour les mesures de pression artérielle des rats.

Le capteur pléthysmographique de l'appareil utilisé fonctionne en convertissant l'énergie lumineuse en énergie électrique : c'est un capteur photoélectrique. Il fonctionne en envoyant un rayon lumineux à travers la peau et en mesurant la quantité de lumière réfléchi. Le capteur

photoélectrique convertit la lumière réfléchiée en signaux électriques, qui sont ensuite affichés et traités par l'enregistreur. L'intensité de la lumière réfléchiée vers le capteur photoélectrique dépend directement du volume sanguin ; une diminution de la lumière réfléchiée correspond donc à une diminution du volume sanguin dans l'artère. Ainsi quand la pression augmente dans le ballonnet, l'artère est écrasée, ce qui diminue le passage du sang et provoque une diminution du signal, jusqu'à ce qu'il soit inférieur au seuil d'extinction (défini automatiquement par l'appareil en fonction du rapport signal/bruit). Cela est interprété par l'enregistreur comme étant la valeur de la pression systolique.

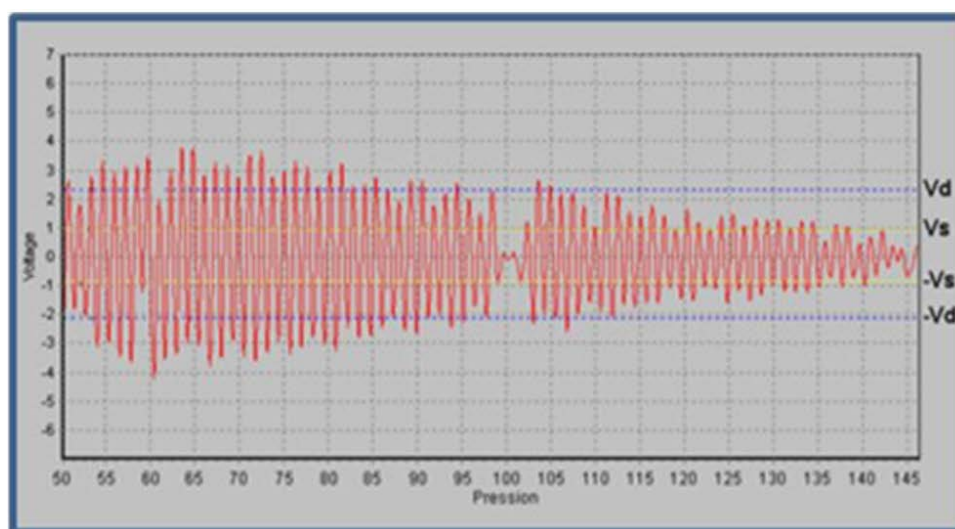


Figure 47. Visualisation du signal recueilli par l'enregistreur.

Au moment de la disparition du signal, soit de la détermination de la pression systolique de l'animal. Vd : seuil d'extinction pour la pression diastolique Vs : seuil d'extinction pour la pression systolique.

Afin d'obtenir des signaux reproductibles (Figure 47), les rats sont entraînés pendant deux semaines avant les mesures de pression artérielle. En effet, la boîte de contention chauffée est une source de stress pour l'animal, ce qui entraîne une modification de ses paramètres physiologiques (augmentation de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle). Pour éviter ce biais, les animaux subissent deux séries de mesures par jour, pour les habituer à la boîte de contention, au bruit de l'appareil et au gonflement du ballonnet autour de leur queue. Seules les mesures obtenues après cette semaine d'entraînement sont prises en compte pour les calculs déterminant la pression artérielle.

8.6. Fiche technique n°6 : Dosage des vitamines B9 et B12

Technique radioisotopique, SimulTRAC-SNB^①

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

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du kit SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals).

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant:

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

Les étalons de vitamine B12 et folates sont dilués dans de la serum-albumine, du chlorure de sodium et des agents stabilisateurs de conservation.

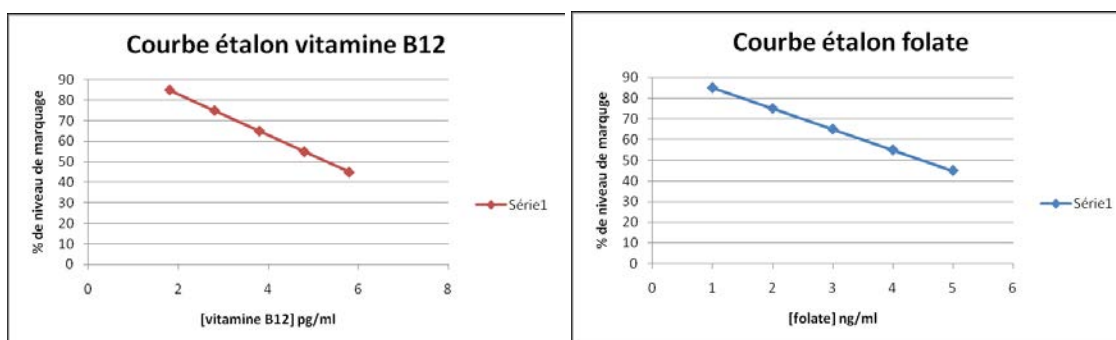
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT^② puis agiter.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction puis vortexer.
- Incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 1000 µL de réactif de liaison SimulTRAC-SNB puis agiter.
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 60 min, à l'abri de la lumière.
- Centrifuger pendant 10 min à 1000 g.
- Eliminer le surnageant.
- Compter la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma^③.

Calcul des résultats :

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

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

- La courbe et les résultats pour la vitamine B12 sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt⁵⁷ et pour les folates, ceux-ci sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage de l'Iode¹²⁵.
- Faire la moyenne des mesures des tubes 3 et 4 (tubes « neutres ») et soustraire cette valeur de toutes les autres mesures pour obtenir des valeurs corrigées.
- Faire la moyenne des mesures corrigées des tubes 1 et 2 pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage.
- Diviser la moyenne des mesures corrigées des tubes 5 et 6 par le nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B0 (ce coefficient ne doit pas dépasser 36%).
- Diviser les mesures corrigées de chaque tube par la moyenne corrigée des tubes 5 et 6 pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube.
- Tracer une courbe étalon : en abscisse la concentration des étalons de vitamine B12 en pg/ml et la concentration des étalons de folates en ng/ml et en ordonnée le pourcentage de niveau de marquage (B12 ou folates)/B0.



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



①Kit ICN Pharmaceuticals, Inc, USA coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals).

②DTT : Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

③Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France).

③Compteur COBRA-IIrTM autogamma (Packard) à double canal.

Coup total par minutes Cobalt 57 : 10.000-25.000

Coup total par minutes Iode 125 : 15.000-35.000

8.7. Fiche technique n°7 : Principe et utilisation de spectromètre de masse

La spectrométrie de masse nous donne des renseignements sur :

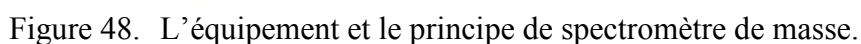
- **La masse moléculaire** d'un composé qui se calcule grâce à la valeur de la masse par rapport à la charge, et elle fournit alors l'identification de métabolites.
- **La structure** qui peut être observée grâce aux pics de fragmentation.
- **La mesure de la quantité**, une analyse quantitative peut être faite à partir de l'intensité des pics.

Le spectromètre de masse est dans la plupart des cas associé à une technique de séparation des composés d'un mélange, qui dans ce laboratoire est la chromatographie liquide.

Le spectromètre de masse qui a pour rôle la séparation des composés et l'identification des molécules. Pour cela le spectromètre de masse produit à partir de nos échantillons des ions qu'il va séparer en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et de leur affluence. Ici, dans le laboratoire, on utilise le spectromètre de masse 4000 Q TRAP® (AB Sciex) pour quantifier les acylcarnitines, l'HCY et le MMA qui nous intéresse dans cette étude. (Figure 48)

Un spectromètre de masse en tandem (MS/MS) a un collecteur d'ions et un deuxième analyseur de plus comparé à un spectromètre normal. La technique en MS/MS a la particularité de fragmenter les molécules d'intérêts dans la chambre de collision ou quadripôle Q2, pour une meilleure identification. Le spectromètre est donc composé d'un système d'introduction de la substance d'intérêt, d'une source d'ionisation, de deux triple quadripôles, d'une cellule de collision et d'un détecteur associé à un système de traitement des données. Le spectromètre 4000Q Trap est un spectromètre hybride avec en supplément une trappe qui permet une fragmentation supplémentaire. La trappe ionique favorise une spécificité et une sensibilité encore plus élevée pour des molécules de masse moléculaire faible mais pour les dosages de cette étude, elle n'est pas utilisée.

- Le premier élément du spectromètre de masse est **la source** dans laquelle l'échantillon est directement introduit. Elle permet d'ioniser positivement ou négativement les substances à analyser (aussi appelé ionisateur). Il existe différents types d'ionisation en fonction des molécules à analyser. Pour nos dosages le mode d'ionisation est l'électrospray ou électronebulisation. C'est une étape qui permet de volatiliser l'échantillon en passant d'une solution liquide à l'état gazeux. Pour cela on applique un fort champ électrique sur l'échantillon liquide qui traverse un capillaire. A la sortie de ce dernier de fines gouttelettes hautement chargées sont générées, elles vont rétrécir, par l'évaporation du solvant, jusqu'à ce que les forces coulombiennes approchent le niveau des forces de cohésion ce qui va provoquer une explosion. Les ions sont ainsi formés et vont aller, à l'aide de deux cônes (le « skimmer » et le « curtain plate ») et d'un potentiel électrique,



- 187

une molécule donnée formant un spectre de masse qui est la « carte d'identité » de la molécule. Dans cette technique l'analyseur est composé de trois quadripôles (Q) placés en série. Les quadripôles sont composés de quatre barres métalliques parallèles dans lesquelles on applique un potentiel continu (U) et un potentiel alternatif radiofréquence (V). Les barres sont successivement chargées négativement puis positivement. Un ion négatif est attiré par une barre avec un potentiel positif. Pour la séparation des ions en fonction de leur rapport m/z on fait varier les valeurs de la tension continue et alternative (le rapport U/V reste toujours constant). Ainsi les barres changent de charges et de ce fait l'ion rectifie sa direction et va aller sur une barre de signe positif (*cf. annexe 8*). Ainsi, les ions ont un trajet oscillant dans le quadripôle et arrivent au détecteur seulement si, grâce à leur rapport m/z , ils ont une trajectoire stable. Le reste est éliminé. L'ion parent est isolé de la molécule d'intérêt dans le premier quadripôle (Q1). La fragmentation de l'ion parent en ions fils, des fragments spécifiques de la molécule d'intérêt, se fait dans la chambre de collision Q2. Et pour finir, en Q3 se fait l'analyse des ions produits.

- Enfin le **détecteur** du courant ionique mesure le nombre d'électrons (forme un courant électrique) et amplifie le signal pour obtenir une sensibilité suffisamment bonne. Le signal est enregistré et on peut observer un spectre de masse grâce à un système informatique qui est couplé au détecteur.

Le spectre de masse est sous la forme d'un chromatogramme. L'axe des ordonnées représente l'abondance des ions. L'axe des abscisses représente les différents rapports masse/charge. On y observe un groupe de pics moléculaires (aussi appelé cluster moléculaire), on en observe du fait de l'existence d'isotopes.

Le spectromètre de masse sélectionne un ion caractéristique d'un composé, ce qui permet de quantifier ce composé non séparé d'un autre.

Le spectromètre de masse peut être utilisé en plusieurs modes différents, Multiple Reaction Monitoring, Precursor Ion Scan, Neutral loss, Product Ion Scan, Full Scan ou encore Single Ion Monitoring.

8.8. Fiche technique n°8. Analyse de profil des acylcarnitines

Le profil des acylcarnitines permet de diagnostiquer les déficits de l'oxydation mitochondriale des acides gras. L'analyse des acylcarnitines sur sang total (papier buvard) ou sur plasma permet le diagnostic d'un certains nombres de déficits.

Etape préanalytique

Le dosage se fait à l'aide d'un kit (Chromsystems ®) contenant : les phases mobiles, les standards internes lyophilisés, le réactif de dérivation, le tampon de reconstitution, la solution de rinçage, le tampon d'extraction, les plaques de 96 puits, les couvercles pour les plaques et le contrôle de sang séché sur papier buvard.

Toutes les acylcarnitines sont calculées par rapport à un standard interne. Il y a 13 standards internes, certains étant utilisés pour plusieurs acylcarnitines.

Un standard interne est une molécule qui a un deutérium, c'est-à-dire un proton H⁺. Cela permet de modifier la masse de la molécule et de la distinguer de l'analyte à doser tout en lui gardant les mêmes propriétés.

Le mode opératoire se fait dans l'ordre suivant :

- Reconstitution du mélange de standards internes

Celui-ci se présente sous forme de poudre et est reconstitué avec du méthanol. Une quantité constante est ajoutée dans chaque échantillon.

- L'extraction des acylcarnitines

Les protéines de l'échantillon sont précipitées au méthanol, l'échantillon centrifugé et l'on récupère le surnageant.

- L'évaporation

On va transférer le surnageant sur une plaque de 96 puits et on procède à l'évaporation par jets d'azote.

- La dérivation

La plaque doit être totalement sèche. On utilise du butanol, c'est le réactif de dérivation qui permet d'ajouter un groupement butylé sur les molécules de carnitines pour mieux les détecter (gain de sensibilité).

- Une nouvelle évaporation

Elle se fait de la même façon que précédemment. Puis l'échantillon est repris dans un volume donné de solvant.

- Injection

Pour les acylcarnitines il n'y a pas besoin de séparation au préalable donc on ne met pas de colonne. L'échantillon va aller directement dans le spectromètre de masse, c'est une injection en continue.

- La quantification

Le mode de quantification utilisé ici est le mode Precursor Ion Scan (Figure 49). Les acylcarnitines butylées possèdent un fragment caractéristique commun de $m/z = 85$. Cet ion fragment spécifique est sélectionné en Q3 et tous les ions parents qui donnent cet ion fils sont balayés en Q1. On obtient ainsi un profil de l'ensemble des acylcarnitines. Chaque pic est quantifié en fonction de sa hauteur par rapport à celle de l'étalon interne correspondant.

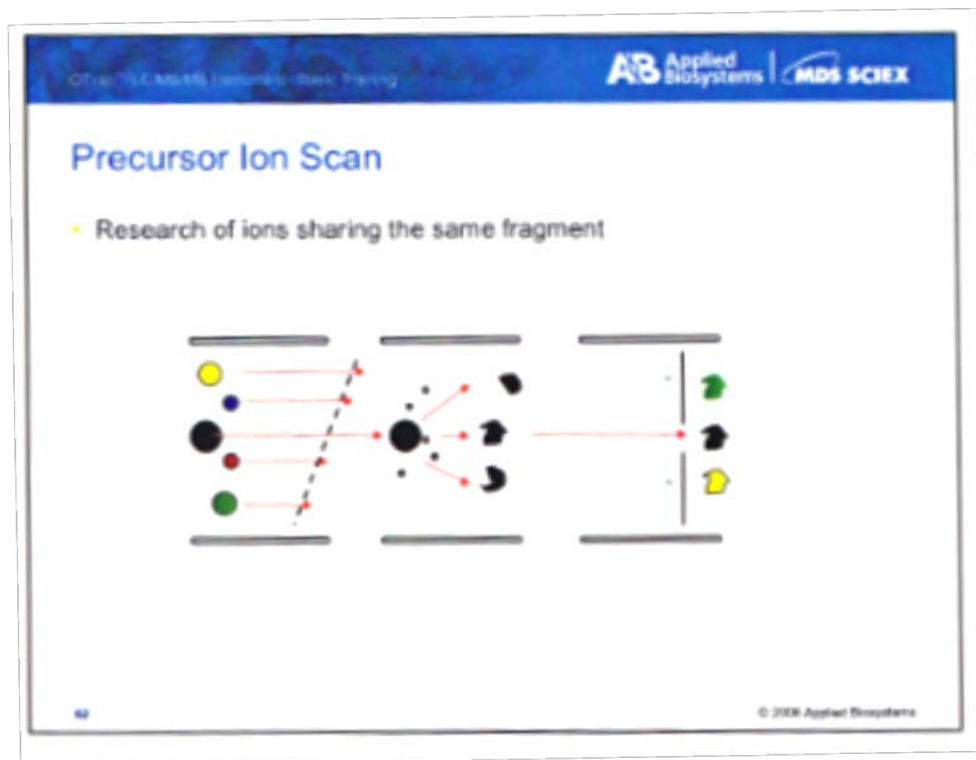


Figure 49. Le mode de quantification de spectromètre de masse par Précurseur Ion Scan.

8.9. Fiche technique n°9 : Dosage de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique

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

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

➤ Préparation des standards :

Préparation d'aliqots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L.

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

	Homocystéine ^① (MM 268,4)	Homocystéine d8 ^③ (98%)	MMA ^② (118.09 ; >99%)	MMA d3 ^④ (98%)
Poudre (mg) *	13.27	13.8	11.809	12.356
HCl 0.1 N (<i>T° amb, hormones</i>)	50 mL	50 mL		
	Vortexer, soniquer			
NaOH 10 M (+ <i>4°C, hormones</i>)	1 mL	1 mL		
DTT	132.7 mg	132.7 mg		
HCl 0,1 N	qsp 100 ml			
H₂O Milli Q			100 mL	100 mL
	Vortexer, soniquer		Vortexer, soniquer	
Concentration sol. mère	1 mM (d'homo-cystéine)	1 mM (d'homo-cystéine d4)	1 mM	1 mM
Aliquoter par fraction de 0,7 mL. Congeler à – 20°C.				

du produit.

➤ **Préparation de la gamme d'étalonnage :**

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

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

➤ **Préparation du mélange de standards internes :**

150 µL d' **HCYd4** à 1 mmol/L.

10 µL de **MMA d3** à 2 mmol/L.

4,5 ml de DTT^② 200 mmol/L.

➤ **Préparation des contrôles de l'homocystéine :**

Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé^⑤.

Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusqu'à dissolution totale. Aliquoter à 200 µL et conserver à -20°C.

➤ **Préparation de la solution d'extraction :**

MeOH 0,1% (v/v) d'acide formique^②.

❖ **Préparation des échantillons :**

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

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

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

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

- Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 ml (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LC/MSMS) par 400 µL d'H₂O 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5^{ème}).
- Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min.
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3).
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe).
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après.

❖ Méthodes :

- Lancement de la méthode LC/MSMS via Analyst :
 - Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method.
 - Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam.
2 périodes : MRM + pour HCY puis MRM – pour MMA (présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle).
 - Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf.



- ① DL Homocystine, Tréitol (DTT) en poudre (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).
 - ② Acide méthylmalonique, Acide Formique 98% : (Sigma-Aldrich, St Louis, USA).
 - ③ Standards internes (SI) d8 Homocystine (DLM 3619, Cambridge isotopes).
 - ④ MMA d3.
 - ⑤ Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyophilisé (Chromsystems).
- Colonne UPLC : Acquity UPLC HSS T3 (1,8µm ; 2,1 x 50 mm).
 - UPLC Acquity Waters, Boucle d'injection de 10 µL.
 - Spectromètre de Masse 4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex.

8.10.Fiche technique n°10 : Dosage des marqueurs du stress cellulaire (ALAT/ASAT)

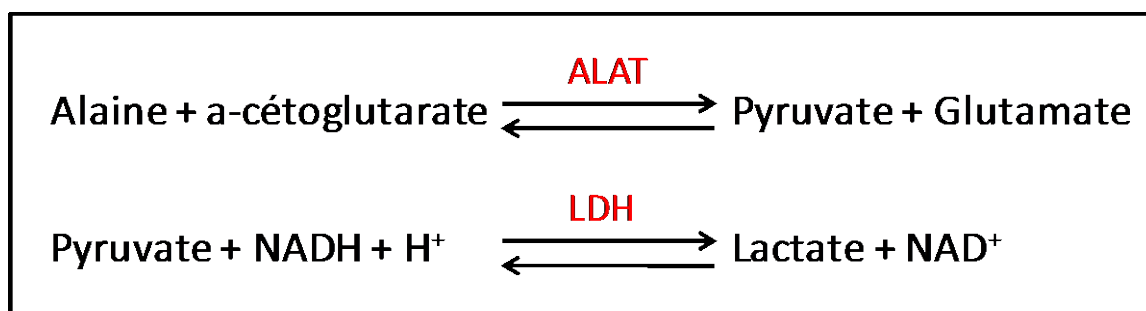
Principe :

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Ces enzymes sont présentes dans plusieurs tissus (foie, cœur, reins, muscles...) reflétant ainsi l'activité et la destruction des cellules de ces organes. L'augmentation de leur taux dans le sang témoigne d'une lésion cellulaire, le plus souvent dans le foie, parfois dans le cœur, les muscles ou les reins. Les principales causes d'augmentation du taux des transaminases dans le sang sont les anomalies hépatiques.

Les dosages sont basés sur la mesure cinétique des transaminases sériques dans un système réactionnel dont la finalité est l'oxydation du coenzyme NADH, H^+ .

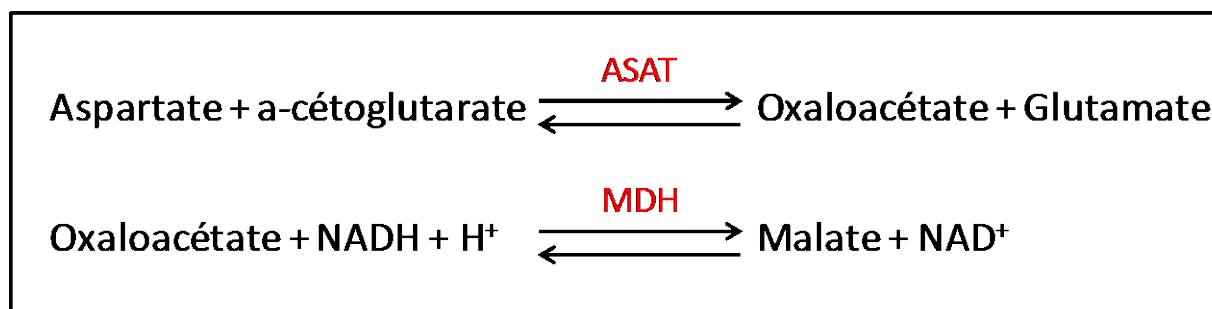
Technique :

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



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

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

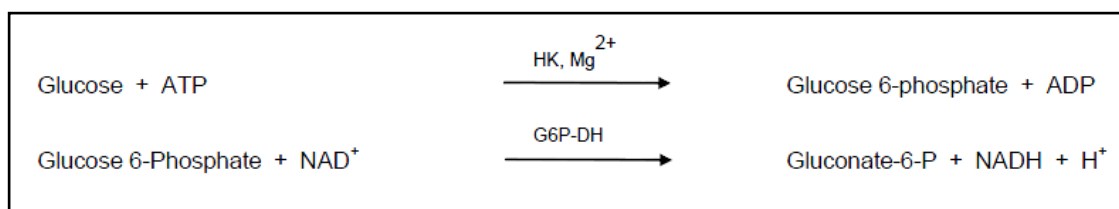


Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique, Olympus AU 2700 (Beckman Coulter, France). La solution de contrôle, les réactifs ainsi que 12 µL de chaque échantillon de sérum à doser ont été ajoutés à l'automate. La calibration de l'automate et le dosage des sérums ont été ensuite programmés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

8.11.Fiche technique n°11 : Dosage du glucose

Principe :

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



Technique :

Les mesures sont réalisées avec un automate multiparamétrique Olympus AU 2700® (Beckman-Coulter, France). Les réactifs sont prêts à l'emploi et peuvent être placés directement sur l'appareil. Les analyseurs Beckman Coulter calculent automatiquement les concentrations en glucose de chaque échantillon. Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de biochimie- biologie moléculaire-nutrition et métabolisme du CHU de Nancy-Brabois.

8.12.Fiche technique n°12 : Dosage de l'Insuline

Technique radioimmunologique, ImmuChem™ RIA Kit^①

Principe : Le dosage radioimmunologique dépend de la capacité d'un anticorps à se lier à son antigène. Pour quantifier l'antigène, les formes radioactives [Insuline- ¹²⁵I] et non radioactives de l'antigène sont en compétition pour les sites de liaison sur un anticorps spécifique. Plus l'antigène non radioactif est présent, moins l'antigène radioactif va se lier à l'anticorps. Lors du dosage de l'insuline par ImmuChem™^①, l'anticorps est lié de façon covalente à la surface intérieure d'un tube en polypropylène. Ainsi, le complexe antigène-anticorps lié est également lié à la paroi du tube. Il n'y a pas de deuxième anticorps, de charbon actif ou tout autre agent précipitant nécessitant une centrifugation. À la conclusion de l'essai, l'antigène libre est aspiré ou décanté.

La radioactivité [¹²⁵I] liée à l'anticorps, inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non-radioactive contenue dans les standards et les échantillons à doser, est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur gamma. L'insuline dans les échantillons est déterminée graphiquement à partir d'une courbe de standards d'insuline.

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial ImmuChem™^①.

NB: - Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (18-25°C) au moins 30 min avant leur utilisation.

- La distribution des réactifs dans les tubes revêtus s'effectue également à température ambiante.

- Les essais sont effectués en double pour les standards, les contrôles et les échantillons.

Méthode :

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

➤ **Reconstitution et dilution du traceur :**

- Reconstituer le lyophilisat d'insuline-[¹²⁵I] avec 5 mL d'eau distillée, bien mélanger.
- Compléter à 125 mL avec la solution tampon.
- Laisser 60 min à température ambiante.

➤ **Procédure de dosage :**

- Numéroté 14 tubes pour la courbe étalon, 2 autres pour les contrôles positifs et négatifs ainsi que les tubes pour les échantillons.

- Ajouter les standards, les contrôles et les échantillons à doser conformément aux indications données dans le tableau suivant :

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

- Ajouter 900 µL de solution active de marquage dans chaque tube. Agiter les tubes au vortex.
- Fermer les tubes et les incuber à température ambiante pendant 18 h.
- Décanner avec précaution et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur du papier absorbant.
- Laver chaque tube avec 4 mL d'eau distillée.
- Aspirer l'eau et sécher les tubes avec du papier absorbant.
- Mesurer la radioactivité des tubes vides (revêtus), l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma^②.
- Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en corrigeant s'il y a lieu par le facteur de dilution et calculer les résultats.



① ImmuChemTM Coated Tube Insulin ¹²⁵I RIA Kit, MP Biomedicals, LLC, USA.

② COBRA-IITM autogamma (Packard) à double canal.

8.13.Fiche technique n°13 : Calcul du HOMA-IR

La relation entre glycémie et insulinémie est bien connue et a conduit à l'élaboration de l'indice HOMA (Homeostasis Model Assessment), indice qui permet de mettre en évidence une résistance à l'insuline qui est un facteur de risque de diabète de type 2.

Après avoir dosé le glucose et l'insuline, il est ainsi possible de calculer l'indice HOMA-IR.

Un résultat trop élevé de l'indice HOMA indique la présence d'une résistance à l'insuline.

L'indice HOMA est basé sur une formule mathématique, présentée ci-dessous, permettant d'évaluer la résistance à l'insuline de manière simple et fiable.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{(\text{Insuline} \times \text{Glucose})}{22.5}$$

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

Pour la conversion des unités:

- Insuline: pour convertir des pmol/L en mUI/L, **pmol/L / 6,045 = mUI/L** .

- Glucose: pour convertir des g/l en mmol/l, **g/L x 5,5 = mmol/L** .

8.14.Fiche technique n°14 : Dosage de l'Angiotensine II

Technique radioimmunologique, RIA Kit^①

Principe :

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

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

Méthode :

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

➤ **Préparation des réactifs:**

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

➤ **Procédure de dosage:**

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

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

- Ajouter 100 µL d'anticorps primaire (anticorps lapin anti-peptide) dans chaque tube. Agiter les tubes au vortex.
- Couvrir les tubes et les incuber à 4°C pendant 24 h.
- Ajouter 100 µL de solution traceur [¹²⁵I] dans chaque tube. Agiter les tubes au vortex.
- Couvrir les tubes et les incuber à 4°C pendant 24 h.
- Ajouter 100 µL d'anticorps secondaire dans chaque tube (le sérum chèvre anti-lapin IgG, puis le sérum lapin). Agiter les tubes au vortex.
- Incuber à température ambiante pendant 90 min.
- Ajouter 500 µL de tampon RIA dans chaque tube puis vortexer.
- Centrifuger les tubes à 3000 rpm pendant 20 min à 4°C.
- Aspirer délicatement la totalité du surnageant de chaque tube.
- Mesurer la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma^②.
- Lire les valeurs des échantillons à partir de la courbe d'étalonnage en corrigeant s'il y a lieu par le facteur de dilution et calculer les résultats.



① Coffret commercial RIA (Radio-Immunoassay), Phoenix Pharmaceuticals, Inc, USA.

② COBRA-IITM autogamma (Packard) à double canal.

8.15.Fiche technique n°15 Traitement des échantillons tissulaires pour l'analyse histologique

- Après fixation pendant 24h dans le formol, les prélèvements sont mis en cassette.
- Ils sont ensuite déshydratés et imprégnés de paraffine dans un automate de type Excelsior ES^① par passages dans une série de bains successifs de formol, d'alcool, de toluène et de paraffine.
- A partir des blocs de paraffine ainsi obtenus, des coupes de 5 µM d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome.
- Ces coupes sont ensuite montées à l'eau albumineuse sur des lames de verre traitées à la poly-L-lysine^② pour les colorations ordinaires ou spéciales.



① Excelsior ES Thermoscientific, Pittsburg.

② Poly-L-lysine TM, VWR International, Leuven, Belgique.

8.16.Fiche technique n°16 : Réalisation de la coloration HES

Technique:

- Les coupes sont colorées dans un automate^① par bains successifs :
- Toluène^②
 - Alcool 100°^③
 - Alcool 95°^③
 - Hématoxyline^④
 - Eau acétifiée à 1% (eau + acide acétique)^⑤
 - Eosine 1%^⑥
 - Alcool 100°^③
 - Safran^⑦
 - Alcool 100°^③
 - Toluène^②
- Montage des lames avec lamelles 24x60mm^③ et Eukitt®^⑧.

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

- L' hématoxyline colore les noyaux en violet.
- L'éosine colore les cytoplasmes en rose.
- Le safran colore les fibres de collagène en jaune.



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

①Automate tissue-Tek DRS, Sakura, Nagano.

②Toluène, Carlo-Erba, Val de Reuil.

③Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois.

④Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hematoxylin, Thermoscientific.

⑤Eau acétifiée, Merck, Darmstadt.

⑥Eosine, Diapath, Microstain Division, Martinengo.

⑦Safran, Microm Microtech, Francheville.

⑧Eukitt®, Freiburg.

8.17. Fiche technique n°17 : Réalisation de la coloration Rouge Sirius

Technique:

➤ Déparaffinage et réhydratation des lames:

- Plonger la lame dans trois bains de xylène^① en agitant, 3x5 min.
- Plonger dans deux bains d'alcool absolu^② en agitant les lames, 2x3 min.
- Plonger dans un bain d'alcool à 80%^② en agitant, 2 min.
- Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée.

➤ Coloration:

- Plonger dans l'acide phosphomolybdique 0,2%^③, 1 min.
- Rincer à l'eau courante.
- Colorer au Rouge Sirius^④ (filtré avant l'emploi), 30 min.
- Rincer à l'eau courante.
- Plonger dans l'acide chlorhydrique 1N^⑤, 1 min.
- Rincer à l'eau courante.
- Rincer par un jet de pissette d'alcool à 95%^②.
- Rincer dans deux bains d'alcool absolu^② en agitant la lame.

➤ Xylène et montage:

- Plonger dans trois bains de xylène^① en agitant la lame.
- Monter la lame sous lamelle 24x60mm^② et Eukitt[®]^⑥.

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

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



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

① Xylène

② Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois.

③ Acide phosphomolybdique 0,2%

Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hématoxylins, Thermoscientific.

④ Rouge Sirius

⑤ Acide chlorhydrique 1N

⑥ Eukitt[®], Freiburg.

8.18.Fiche technique n°18 : Réalisation de la coloration Trichrome de Masson

Technique:

➤ Déparaffinage et réhydratation des lames:

- Plonger la lame dans trois bains de xylène^① en agitant, 3x5 min.
- Plonger dans deux bains d'alcool absolu^② en agitant les lames, 2x3 min.
- Plonger dans un bain d'alcool à 80%^② en agitant, 2 min.
- Réhydrater à l'eau courante puis à l'eau distillée.

➤ Coloration:

- Colorer à l'Hématoxyline^③, 10 min.
- Rincer à l'eau courante.
- Plonger dans l'eau ammoniacale^④ jusqu'à bleuissement de la coupe.
- Rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Colorer à la Fuchsine Ponceau^⑤, 10 min.
- Rincer à l'eau distillée.
- Plonger dans l'acide phosphomolybdique^⑥ (éclaircissement du rouge), 3 min.
- Colorer sans rincer par le bleu d'Aniline^⑦, 1 min.
- Plonger rapidement dans l'eau acétifiée^⑧ pour éliminer l'excès de colorant.
- Rincer dans deux bains d'alcool absolu^② en agitant la lame.

➤ Xylène et montage:

- Plonger dans trois bains de xylène^① en agitant la lame. Les coupes doivent être uniformément transparentes.
- Monter la lame sous lamelle 24x60mm^② et Eukitt[®]^⑨.

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

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



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

①Xylène

②Tous les produits sont fournis par VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois.

③Hématoxyline, Shardon Gill 2 Hematoxylin, Thermoscientific.

④Eau ammoniacale

⑤Fuchsine Ponceau

⑥Acide phosphomolybdique

⑦Bleu d'Aniline

⑧Eau acétifiée, Merck, Darmstadt.

⑨Eukitt[®], Freiburg.

8.19.Fiche technique n°19 : Extraction des protéines totales à partir de tissus

Avant de commencer :

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

Tampon RIPA	Concentration
NaCl (sodium chloride) ^①	8 g/L
Na_2HPO_4 (sodium phosphate anhydrous dibasic) ^①	1,44 g/L
KH_2PO_4 (potassium dihydrogen phosphate) ^①	0,24 g/L
NP40 (Nonidet P40) ^①	1%
DOC (Deoxycholate de sodium) ^①	0,5%
SDS (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) ^①	0,1%
PMSF ^①	10 $\mu\text{L/mL}$
Na_3VO_4 ^①	10 $\mu\text{L/mL}$
Cocktail d'inhibiteurs de protéases ^①	1,4 $\mu\text{L/mL}$

Procédure :

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

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote liquide et la carboglace et garder environ 60 mg de tissu puis conserver le reste à - 80°C.
- Reprendre le broyat tissulaire dans du tampon RIPA à raison de 550 μL de tampon pour 50 mg de tissu. (Ratio 1:11 volume)
- Incuber 10 minutes dans la glace.
- Homogénéiser en vortexant puis en passant le broyat dans une seringue de 1mL munie d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre (10 à 20 allers-retours).
- Effectuer 3 cycles de congélation-décongélation (azote-bain marie à 37°C).
- Ultra-soniquer 15 min à 4°C.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm à 4°C.

- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche technique suivant).
- Stocker les protéines à -80°C.

NB : Travailler toujours sur de la glace.



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

8.20. Fiche technique n°20 : Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

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

Procédure :

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



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

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

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

③ Réactif B : solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée.

④ Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA Protein Assay[®] Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA).

⑤ Lecteur de plaques Victor³ Wallac Multilabel, Perkin Elmer.

8.21.Fiche technique n°21 : Western Blotting

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

a- Préparation des gels d'électrophorèse:

- Laver les plaques de verre à l'eau distillée puis à l'alcool, puis les placer sur leur support séparées par des espaceurs (1,5 mm) et fixer l'ensemble sur le socle de coulage.
- Couler le gel de séparation ^① (préparé selon le tableau 8) entre les plaques de verre (prévoir 10mL de solution par gel) puis recouvrir la surface avec de l'isopropanol.
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante (le temps de polymérisation varie en fonction de la température ambiante).
- Aspirer l'isopropanol, rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée, tout en s'assurant par la suite de l'élimination de toute trace d'eau.
- Couler « en excès » le gel de concentration (préparé selon le tableau 8).
- Positionner le peigne en Téflon [®] en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser 15 min à température ambiante.
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration.
- Monter l'appareil de migration en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes.
- Remplir le réservoir central jusqu'en haut ainsi que la moitié de la cuve avec du tampon de migration ^② et contrôler l'étanchéité.

b- Préparation et dépôt des échantillons:

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

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

c- Migration à voltage constant:

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



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

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

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

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

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

Tableau 8. Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE Tris/Glycine Acrylamide 40%

2 gels : 20 mL		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6% ~200kDa	H ₂ O MQ	2,8	5,8	8,6	11,6	14,4	17,4	23,2	29,0
	Acrylamide Mix 29:1	0,8	1,5	2,3	3,0	3,8	4,5	6,0	7,5
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8% 100-200kDa	H ₂ O MQ	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10% 80-100 kDa	H ₂ O MQ	2,3	4,8	7,1	9,6	11,9	14,4	19,2	24,0
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12% 30-60 kDa	H ₂ O MQ	2,1	4,3	6,4	8,6	10,7	12,9	17,2	21,5
	Acrylamide Mix 29:1	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5	9,0	12,0	15,0
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15% < 30 kDa	H ₂ O MQ	1,7	3,5	5,3	7,1	8,8	10,6	14,2	17,7
	Acrylamide Mix 29:1	1,9	3,8	5,6	7,5	9,4	11,3	15,0	18,8
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
2 gels : 8 mL		1 ml	4 ml	8 ml	16 ml	24 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Stacking	H ₂ O MQ	0,72	2,92	5,83	11,66	17,49	4,37	5,83	7,29
	Acrylamide Mix 29:1	0,13	0,5	1	2	3	0,75	1,00	1,25
	Tris 0,5M pH 6,8	0,13	0,5	1	2	3	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,04	0,08	0,16	0,24	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,04	0,08	0,16	0,24	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,004	0,008	0,016	0,024	0,006	0,008	0,01

1- Transfert des protéines sur membrane :

a- Préparation du transfert:

- Equilibrer les éponges et les papiers filtre dans du tampon de transfert froid (30min minimum).
- Couper la membrane PVDF^① (polyvinylidène fluoride) ou en nitrocellulose^② à la dimension du gel (7x8,5 cm).
- Immerger uniquement la membrane PVDF dans du méthanol pour l'activer (perméabilisation de la membrane) pendant au moins 30sec, puis la tremper dans du tampon de transfert froid pendant environ 5 min.
- Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer le gel d'électrophorèse dans le tampon de transfert^③ froid (5mn maximum).

b- Electro-transfert liquide:

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - éponge
 - un papier filtre^④
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre^④
 - éponge
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique sur le sandwich puis fermer la cassette.
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle.
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert froid.
- Brancher l'appareil de transfert^⑤ sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 350 mA pendant 45min. Afin de s'assurer que le tampon de transfert ne chauffe pas trop durant le transfert ajouter un pain de glace et un barreau aimanté dans l'appareil puis le placer sur un agitateur électrique.

c- Fin et vérification du transfert:

- Démonter le sandwich et récupérer la membrane puis repérer les standards de poids moléculaires.

- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S^⑥ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane avec du tampon de lavage TBST^⑦.

d- Blocage:

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane dans du tampon de blocage^⑧ pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente.

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

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



① Membrane polyvinylidène difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,45 ou 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

② Membrane nitrocellulose, porosité 0,45 ou 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

③ Tampon de transfert : Tris 480 mM, glycine 390 mM, SDS 0,375% (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl).

④ Papier filtre Whatman d'épaisseur 1 mm ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

⑤ Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories).

⑥ Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

⑦ Tampon de lavage : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,05% (v/v).

⑧ Tampon de blocage : (TBST) Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20[®] à 0,3% (v/v) et 5% de lait en poudre écrémé ou de la BSA (Bovine serum albumin).

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

- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (Tableau 9) dans du tampon de blocage^① pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petites pochettes scellées, après avoir enlevé toutes les bulles.
- Laver la membrane 4 fois 10 min avec le tampon de lavage TBST^②, sous agitation forte.
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaire conjugué à la peroxidase (Tableau 10) pendant 1 h à température ambiante, sous agitation rotative lente, dans de petites pochettes scellées, après avoir enlevé toutes les bulles.
- Laver la membrane 4 fois 10 min avec le tampon de lavage TBST, sous agitation forte.
- L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence^③ :
 - Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique.
 - Appliquer sur la membrane le volume de mélange réactionnel indiqué par le fournisseur, laisser agir 5 min puis sécher la membrane.
 - Disposer la membrane sur un film plastique.
- Révélation des bandes protéiques en utilisant un système détecteur Fusion-FX7^④ : pour une première révélation, utiliser l'option « auto-exposure » (calcul automatique de la durée d'exposition) puis réajuster le temps d'exposition si nécessaire.



① Tampon de blocage : Tampon TBST et 5% de lait en poudre écrémé ou de la BSA, 5mL par membrane.

② Tampon de lavage : TBS contenant Tween[®] 20 à 0,05% (v/v).

③ ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense.

④ Détecteur Fusion-FX7 (Fisher, S/N 10-201068).

Tableau 9. Conditions et anticorps primaires de western-blot pour chaque protéine (22 protéines).

Protéines	Référence	Taille (kDa)	Gel (%)	Membrane du transfert	Bloquant	Anticorps I	Anticorps II
PGC1 α	NB100-60955 interchim	113	10	Nitro 0.2 Nitro 0.45	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST	1/2000 Goat BSA-TBST
PPAR α	101710 Cayman	57	10	Nitro 0.2	Lait-TBST	1/1000 Lait-TBST	1/5000 Rabbit Lait-TBST
PPAR γ	ab19481 abcam	58	10	Nitro 0.2	Lait/BSA-TBST	1/800 BSA-PBS 1x à centrifuger	1/2500 Rabbit BSA-PBS 1x
SIRT1	sc-15404 Santa cruz	80	10	Nitro 0.2 Nitro 0.45	BSA-TBST	1/700 BSA-TBST	1/2000 Rabbit BSA-TBST
Glut4	2213 Cell Signaling	50	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST	1/2000 Mouse BSA-TBST
ER α	SC-542 Santa cruz	58	10	Nitro 0.2	Lait-TBST	1/700 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
ERR α	04-1134 millipore	53	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/700 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
AT1/ AGTR1	sc 31181 Santa cruz	43	10	Nitro 0.2	Lait-TBST	1/700 BSA-TBST	1/2000 Goat BSA-TBST
AT2/ AGTR2	62361 Gene Tex	45	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
AGT/Angio-tensinogen	37789 Gene Tex	53	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/700 BSA-TBST	1/2000 Rabbit BSA-TBST
TGF- β 1	sc-31609 Santa cruz	12.5; 25	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST	1/3000 Goat BSA-TBST
NF κ B	4764 Cell signaling	65	10	PVDF 0.2	BSA-TBST	1/700 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
BMP7	ab54904 abcam	49	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/700 BSA-TBST	1/2000 Mouse BSA-TBST
MMP14	ab73879 abcam	56	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
MMP2	ab37150 abcam	72	10	PVDF 0.2	Lait-TBST	1/500 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
NOX2	19013-1-AP Proteintech Group	55	10	PVDF 0.2	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST à centrifuger	1/5000 Rabbit BSA-TBST
NOX4	14347-1-AP Proteintech Group	62	10	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/1000 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
IL1 β	ab9787 abcam	p17 p31	12	Nitro 0.2	Lait-TBST	1/2000 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
Caspase 1	ab108362 abcam	20; 46	12	PVDF 0.2	Lait-TBST	1/500 Lait-TBST	1/5000 Rabbit Lait-TBST
a-SMA	ab5694 abcam	42	12	Nitro 0.2	Lait-TBST	1/400 BSA-TBST	1/5000 Rabbit BSA-TBST
Col 1A1	sc-8784	70-90 ; 140-210	8	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/200 BSA-TBST	1/2000 Goat BSA-TBST
Col 1A2	sc-8788	70-90 ; 130-140	8	Nitro 0.2	BSA-TBST	1/200 BSA-TBST	1/2000 Goat BSA-TBST

Note du tableau n°9 : Tous les anticorps primaires sont incubés dans la chambre froide à 4°C sous agitation lente pendant une nuit, membranes imbibés dans anticorps sont soudés dans la pochette. Tous les anticorps secondaires sont incubés à la température ambiante pendant 1h sous agitation lente. Préparation d'anticorps primaire PPAR γ : dilution 1/800 dans BSA-PBS 1x et à centrifuger 10,000xG pendant 10 minutes en condition 4°C. Anticorps primaire NOX2 est à centrifuger 10,000xG pendant 10 minutes en condition 4°C également. SIRT1 est à 80kDa chez l'échantillon animal et 110 kDa chez l'échantillon cellulaire. TGF- β 1 ont deux molécules 12.5kDa (mature) et 25kDa (précurseur). IL1 β ont deux molécules 17.3kDa (IL1 β p17 clivé) et 31kDa (IL1 β p31 précurseur). Caspase 1 ont deux molécules 20kDa (clivé) et 46kDa (précurseur). Le transfert a été en liquide.

Tableau 10. Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Anticorps secondaires	Sources	Dilutions	Fournisseurs
<i>Horseradish peroxidase-conjugated anti-</i>	Goat	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Rabbit	1/5000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Chicken	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	Mouse	1/2000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)

8.22. Fiche technique n°22 : Déshybridation de membrane après western blotting (stripping)

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

- Chauffer le tampon entre 37 et 50°C.
- Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon de déshybridation^① chaud.
- Immerger les membranes dans les bacs pendant 30 min dans un bain-marie en agitant de temps en temps.
- Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée.
- Rincer ensuite avec du tampon de lavage TBST^② 2x10 min sous agitation rapide.
- Reprendre le protocole de western à partir du tampon de blocage.



① Tampon de déshybridation : Pour 1 litre, 100 mM 2-mercaptoethanol 7 ml, 2 % SDS 20g, 62,5mM Tris HCL pH 6,7 7,57g.

② TBST 10x : Pour 1 litre, Tris 200 mM 24,2g, NaCl 1,5 M 87,5g, pH 7,4 à ajuster avec HCl qsp H2O MilliQ. Conserver à 4°C.

8.23. Fiche technique n°23 : Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel Statview v.5 (SAS Institute, Berkley, Californie, USA) et le logiciel Stata version 12.0 SE (StataCorp, Texas, USA). Nous avons calculé les moyennes $\pm$ écartypes. Pour les analyses biologiques et la DXA, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Les données de Western-Blot ont été comparées par une analyse de la variance (Test one-way ANOVA) à un facteur. Concernant les changements d'expression de protéine, nous avons exprimé les données en «arbitrary unit» par tomодensitométrie en divisant par le protéine de référence. Les valeurs de $p < 0.05$ ont été considérées comme significatives.

A J50, nous avons comparé le groupe contrôle au groupe iMDD. A J185, nous avons comparé les différences entre les groupes contrôle versus iMDD ; contrôle versus contrôle/HF ; contrôle versus iMDD/HF ; iMDD versus iMDD/HF ; contrôle/HF versus iMDD/HF.

Les résultats de significativité ont été indiqués par des astérisques (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$).

8.24. Fiche technique n°24 : Transformation des unités équivalents pour certains paramètres

Folate	1 ng/ml	1 ug/L	2.266 nmol/L
Vitamine B12	1 pg/ml	1 ng/L	0.738 pmol/L
Insuline	1 uIU/ml	1 mIU/L	
Insuline	1 pmol/L	0.144 mIU/L	
Glucose	1 mmol/L	0.18 g/L	
Triglycéride	1 mmol/L	0.885 g/L	
Cholestérol total	1 mmol/L	0.386 g/L	
HDL-Cholestérol	1 mmol/L	0.386 g/L	
LDL-Cholestérol	1 mmol/L	0.386 g/L	

1 mg/dl = 10^{-2} g/L

Résumé :

L'obésité, un problème de santé mondial, est associée à des comorbidités telles que le syndrome métabolique, la stéato-hépatite non alcoolique, la cardiomyopathie métabolique etc. Leur incidence et développement peuvent être le résultat des interactions gènes-environnement. Ces dernières années, une série d'études expérimentales et cliniques ont montré l'implication de donneurs de méthyles dans ces pathologies via la programmation fœtale. Notre travail a évalué, à la fois le rôle de donneurs de méthyles et le profil métabolique dans une population d'obèses, puis sur un modèle animal de rats avec une carence en donneurs de méthyles, soumis à la vie adulte à un régime hyper-énergétique. Chez l'homme, nous avons démontré qu'une carence en vitamine B12 associée à un excès de folates est liée à l'insulino-résistance. Puis, nous avons observé des anomalies du métabolisme des acides gras. Chez l'animal, nous avons montré que la carence en donneurs de méthyles provoque une hypertension artérielle systémique et une fibrose cardiaque, surtout chez les femelles. Par contre, chez les mâles, nous avons observé une stéatose hépatique dans le groupe des rats mâles carencés et soumis à un régime hyper-énergétique. En conclusion, la carence en donneurs de méthyles est associée aux maladies chronico-dégénératives.

Mots clés : Obésité, syndrome métabolique, NAFLD, cardiomyopathie, donneurs de méthyles

Summary:

Obesity, is global health problem, is associated with comorbidities such as metabolic syndrome, nonalcoholic steatohepatitis, metabolic cardiomyopathy etc. Their incidence and development may be the result of gene-environment interactions. In the last years, the experimental and clinical studies have shown the involvement of methyl donors in these pathologies via « fetal programming ». Our work has evaluated the role of methyl donor on metabolic profile in obese subjects, and also in an animal model of pups with a deficiency of methyl donors, subject to high-fat diet in adulthood. In humans, we have demonstrated that vitamin B12 deficiency associated with excess in folates, is linked to insulin resistance. Also the methyl donors have an influence on fatty acid metabolism. In animals, we have shown that deficiency of methyl donors causes systemic hypertension and cardiac fibrosis, especially in females. In contrast, the males methyl donor deficient with a high fat diet had an important steatosis. In conclusion, the methyl donor shortage is associated with chronic degenerative diseases.

Keywords: Obesity, metabolic syndrome, NAFLD, cardiomyopathy, methyl donors