

Ariane Giacobino, Marc Petitpierre, Hong Guang Dong

## Acupuncture et stress : une contribution épigénétique

**Résumé :** le stress induit des modifications épigénétiques durables. L'acupuncture soulage efficacement et souvent de manière prolongée les patients stressés, et nous avons émis l'hypothèse que cet effet bénéfique pouvait se situer au niveau épigénétique. Cette idée semble confirmée par cette petite étude préliminaire, qui montre sur une petite cohorte de patients, avant et après traitement, une diminution significative du niveau de méthylation du gène *BDNF*. Nous pensons que ces résultats préliminaires justifient l'exploration sur un plus grand nombre de patients des modifications épigénétiques induits par l'acupuncture. **Mots-clés :** acupuncture - épigénétique - gène *BDNF*.

**Summary :** Stress is responsible of epigenetic modifications. Acupuncture has a good and sometimes long lasting effect on stressed patients, and our hypothesis was that one of the effects of this treatment could be at the epigenetic level. This seems to be confirmed by this small pilot study, which shows on a small cohort of patient, before and after acupuncture treatment, significant changes in the methylation level of *BDNF* gene, which decreased of about 50% after treatment.

We believe that these preliminary results should be the start for the exploration of epigenetic changes of a larger cohort of patients undergoing acupuncture treatment. **Keywords:** acupuncture - epigenetics - *BDNF* gene

### Introduction

Il est démontré que le stress pré et postnatal modifie de manière durable l'activité des gènes liés au système du stress, et, entre autres effets, entraîne une régulation à la baisse de l'expression du gène *BDNF* (Brain Derived Neurotrophic Factor).

L'expérience clinique nous montre que l'acupuncture amène un soulagement significatif des symptômes cliniques liés au stress ; cet effet persiste souvent bien au-delà du traitement, suggérant l'existence d'une action profonde et durable qui ne peut être expliquée par la simple libération d'endorphines ou autres neuromédiateurs.

Selon la théorie de la MTC (Médecine traditionnelle chinoise), le système des Cinq Mouvements établit par l'intermédiaire du méridien *shaoyin* une relation réciproque entre le Rein et le Cœur ; le Rein contient l'Essence du Ciel antérieur, qui correspond à notre concept moderne de génome, et le Cœur abrite le *shen*, qu'on peut définir de manière simplifiée comme l'Esprit, ou la Conscience. Cette influence réciproque prédit que notre génome influence notre esprit, ce qui est largement accepté en médecine occidentale, mais aussi que des événements psychiques peuvent, à l'inverse, influencer notre génome, avec la possibilité d'une transmission transgénérationnelle.

Cette idée semblait il y a encore peu assez incongrue ; mais les développements de l'épigénétique nous ont ouvert à l'idée que l'environnement au sens large (toxique, climatique, alimentaire, psychique) pouvait, dans un but adaptatif, modifier de manière durable l'expression du génome et la fonctionnalité de nos gènes. Notre hypothèse de travail a donc été que les bénéfices cliniques de l'acupuncture dans le traitement du stress pouvaient être exprimés et mesurés en tant que modifications épigénétiques de gènes spécifiques, comme cela semble être le cas pour la psychothérapie [1].

Nous nous sommes focalisés sur la méthylation en tant que meilleur marqueur des modifications épigénétiques. La technologie utilisée dans ce but a été le pyroséquençage, un outil de découpage permettant le séquençage et l'analyse du niveau de méthylation d'une région génétique spécifique.

### Méthodologie

Nous avons sélectionné pour cette étude des patients consultant pour un problème de stress, dans le cadre de pathologies variées ; le stress n'est en effet pas un diagnostic en soi, mais apparaît dans différentes situations cliniques : dépression, anxiété, attaques de panique, etc. Le traitement a été fait dans le cadre d'une consultation

médicale normale, « à l'occidentale », c'est-à-dire à raison d'une séance par semaine initialement, pour un total de 4 à 6 semaines ; puis toutes les deux semaines voire moins, en fonction du résultat clinique.

Le même médecin a traité tous les patients ; les aiguilles ont été légèrement manipulées, de manière à obtenir le *deqi* (plutôt la sensation du médecin que celle du patient), et laissées en place pour 25 minutes. Il n'y a pas eu d'électrostimulation.

Les points ont été choisis selon le diagnostic chinois traditionnel, et n'ont pas été exactement les mêmes pour les différents patients, ou pour le même patient d'une séance à l'autre ; les plus utilisés ont été *taixi* 3R et *zhubin* 9R (« point de la mauvaise hérédité » selon Soulié de Morant), *shenmen* 7C, *neiguan* 6MC, *hegu* 4GI, *taichong* 3E, *shenting* 24DM, *benshen* 13VB, *lieque* 7P, *baihai* 20DM ou encore *sishencong*.

Le nombre de sessions a été en moyenne de huit à dix sur les six mois de l'étude.

Un échantillon de sang complet a été envoyé à l'unité de génétique des hôpitaux universitaires de Genève avant le traitement, et à nouveau après six mois, délai choisi pour laisser le temps à une modification épigénétique de se produire.

La faisabilité d'une telle étude a tout d'abord été démontrée sur les premiers patients : conservation de l'échantillon au cabinet, son transfert, et possibilité d'extraction d'ADN de bonne qualité et quantité pour permettre l'analyse de méthylation. Toutes les analyses ont été faites en double pour chacun des gènes et des cas, de manière à éviter qu'un artefact technique imprévu puisse modifier les résultats sur un petit nombre de cas.

### Technique d'analyse épigénétique

Nous avons effectué des analyses épigénétiques ciblées sur les gènes suivants : *NR3C1* : nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (récepteur glucocorticoïde), *BDNF* : brain-derived neurotrophic factor (facteur neurotrophique dérivé du cerveau), *OXTR* : oxytocin receptor (récepteur oxytocine). Pour chacun des gènes, l'analyse a été effectuée sur une région spécifique, dans laquelle de précédentes publications avaient décrit des

modifications épigénétiques en rapport avec des changements environnementaux.

Tous les ADNs ont été extraits des échantillons sanguins au moyen de l'illustra Nucleon Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare, Dubendorf, Suisse). La conversion par traitement bisulfite des cytosines non-méthylées en uracil a été effectuée sur 2 µg d'ADN au moyen de l'EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Allemagne). Les échantillons traités par cette technique ont été ensuite resuspendus dans 20 µl de tampon EB. Pour le gène *NR3C1*, nous avons analysé 13 sites CpG. La séquence des oligonucléotides est : NR3HumF : 5'-TTTGAAGTTTTTTTAGAGGG-3' et NR3HumR : 5'-biotin-7-CCCCCAACTCCCCAAAAA-3', NR3HumS1 : 5'-GAGTGGGTTTGGAGT-3'.

Pour le gène *BDNF* nous avons analysé 13 sites CpG dans la partie décrite comme le promoteur I. La séquence des oligonucléotides est : BDNFF : 5'-GGGTAAAAAAGGAAATTTTTAGAAAAGT-3', BDNFR : biotin-5'-ACTATTAACCTCACATTTAAAAAACCATA-3', BDNFS : 5'-TTTTTTTTTTTATTATGATTAAGGGTT-3'.

Pour le gène *OXTR*, 1 site CpG a été analysé. La séquence des oligonucléotides est : OXTRF : 5'-TTGAGTTTTGGATTTAGATAATTAAGGATT, OXTRR : 5'-biotin-7-AATAAAATACCTCCCCTCCTTATTCCTAA-3', OXTRS : 5'-AGAAGTTATTTTATAATTTTT-3'.

Les conditions d'amplifications par PCR étaient : 95°C durant 15 minutes, suivies de 50 cycles de 30 secondes à 95°C, puis de 30 secondes à 58°C, et 72°C durant 10 secondes. Ces températures optimales ont été déterminées expérimentalement par gradient de température. Un contrôle négatif sans ADN était associé à chaque PCR et une électrophorèse sur gel d'agarose était réalisée pour vérifier l'absence d'amplification non spécifique.

Les produits d'amplification PCR ont ensuite été immobilisés sur des billes de sépharose-streptavidine (Fisher Scientific, réf 17-5113-01) en utilisant un instrument de mise sous vide (Biotage), lavés dans de l'éthanol 70 %, et dénaturés dans du NaOH 0.2 M.

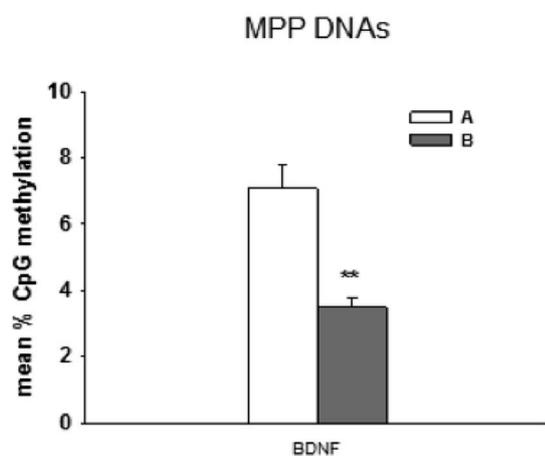
Les ADN simple brin ont été ensuite lavés dans du Tris-acétate 10 mM pH 7,6 avant d'être transférés dans du Tris 20 mM, MgAc<sub>2</sub> 2mM contenant 15 pmol de l'oligonucléotide F (avant) dans un volume final de 40 µl avec agitation lente. Les molécules d'ADN résultantes ont ensuite été séquencées dans un appareil PSQ 96 MA (Qiagen) avec les enzymes, substrats et nucléotides appropriés (Réactifs PyroMark Gold Q96 SQA, Qiagen).

La significativité a été évaluée au moyen du test t de Student par séries appariées, et fixée à  $p < 0,05$ .

## Résultats

Sur les quinze patients sélectionnés au départ, huit ont complété l'étude : un homme et sept femmes, avec un âge moyen de 49,3 ans. Six mois est une longue période, et sept patients ont été perdus pour différentes raisons : déménagement, bonne amélioration ou absence de résultat. Parmi les patientes qui ont terminé l'étude, l'une avait un traitement anxiolytique et antidépresseur lourd, et une autre a été vue cinq fois au début de l'étude, mais n'est revenue qu'après six mois pour l'examen de contrôle.

Tous les patients qui ont terminé l'étude ont été cliniquement améliorés ; quant à l'analyse de l'ADN, elle montre pour tous les cas une modification nette de la méthylation du promoteur du gène *BDNF*, dans le sens d'une diminution de l'ordre de 50%, témoignant donc d'une augmentation de l'activité de ce gène (figure 1).



**Figure 1.** Pourcentage moyen de méthylation de la région cible du promoteur du gène *BDNF*, entre les 2 groupes (Groupe A : avant traitement, groupe B : après traitement). \*\*  $p < 0,01$ .

Cela va dans le sens de ce qui a été décrit, la méthylation de ce gène étant plus importante dans les états de stress post-traumatique et dans des environnements psychologiques délétères que chez des sujets contrôles ou considérés « sains ». À noter aussi qu'une modification de la méthylation du gène a été décrite en association avec une diminution des scores de dépression après psychothérapie chez des sujets avec une psychopathologie.

Les conséquences épigénétiques du stress maternel sur le fœtus sont bien établies, comme celles des situations de stress postnatales. Dans notre étude, le stress, bien qu'il ne s'agisse pas d'un diagnostic en soi, était le symptôme principal dont se plaignaient les patients. Les gènes analysés ont tous été liés dans des publications précédentes à des situations de stress, de traumatisme, ou des conditions psychiatriques.

Nous n'avons pas noté par contre de modification en ce qui concerne *NR3C1* et *OXTR*.

## Discussion

Le BDNF (Brain Derived Neurotrophic factor) est un membre de la famille des neurotrophines, qui sont des régulateurs importants du développement, de la plasticité et de la survie des neurones [2]. Une déficience de ce facteur peut entraîner des problèmes neurologiques et psychiatriques variés [3].

Les résultats obtenus, bien que sur un petit nombre de cas, témoignent de la faisabilité d'une telle étude ; par ailleurs, les modifications de méthylation notées sont cohérentes par rapport aux travaux déjà publiés dans le domaine de l'épigénétique et nous permettent d'expliquer de quelle manière l'acupuncture peut, sans modifier leur séquence, affecter l'expression des gènes. Comme ces modifications épigénétiques peuvent être conservées lors de la division cellulaire, on peut s'attendre à leur persistance sur le long terme.

Il s'agit là d'une étude préliminaire, sans groupe contrôle, mais le fait que nous ayons noté chez tous les patients une diminution de l'ordre de 50% de la méthylation du gène *BDNF* après le traitement est significatif et montre que l'une des actions de l'acupuncture pourrait être une régulation de l'activité des gènes ; ceci pourrait expliquer

le fait que certains des effets de l'acupuncture puissent apparaître tardivement, mais persistent longtemps.

Cet effet de l'acupuncture sur la régulation du BDNF est connu dans des modèles animaux, où l'on étudie les effets de l'acupuncture sur la régénération du tissu nerveux après lésion iatrogène ; mais tous ces travaux utilisent l'électroacupuncture, et un des intérêts de cette petite étude est de montrer que l'acupuncture telle que nous la pratiquons quotidiennement en cabinet, sans électroacupuncture, sans grande manipulation des aiguilles, et avec relativement peu de séances par rapport à la pratique chinoise, est également efficace.

De manière intéressante, l'effet sur le gène *BDNF* a été le même pour la patiente qui prenait de fortes doses d'anxiolytiques et d'antidépresseurs ; ceci suggère que l'effet des aiguilles est différent de celui des psychotropes, ou qu'il augmente l'effet de ces traitements. Il ne semble donc pas inutile d'utiliser l'acupuncture chez des patients sous traitement pharmacologique.

Un autre cas intéressant est celui de cette patiente qui n'est revenue pour son contrôle sanguin que cinq mois après une série de cinq séances. La baisse de la méthylation du gène *BDNF* a été la même que pour les autres patients, ce qui conforte l'idée d'un effet durable de l'acupuncture.

Pour terminer, au-delà du problème du stress, cette action de l'acupuncture sur le *BDNF* ouvre des perspectives sur l'emploi des aiguilles dans certaines affections

neurologiques, et plus particulièrement neuro-dégénératives [4], ce qui est bien entendu intéressant si on considère le poids humain et économique de ces affections.

## Conclusion

Les situations de stress, d'anxiété, de dépression, et de douleurs chroniques, ont pour conséquence une modification épigénétique du gène *BDNF*, dans le sens d'une augmentation de sa méthylation, donc d'une diminution de la production de ce facteur neurotrophique.

Nos résultats, sur un petit nombre de patients, avant et après acupuncture, montrent une diminution significative de ce degré de méthylation (donc une augmentation de la production de BDNF), de l'ordre de 50%.

Un des modes d'action de l'acupuncture pourrait donc se situer à ce niveau, ce qui expliquerait les effets parfois tardifs, mais persistants de cette thérapie.

Pour les praticiens que nous sommes, il est intéressant de voir que ces résultats sont obtenus dans une pratique de cabinet tout à fait classique, sans électrostimulation, et avec un minimum de manipulation des aiguilles.

Nous pensons que ces résultats devraient nous encourager à explorer sur une plus grande cohorte de patients les effets épigénétiques de l'acupuncture, qu'il s'agisse de stress, d'affections neuro-dégénératives, ou d'autres pathologies.



D<sup>r</sup> Ariane Giacobino, PD  
FMH en Génétique Médicale  
Service de médecine génétique,  
Hôpitaux Universitaires de Genève,  
✉ : Ariane.Giacobino@unige.ch  
Conflit d'intérêts : aucun



D<sup>r</sup> Marc Petitpierre  
Médecine générale FMH, acupuncture ASA,  
Association Romande des Médecins Acupuncteurs,  
Genève  
✉ : mpetitpierre@bluewin.ch  
Conflit d'intérêts : aucun



D<sup>r</sup> Hong Guang Dong  
Hôpital de la Tour, Genève  
✉ : hong\_guang.dong@latour.ch  
Conflit d'intérêts : aucun

## Références

1. Perroud N et coll. Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Translational Psychiatry*. 2013;3:e207.
2. Lu B, Figurov A : Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci*. 1997; 8(1):1-12.
3. Autry AE, Monteggia LM: Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev*. 2012; 64(2):238-58.
4. Zeng B-Y, Salvage S, Jenner P. Current Development of Acupuncture Research in Parkinson's Disease; *International Review of Neurobiology*, Volume 111, Chapter 7, 2013.