UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Par

Racha KEREK

Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur le développement cérébral : Implication du programme neurogénique et rôle de l'homocystéine

Le 16 Décembre 2013

Membres du jury

Rapporteurs:

M. Régis Guieu	PU-PH, FRE CNRS 2738, Marseille, France
M. Patrick Anglard	Ditrecteur de recherché Inserm, UMR 7364, Strasbourg, France

Examinateurs:

M. Jean-Michel Camadro	Directeur de recherche, UMR7592 CNRS, Paris, France
M. Jean-Louis Guéant	PU-PH, UMR 954 Inserm, Nancy, France
Mme. Carine Bossenmeyer-Pourié	MCF, UMR 954 Inserm, Nancy, France, Co-directeur de thèse
M. Jean-Luc Daval	Directeur de recherche Inserm, UMR 954 Inserm, Nancy, France Directeur de thèse

Invité:

M. Simon Thornton	Pr, UMR Inserm 308, Nancy, France

UMR 954 Inserm, Laboratoire de Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux,
9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

« La sagesse suprême est d'avoir des rêves assez grands pour ne pas les perdre du regard tandis qu'on les poursuit »,

William Faulkner

Je tiens à remercier Monsieur le professeur J-L. GUEANT, directeur de l'unité Inserm U954 pour son accueil. Il m'a donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire pour mon master et puis il a renouvelé sa confiance pour m'accueillir en thèse tout en fournissant le cadre nécessaire à sa réalisation. Veuillez trouver le témoin de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Dr. Jean-Luc Daval, directeur de thèse,
Je tiens à le remercier pour son accueil, ses conseils, son calme, sa patience et sa manière de travailler avec le plus grand sérieux sans négliger la petite touche de gentillesse, qui fait avancer toute l'équipe dans les meilleures des conditions.

A Madame Carine Bossenmeyer-Pourié, co-directrice de thèse,
Merci pour s'être engagée dans la co-direction de ce travail, pour m'avoir guidée, conseillée et enseignée les réflexes du bon chercheur. Sa passion insatiable pour la recherche est réellement transmissible et bienfaisante. Son intelligence et sa vision pour la recherche plus que motivantes m'ont permis d'acquérir énormément.

A Monsieur le Pr. Régis Guieu et Monsieur le Dr. Patrick Anglard, rapporteurs de ma thèse,
Je suis honorée qu'ils aient accepté de juger ce manuscrit de thèse. Mes plus sincères remerciements pour leur participation et pour avoir consacré une partie de leur temps, en tant que rapporteurs, à évaluer ce travail.

A Monsieur le Dr. Jean-Michel Camadro, examinateur de thèse,
Mes remerciements pour sa collaboration dans la réalisation de ce travail par l'étude de la spectrométrie de masse et pour son suivi comme membre de mon comité de thèse. Son aide contribue en part au résultat final. Il est également remercié pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

A Monsieur le Dr. Simon Thornton, membre de mon comité de suivi de thèse et membre invité du jury,
Mes remerciements pour son suivi et ses conseils qui m'ont aidé suite à une première évaluation au début de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de mon immense gratitude et respect.

A Monsieur le docteur Gregory pourié,
Un grand merci pour son aide, sa disponibilité et ses conseils..

A Monsieur le docteur Marc Merten,
Je n'oublierai jamais que c'est vous qui m'aviez ouvert les portes du laboratoire !! Merci..

A Nassila Akchiche, qui m'a permis, pour mon plus grand plaisir, de participer au sujet sur lequel elle travaillait. Je te remercie pour ta confiance et tes conseils ; pour avoir bousculé ton temps de travail, pour encourager mes efforts et accompagner mes premiers pas dans la recherche.

A Anais Bison et Andrea Geoffroy (pour une fois, le nom est bien écrit, j'espère !!), Toute ma reconnaissance pour leur implication dans ce travail. En co-encadrant leur travail de Master j'ai découvert deux amies exceptionnelles. Merci pour votre aide précieux, et pour la bonne humeur qui a fait avancée le travail d'équipe dans la meilleure ambiance.

Un grand merci aux ingénieurs de l'unité, Jean-marc Alberto et Céline Chéry, Vos conseils, votre disponibilité ont plus d'une fois fait la différence..

Je tiens à remercier également les techniciens et les membres de l'unité Inserm U954, Fereshteh, Dominique, Catherine, Philippe, Thierry, Florence, Pierre, Sophie, Rémy, Justine, et tous les autres membres de l'unité. Je n'oublierai pas Déborah dont les efforts ont été précieux dans ce travail. Merci pour leur acceuil exemplaire de chaleur et de sympathie et pour avoir contribué à la bonne ambiance quotidienne.

Aux anciens du labo ;) Nassila, Shabnam, Sonia, Nicolas, Hélène et Ma'atem, Merci pour votre soutien et ses moments partagés au laboratoire et en dehors..

A tous mes camarades actuels de souffrance et de galère :p Soufiane, Anais, Gaili, Lou, Andréa, Siwei, Julien, Sébastien, Courage pour la suite !! ça n'aurait jamais été pareil sans vous.. Amis pour toujours !!

A ma chère équipe Libanaise, Rose, Rania, Sarah, Hassan et tout récemment Kristine.. Le labo n'est pas le labo sans vous !! Merci tout simplement pour avoir été là ..

Et le labo n'est surtout pas le labo sans toi ma Razrouz !! J'avais la chance d'avoir ma meilleure amie pour collèque de travail !! Le voyage qu'on a commencé ensemble touche à sa fin mais notre amitié s'étendra « for ever » ..

Pour tous mes amis à Nancy, Hanhoun, Mostafa, les centaines de « MariamS », les millions de « HassanS », et tous les autres que je ne peux décemment citer à moins de rendre une page de noms et prénoms. Je vous aime fort !! Que de bons souvenirs pour le reste de ma vie..

Les personnes qui sont toujours à mes côtés pour me soutenir et m'aider à avancer avec tous leurs efforts sont mes parents, ma sœur et mon frère. Je ne les remercierai jamais assez. Maman, papa, Rodie et Addoun b7ebkon ktir ktir, kentou mazi 3ala toul, intou wassaltouni la hon !! A ma chère famille, Vous êtes mon bonheur. C'est grâce à vous que j'ai continué ces études, c'est aussi pour vous que j'avance du mieux que je peux dans la vie…C'est à vous que je dédie ce travail..

Sommaire

Liste des figures 13
Liste des tableaux 14
Liste des fiches techniques 15
Abréviations 17
Avant-propos 25
Synthèse Bibliographique 27
Chapitre I : Metabolisme des monocarbones et homocystéine 29
I. Métabolisme des monocarbones 29
I.1. Cycle de la Méthionine 29
I.2. La voie de transméthylation 29
I.3. La voie de transsulfuration 30
I.4. La voie de reméthylation 30
I.5. Cycle des folates 31
Rôle du 5-méthylTHF 32
II. Régulation du métabolisme des monocarbones 33
II.1 Rapport SAM/SAH et potentiel de méthylation 33
II.2. Rôle de la méthionine 34
II.3. Les facteurs nutritionnels 35
II.3.1. Les folates (vitamine B9) 35
II.3.1.a. Apports, absorption et stockage des folates 35
II.3.1.b. Carence en vitamine B9 37
II.3.2. La vitamine B12 37
II.3.2.a. Apports, Absorption et stockage de la vitamine B12 38
II.3.2.b. Carence en vitamine B12 40
II. 4. Facteurs génétiques 41
II.5. Facteurs environnementaux 43
III. Homocystéine 44
III.1. Différentes formes d'homocystéine circulante 44

III.2 Concentrations physiologiques et pathologiques d'homocystéine 45
IV. Pathologies associées à l'homocystéine..... 47
IV.1. Homocystéinémie comme facteur de risque des pathologies cardiovasculaires 47
IV.1.a. Homocystéine et cardiopathies congénitales 47
IV.1.b. Homocystéine et maladies cardiovasculaires 48
IV.2. Homocystéine et diabète 48
IV.3. Homocystéine et cancer 49
IV.4. Homocystéine et stéatose hépatique 49
IV.5. Homocystéine et ostéoporose 49
IV.6 Homocystéine et atteintes cérébrales 50
V. Homocystéinylation des protéines 50
V.1. Formation des protéines S-homocystéinylées 50
V.2. Homocystéine Thiolactone et formation des protéines N-homocystéinylées 51
V.3. N-homocystéinylation et pathologies 52
Chapitre II : Le cerveau : développement, différenciation et pathologies liées à l'homocystéine 54
I. Développement du système nerveux central 54
I.1. Biologie du développement du Système nerveux central 54
I.2. Défauts congénitaux du développement cérébral 56
I.2.a. Anomalies de fermeture du tube neural 56
I.2.b Fentes labio-palatines 57
II. Différenciation cellulaire 57
II.1. Types cellulaires présents dans le système nerveux central (SNC) 57
II.2. Différenciation et mise en place des lignages cellulaires 58
III. Différenciation neuronale 59
III.1. Polarisation neuronale 60
III.2. Rôle du cytosquelette dans la différenciation 61
III.3. Organisation du cytosquelette 62
III.3.1. Microtubules et protéines associées 62
III.3.2. Actine 63

III.3.3. Filaments intermédiaires 64
IV. Homocystéine et pathologies développementales et neurologiques 64
IV.1. Homocystéine et pathologies gravidiques 65
IV.2. Homocystéine et défauts de fermeture du tube neural 66
IV.3. Homocystéine et fentes labio-maxillo-palatines 67
IV.4. Homocystéine et autres pathologies développementales 68
IV.5. Homocystéine et pathologies neurologiques chez l'adulte 68
IV.6. Homocystéine et pathologies liées au vieillissement 69
IV.6.1. Homocystéine et maladie de Parkinson 69
IV.6.2. Homocystéine et Maladie d'Alzheimer 69
V. Mécanismes mis en jeu 71
V.1. Programme neurogénique 71
V.1.1. Induction neurale et structuration de la moelle épinière 71
V.1.2. Régulation de la prolifération cellulaire 72
V.1.3. Différenciation et maturation cellulaires 74
V.2. Régulations épigénétiques 75
V.2.1. Les microARN : régulateurs épigénétiques post-transcriptionnels 76
V.2.2. Implications des miRs dans le développement du système nerveux central 77
V.2.3. Rôle des miRs dans les pathologies cérébrales 77
V.2.4. Interaction miRs / cycle des monocarbones 79
V.3. STAT3 80
V.3.1. Phosphorylation de Stat3 et activité transcriptionnelle 81
V.3.2. Régulation microARN-dépendante de Stat3 82
V.3.3. Rôle physiologique de Stat3 82
V.3.3.a. Implication de Stat3 dans l'embryogenèse 82
V.3.3.b. Stat3 dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire 83
V.3.3.c. Implication de Stat3 dans l'apoptose et la survie cellulaire 83
V.3.3.d. Implication de Stat3 dans la neuroprotection et le vieillissement cérébral 84
Objectifs 85
Résultats 89
Première partie : Etude des effets d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement embryonnaire cérébral via altération du programme neurogénique 91

I. Publication # 1: Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124 91
I.1. Objectifs de l'étude 92
I.2. Manuscrit 93
I.3. Synthèse de la publication 94
I.4. Conclusions 96
II. Perspectives de travail 97
II.1. Anomalies de fermeture du tube neural postérieur 97
II. 2. Anomalies de fermeture du tube neural antérieur 98
Deuxième partie : Etude des effets d'une carence en donneurs de méthyles sur la plasticité synaptique et le vieillissement cérébral: Homocystéinylation des protéines neuronales 101
I. Publication # 2: Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells 101
I.1. Objectifs de l'étude 102
I.2. Manuscrit 103
I.3. Synthèse de la publication 104
II. Perspectives de travail 107
II.1. Etude *in vivo* chez des rats exposés à une carence précoce en donneurs de méthyles 107
II. 1.a. La carence en donneurs de méthyles affecte le métabolisme des monocarbones 107
II. 1.b. Effets de la carence en donneurs de méthyles sur les protéines motrices 107
II.2. Etude protéomique et identification des protéines homocystéinylées par spectrométrie de masse 109
II.3. Analyse de l'homocystéinylation des protéines associées aux microtubules 110
II.3.a Homocystéinylation de Map1a et Map4 110
II.3.b Homocystéinylation de Tau 113
II.4. Confirmation de l'homocystéinylation des protéines associées aux microtubules (Tau, Map1a) *in vivo* 116
II.5. Conséquences de l'homocystéinylation des protéines de cytosquelette sur les fonctions cognitives 120
Discussion 123
Partie I. Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la régulation transcriptionnelle au cours du développement cérébral embryonnaire 125
Impact des facteurs nutritionnels sur le développement 125

L'exposition précoce à une carence en donneurs de méthyles entraîne un retard de croissance et des anomalies du développement 126
La carence en donneurs de méthyles perturbe le déroulement du programme neurogénique 127
La carence en donneur de méthyles inhibe la voir développementale Stat3 128
MiR-124 inhibe la voie Stat3 en condition de carence en donneur de méthyles 128
MiR-124 régule négativement les kinases ERK1/2 et Src 129
L'inhibition de la voie Stat3 est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et à une augmentation de l'apoptose neuronale 130
La carence en donneurs de méthyles perturbe la voie Notch, un autre acteur majeur du programme neurogénique 130
L'inhibition de la voie Notch est impliquée dans les défauts de fermeture du tube neural131
Trim71 participe au défaut de fermeture des sutures du cervelet 131
Partie II. Carence en donneurs de méthyles et développement cérébral : perturbations de la plasticité synaptique par régulation post-traductionnelle 134
La carence en folates affecte le métabolisme des monocarbones et augmente l'expression des histone désacétylases dans les progéniteurs hippocampiques H19-7 134
La carence en folates diminue la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation des progéniteurs hippocampiques 134
La carence en folates perturbe l'activité et la plasticité synaptiques 135
La carence en folates entrave la formation des microtubules au cours de la différenciation 135
La carence en folates induit des modifications post-traductionnelles par homocystéinylation de composants du cytosquelette dans les progéniteurs neuronaux 136
La N-homocystéinylation des protéines est associée à leur agrégation et à la perte de leur fonctionnalité 137
La carence en donneurs de méthyles est associée à l'homocystéinylation de composés des microfilaments et des neurofilaments 138
La carence en donneurs de méthyles induit l'homocystéinylation de Tau, Map1 et Map4 chez le rat *in vivo* et une perte des capacités cognitives 139
Conclusions et Perspectives 141
Références Bibliographiques..... 143
Fiches techniques 183
Modèles d'études : description et entretien 184
Dosages Biochimiques 197
Caractérisation phénotypique / Marquages immunofluorescents 211
Quantification ARN / protéines 227

Etudes des microARN 264
Etudes comportementales 272
Publications/Communications 277
Liste de publications 279
Participations à des congrès 280

Liste des figures

Figure 1 : Formation de l'homocystéine à partir de la méthionine 29
Figure 2 : Métabolisme des Folates 33
Figure 3: SAM au centre du métabolisme des monocarobnes. 34
Figure 4 : Structure chimique du tétrahydrofolate et ses différents dérivés. 35
Figure 5 : Absorption des folates. 36
Figure 6 : Structure de la vitamine B12. 38
Figure 7 : Absorption et transport de la vitamine B12 40
Figure 8 : Différentes formes de l'homocystéine 45
Figure 9: Synthèse du métabolisme de l'homocystéine 46
Figure 10 : Réaction d'édition de l'homocystéine 52
Figure 11 : Neurulation et formation du tube neural. 55
Figure 12 : Premières étapes du développement embryonnaire du système nerveux central chez les vertébrés 56
Figure 13 : Nature gliale des cellules souches neurales (CSN) dans le développement et chez l'adulte 59
Figure 14 : Régulation de la formation des dendrites et de l'axone par le cytosquelette 61
Figure 15 : Les microtublues. 63
Figure 16 : Les microfilaments d'actine. 64
Figure 17: Structuration de la moelle épinière le long de son axe dorso-ventral 72
Figure 18 : Voie de signalisation Notch. 73
Figure 19 : Schéma illustrant les principales composantes de la régulation de la différenciation par le complexe REST/NRSF dans les réseaux de neurones 75
Figure 20 : Biosynthèse des microARN 76
Figure 21 : Relation microARN, dérégulation du cycle des monocarbones et formation du système nerveux central 79
Figure 22 : Voie de signalisation Stat3. 81
Figure 23 : Schéma récapitulatif des différentes interactions susceptibles d'expliquer les conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la régulation de la voie Stat3 via miR-124 et leur impact sur le développement cérébral. 96
Figure 24 : Anomalies de fermeture du tube neural postérieur. 97
Figure 25 : Effets de la carence sur la voie de signalisation Notch. 98
Figure 26 : Anomalies de fermeture du tube neural antérieur. 99
Figure 27: Effet de la carence sur l'expression de la protéine Mlin41/Trim71. 100
Figure 28 : Anaylses immunohistochimiques de l'Hcy et des protéines motrices sur des coupes de cerveau de rat. 108
Figure 29 : Interaction Homocystéine-protéines motrices par Duolink® in situ proximity ligation assay. 109
Figure 30 : Effet de la carence sur l'expression des MAPs. 112
Figure 31: Etude de l'expression de la méthionine ARNt synthétase (MARS) dans les cellules témoins et carencées en folates. 112
Figure 32 : Analyses de l'interaction de Map1a avec l'homocystéine et la ß-tubuline. 113
Figure 33 : Effet de la carence en folates sur l'expression de Tau et sa phosphorylation. 114
Figure 34 : Homocystéinylation et agrégation de Tau. 115

Figure 35: Conséquences de l'invalidation de MARS sur l'homocystéinylation de Tau et sur sa capacité fonctionnelle. 116
Figure 36 : Homocystéinylation de Tau et Map1 dans la région CA1 de l'hippocampe. 117
Figure 37 :Homocystéinylation de Tau et Map1 dans l'hippocampe de rats en fonction de l'âge. Effets de la carence en donneurs de méthyles. 117
Figure 38 : Conséquences de l'homocystéinylation de Tau et Map1 dans l'hippocampe de rats adultes de 6 mois. 118
Figure 39 : Homocystéinylation de Tau et Map1 dans le cortex et le cervelet. 119
Figure 40 : Conséquences de l'homocystéinylation de Tau et Map1 dans le cervelet et le cortex de rats adultes de 6 mois. 120
Figure 50 : Tests comportementaux d'évaluation des capacités d'apprentissage et de mémorisation. 121
Figure 51 : Effets de la carence sur le développement du SNC. 133

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales sources et leurs teneurs en folates 36
Tableau 2 : Causes de déficience acquise en vitamine B12 (adapté d'après(Nielsen et al., 2012)). 41
Tableau 3: Tableau récaputilatif des concentrations physiologiques et pathologiques en homocystéine et facteurs favorisants l'hyperhomocystéinémie (adapté d'après (Bottiglieri, 2005; Ueland et al., 1993)). 47
Tableau 4 : MicroARN exprimés de manière différentielle dans les maladies neurodégénératives (Adapté d'après (Junn and Mouradian, 2012)). 78
Tableau 5 : Effets d'un régime déficient sur les ratons de 21 jours. 107
Tableau 6 : Liste des protéines homocystéinylées identifiées par SM. 110
Tableau 7: Analyses par sepectrométrie de masse des modifications post-traductionnelle des protéines associées aux microtubules (MAP1a et MAP4). 111

Liste des fiches techniques

Lignée H19-7 / IGF-IR – Conditions de culture 185
Congélation / Décongélation des lignées H19-7/IGF-IR 187
Repiquage des lignées 188
Transfection des cellules par siARN 189
Liste des traitements utilisés 191
Cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat (E19) 192
Protocol animal 194
Prélèvements des échantillons 196
Extraction des protéines cytosoliques 198
Dosage vitamine B12/B9 199
Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique 201
Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR 204
Mesure de l'activité de la Méthylènetétrahydrofolate Réductase, MTHFR 206
Mesure de l'activité enzymatique de la cystathionine-β-synthase (CBS) 208
Mesure de la concentration des métabolites SAM et SAH à partir d'homogénats cellulaires 210
Inclusion des lames et coupe des demi-cerveaux au cryostat 212
Coloration pour visualisation des cytosquelettes et mesure morphologique 213
Mesure de l'épaisseur des couches des régions cérébrales 214
Comptage des cellules vivantes (en prolifération) par méthode d'exclusion au Bleu Trypan 215
Test de migration cellulaire 216
Marquage immunocytochimique : technique MitoCapture™ 217
Test de viabilité cellulaire ATPLite 218
Marquage immunocytochimique : Marquage à l'Apostain 219
Anticorps anti-ADNsb/Apostain® 219
Détection de l'apoptose par marquage à l'*ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit* 220
Marquage immunohistochimique 221
Marquage immunocytochimique 222
Duolink 225
Extraction des protéines cytosoliques cellulaires pour l'étude par Western-Blot 228
Extraction des protéines à partir de tissu cérébral 229
Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) 230
Western Blotting 231
Déshybridation de membrane western blotting (stripping) 240
Co-Immunoprécipitation (*kit Pierce Co-immunoprécipitation*) 241
Spectrométrie de masse 245
Extraction des ARN avec le Kit RNeasy®① Mini Kit Plus avec élimination d'ADN génomique à partir des cellules 246
Extraction des ARN avec le kit RNeasy®① Lipid Tissue Mini kit à partir des tissus 248
Quantification des ARN ou ADN 250
Analyse qualitative de l'ARN/ADN sur gel d'agarose 251
Transcription inverse des ARN (RT) 252
PCR semi-quantitative en temps réel par utilisation du KIT Quantitect™ SYBR® Green PCR① 254

Screening de l'expression des gènes par « *RT² Profiler PCR Arrays – SABiosciences Kit* ①» 257
Extraction d'ADN par QIAamp® DNA Mini extraction kit ① 259
Méthylation d'ADN par *Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit* ① 261
Hybridation *in situ* par *miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)* ① 265
Extraction de microARN par *mirVana™ miRNA Isolation Kit* ① 268
PCR semi-quantitative en temps réel par utilisation du KIT *Taqman® MicroRNA Assays* 270
HOMING 273
LABYRINTHE EN MULTI-T 274

Abréviations

5-AdoCbl	5-désoxyadénosylcobalamine
5-AZA	5-Azacytidine
5'-UTR	5' UnTranslated Region ou région 5' non traduite
AA	Acide aminé
AARS	Aminoacyl-ARNt
ABC	*ATP-Binding Cassette*
ADF	*Actin depolymerizing factor*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ADP	Adénosine diphosphate
AFTN	Anomalies de fermeture du tube neural
AMN	*Amnionless*
AMP	Adénosine monophosphate
ANOVA	Abreviations analysis of variance
ApoE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Enzyme d'hydrolyse d'ATP, Adénosine triphosphatase
BCA	*BiCinchoninic Acid* – Acide bicinchoninique
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
Bcl-xl	*B-cell lymphoma-extra large*
BET	Bromure d'éthydium
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
bHLH	*Basic helix-loop-helix*
BHMT	Bétaïne-Homocystéine méthyltransférase
Bmp	*Bone morphogenetic proteins*
bp	*base pair* - paire de base
BSA	*Bovine serum albumin* - Albumine de sérum bovin
CA1	Corne d'Ammon 1, régoin de l'hippocampe
Cbl	Cobalamine ou vitamine B12
Cbl(I), (II)	Cobalamine au degré d'oxydation (I) ou (II)
CBS	Cystathionine-β-synthase
CHD	*Congenital Heart Defects*
CNCbl	Cyanocobalamine
CNTF	*Ciliary neuronotrophic factor*
CSN	Cellule souche neuronale
Ct	*Cycle threshold* ou cycle seuil
CTS ou CYL	Cystathionine- γ-lyase
Da	Dalton
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate réductase

Dhh	*Desert Hedgehog*
Dll1	*Delta-like 1*
Dnmt	ADN méthyltransférases
dTMP	Thymidylate ou Désoxythymidine monophosphate
dUMP	Uridilate ou Désoxyuratidylmonophosphate
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagles Medium*
DO	Densité optique
DOHaD	Origines développementales de la santé et de la maladie
DTT	Dithiotréitol
$E_{chiffre}$	Stade embryonnaire/chiffre=jour du stade embryonnaire
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*
Egf	Epidermic growth factor
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
FAD	Flavine adéninedinucléotide oxydé
FGCP	Folylpolyglutamate carboxypeptidase
Fgf	Fibroblast growth factor
FGPS	Folypolyglutamate synthase
FI	Facteur intrinsèque
FLP	Fentes labiopalatines
Folbp1	*Folic acid-binding protein one*
FRα et FRβ	*Folate Receptor*
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase
GFAP	Protéine glio fibrillaire acide
GH	γ-glutamyl hydrolase
GNMT	Glycine N-méthyle transférase
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
Hcy	Homocystéine
HDAC	Histones désacétylases
Hes1	Hairy and enhancer for split 1
HPLC	*High performance liquid chromatography* - Chromatographie liquide à haute performance
HRP	*HorseRadish Peroxydase*
HTL	Homocystéine thiolactone
IAP	*Inhibitor of Apoptosis Proteins*
IL-6	Interleukine 6
IP	Immunoprécipitation
IPA	*Ingenuity Pathways Analysis*
IPC	Cellules progénitrices intermédiaires
$J_{chiffre}$	Jour correspondant à stade de développement
Jag-1	*Jagged-1*
JAK	*Janus Tyrosine Kinase*
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*
kDa	Kilo Dalton
LCR	Liquide céphalo-rachidien

LIF	*Leukemia Inhibitory Factor*
LMBD1	*Probable lysosomal cobalamin transporter*
LSD1	*Lysine (K)-specific demethylase 1A*
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Protéines associées aux microtubules
MAP-1	Protéines associées aux microtubules de type I
MAP-2	Protéines associées aux microtubules de type II
MAP-4	Protéines associées aux microtubules de type IV
MARS ou MetRS	Méthionine-tRNA synthase
Mash1/Ascl1	Achaete-scute complex homolog 1
MAT	Méthionine adénosyltransférase
MBD	M*ethyl-CpG-binding domain*
MDD	*Methyl donor deficient*
MeCbl	Méthylcobalamine
MeCP2	*Methyl CpG binding protein 2*
MéthylèneTHF/5,10-MeTHF	Méthylènetétrahydrofolate
MeTHF/5-MeTHF	Méthyltétrahydrofolate
miR	microARN
MMA	Acide méthylmalonique
MMCoA	Méthylmalonylcoenzyme A
MP	Maladie de Parkinson
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRP1	*Multi-drug resistant protein 1*
MS/MTR	Méthionine synthase
MS ou SM	*Mass spectrometry* ou spectrométrie de masse
MTRR	Méthionine synthase réductase
MT	Méthyle transférase(s)
MTHFD	5,10-méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase
MTHFD1	Méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase (NADP+ dépendante) 1
MTHFR	5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase
MZ	Zone marginale
N-CAM	Molécules d'adhésion cellulaire en N-terminale
NE	Neuroépithélium
NeuN	*Neuronal nuclei*
NF	*Neurofilament*
NFH	*Neurofilament-Heavy chain*
NFL	*Neurofilament-Light chain*
NFM	*Neurofilament-Middle chain*
NF-κB	Nucleor factor-κB
Ngn ou Neurog	Neurogénine
nIPCs	Cellules progénitrices neuronales
NMDA	N-Méthyl-D-aspartate
NRSE	*Neuronal restrictive silencer element*
NRSF	*Neuron restrictive silencer factor*
NTD	*Neural tube defects* / Défauts de fermeture de tube neural

OHCbl	Hydroxocobalamine
oIPCs	Cellules progénitrices intermédiaires oligodendritiques
OMS	Organisation mondiale de la santé
OP-	Ions phosphate
p53	*Tumor protein 53*
pABA	Acide para-aminobenzoïque
PAGE	*Polyacrylamide gel electrophoresis*
PAX	*Paired-Box transcription factor*
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCFT	*Proton-coupled folate transporter*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PG	Polyglutamate
PGC-1α	*Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivateur-α*
Pkcδ	Protéine kinase C δ
PN	Post-natal
PON1	Paraoxonase 1
PP2A	*Protein phosphatase 2A*
PRMT1	*Protein arginine methyl transferase 1*
PSD95	*Post-Synaptic Density protein 95*
PVDF	*Polyvinylidene difluoride*
qPCR	*Quantitative polymerase chain reaction*
Qsp	Quantité Suffisante Pour
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
REST	*Repressor element transcription factor*
RFC	Récepteur des folates réduits ou *reduced folate carrier*
RG	Cellules gliales radiaires
RIA	*Radioimmuno assay*
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RNase	Ribonucléase
RT	*Reverse transcription* - Transcription inverse
SAM	S-adénosulméthionine
SAH	S-adénosylhomocystéine
SAHA	*Suberoylanilide hydroxamic acid*
SAHH	SAH hydrolase
SB	Spina Bifida
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Ser	Sérine
SH2	*Src homology domain 2*
Shh	Sonic Hedgehog
SHMT	Hydroxyméthyltransférase
SIRT1	*Sirtuin1*
SLC	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
SOX	*SRY (Sex determining on Y)-related HMG box*
Stat3	*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

SVF	Sérum de veau fœtal
SVZ	Zone subventriculaire
Tau	Tubule-associated unit
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS	*Tris buffered saline*
TC I	Transcobalamine I
TC II	Transcobalamine II
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TGF-β	*Transforming growth factor beta* - Facteur de croissance transformant bêta
tHCY	Homocystéine totale
THF	Tétrahydrofolate
T^{re}	Température
Trim71 ou Mlin41	*Tripartite motif containing 71*
TYMS ou TS	Thymidilate synthase
Tyr	Tyrosine
UA (AU)	Unité arbitraire
UPLC	Chromatographie liquide ultra haute performance
VZ	Zone ventriculaire
WB ou *Western blot*	Détection des protéines par immnuo-empreinte
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family

Avant-propos

L'observation faite par Barker (Barker and Osmond, 1986), que les individus présentant un faible poids à la naissance ont un taux de morbidité/mortalité cardiovasculaire plus élevé une fois atteint l'âge adulte, a donné lieu à l'hypothèse du « programmation fœtale » connue également sous le nom de «théorie de Barker». Cette théorie stipule que pendant le développement fœtal, des facteurs environnementaux, notamment la malnutrition prénatale, pourraient avoir des conséquences à l'âge adulte en augmentant le risque de développer divers troubles et pathologies.

Les micronutriments donneurs de méthyles impliqués dans le cycle des monocarbones (cycle de la méthionine et cycle des folates) jouent un rôle dans l'association des déterminants nutritionnels avec les pathologies, à court- et long-terme. L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui tente de sensibiliser l'opinion publique sur les méfaits d'une carence vitaminique, classe les carences en folates (vitamineB9) et en vitamine B12 parmi les carences à considérer en priorité. Ceci peut s'expliquer par leur rôle dans le métabolisme des monocarbones impliqué dans la synthèse et la réparation de l'ADN, mais aussi dans les réactions de méthylation cellulaire, jouant ainsi un rôle primordial dans les mécanismes de régulation épigénétiques et épigénomiques.

De ce fait, nous nous sommes intéressés aux perturbations précoces du métabolisme des monocarbones en lien avec une déficience en donneurs de méthyles, ainsi qu'à un acteur essentiel de ce métabolisme : l'homocystéine. Cet acide aminé, toxique s'il est présent en grande quantité, a été associé à l'apparition de troubles du développement et de pathologies neurologiques à l'âge adulte.

Pour mieux comprendre les liens entre pathologies, en particulier cérébrales, et perturbations du métabolisme des monocarbones, il apparaît important d'explorer les mécanismes cellulaires par lesquels le déficit en donneurs de méthyles et l'homocystéine qui lui est associée peuvent affecter le cerveau, son développement et sa plasticité structurale et fonctionnelle. Pour mener à bien ces travaux, nous avons eu recours à un modèle cellulaire de progéniteurs neuronaux hippocampiques, qui nous est apparu adapté pour nos études compte tenu de l'importance de l'hippocampe dans les fonctions cognitives et de sa vulnérabilité élevée face aux variations des facteurs environnementaux. En parallèle, afin de documenter les effets d'une carence précoce sur le développement *in vivo* et valider les résultats *in vitro*, nous avons

utilisé un modèle animal mis au point au laboratoire, bien caractérisé et validé. Ce modèle consiste à étudier la descendance de rates soumises à une carence nutritionnelle en donneurs de méthyles (essentiellement folates et vitamine B12) au cours des périodes péri-conceptionnelle, gestationnelle, puis au cours de la lactation, jusqu'au sevrage des jeunes rats.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Metabolisme des monocarbones et homocystéine

I. Métabolisme des monocarbones

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré provenant du métabolisme de la méthionine et n'intervenant pas dans la synthèse protéique.

Son catabolisme a lieu essentiellement dans le foie et dans les reins. Il sert à garder un taux constant d'Hcy qui, contrairement aux autres thiols (glutathion, cystéine), peut être toxique pour la cellule, et ceci suite à des mécanismes d'autorégulation des deux voies permettant son élimination ou son recyclage.

I.1. Cycle de la Méthionine

La méthionine est un acide-α-aminé essentiel possédant une fonction thioéther (-SCH3). Elle est essentielle pour les réactions de synthèses protéiques mais aussi celles de méthylation cellulaire. En effet, elle est capable de transférer le groupement méthyle qui est lié à l'atome de soufre et ce transfert nécessite l'utilisation d'une grande quantité d'énergie. Ainsi, elle sera couplée à l'adénosine fournie par l'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la méthionine adénosyltransférase (MAT) pour former la S-adénosylméthionine (SAM) (Figure 1).

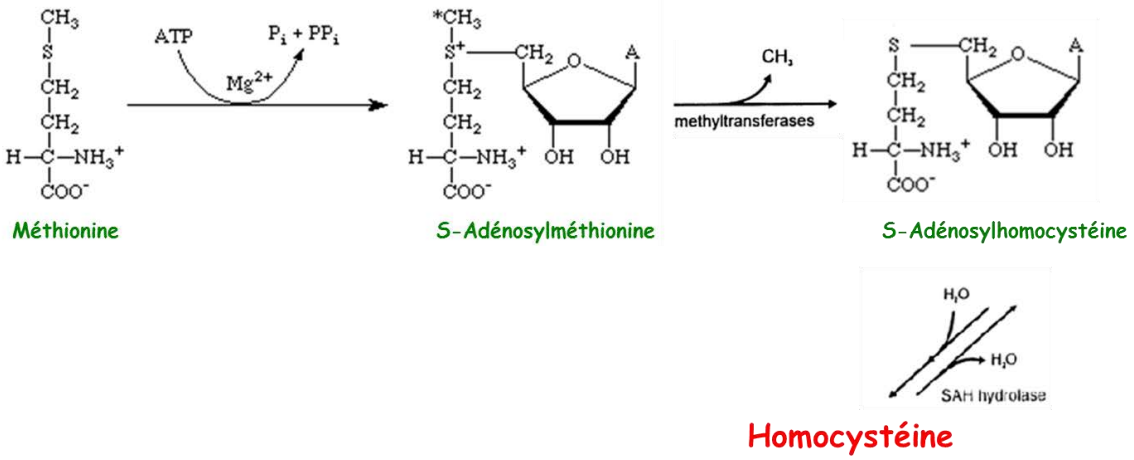


Figure 1 : Formation de l'homocystéine à partir de la méthionine

I.2. La voie de transméthylation

La méthionine adénosyl transférase catalyse la biosynthèse de la S-adénosylméthionine à partir de la méthionine et en présence d'ATP (Mudd and Cantoni, 1958). Tous les organismes possèdent une ou deux des trois isoformes de la MAT : MATI/III exprimées uniquement par le foie adulte, et MATII présente dans presque tous les tissus (Chamberlin et al., 2000; Mato et al., 1997) (Mato et al., 1997). La SAM joue le rôle de donneur de méthyle pour différentes molécules : ADN, ARN, protéines et neurotransmetteurs. En tout, plus de cent

méthyltransférases peuvent exister, et chacune de ces réactions produit la S-adénosylhomocystéine (SAH), qui à son tour, est un inhibiteur de la plupart de ces méthyltransférases. La SAH hydrolase (SAHH) hydrolyse la SAH pour donner de l'adénosine et de l'homocystéine selon une réaction réversible. Ainsi, étant donné que l'équilibre de SAHH favorise la formation de la SAH, l'Hcy et l'adénosine doivent être métabolisées ou transportées hors de la cellule pour prévenir l'accumulation de la SAH et de l'homocystéine.

I.3. La voie de transsulfuration

Dans la voie de transsulfuration, l'Hcy est irréversiblement dégradée en cystéine. Suite aux perturbations des cycles des monocarbones (méthionine et folates), le recyclage de l'homocystéine n'est plus correctement assuré et celle-ci est exportée dans le sang où elle aura tendance à s'accumuler, d'où le rôle important de la voie de transsulfuration pour sa dégradation.

La voie de transsulfuration est assurée par l'action de deux enzymes vitamine B6-dépendantes : la cystathionine β-synthase (CBS) et la cystathionine γ-lyase (CTH ou CYL). La CBS catalyse la réaction de condensation de la sérine et de l'homocystéine pour former la cystathionine. Par la suite la CTH catalyse l'hydrolyse de la cystathionine en cystéine et α-cétobutyrate. La CBS humaine est exprimée dans le foie, les reins, le muscle, le cerveau et les ovaires et aussi durant l'embryogenèse précoce dans les systèmes neural et cardiaque (Quere et al., 1999).

Contrairement aux vois métaboliques déjà citées, la voie de transsulfuration est irréversible, ce qui explique le fait que la cystéine ne peut pas intervenir en tant que précurseur pour la synthèse de méthionine. Par contre, et outre son rôle dans la synthèse des protéines, la cystéine est un précurseur du glutathion, antioxydant essentiel pour la détoxification de plusieurs xénobiotiques.

I.4. La voie de reméthylation

La reméthylation de l'homocystéine en méthionine se fait selon deux réactions enzymatiques distinctes. La réaction principale est catalysée par la méthionine synthase (MS ou MTR) et fait aussi intervenir la 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), liant ainsi le cycle des folates au métabolisme de l'homocystéine. La MTR est une enzyme cobalamine-dépendante (Gueant et al., 2013a), ubiquitaire chez les mammifères et dont l'expression varie selon les tissus. Elle requiert pour son activité la cobalamine (Cbl) comme cofacteur, et le complexe résultant, Cbl(I)MTR, va lier un groupement méthyle provenant du 5-méthyltétrahydrofolate (5-MeTHF) pour former la méthylcbl(III)MTR. Ainsi, la méthylcobalamine (MeCbl), forme active de la vitamine B12, assure le transfert d'un

groupement méthyle vers l'homocystéine, permettant la formation de la méthionine et regénérant la Cbl(I)MTR pour accepter à nouveau un groupement méthyle (Leclerc et al., 1998; Oltean and Banerjee, 2003).

En conclusion, la réaction catalysée par la MTR se fait par trois réactions distinctes de transfert de méthyle et sert ainsi pour trois fonctions physiologiques importantes : 1- la régénération du cofacteur tétrahydrofolate (THF), 2- la synthèse de la méthionine, et 3- l'élimination de l'homocystéine cellulaire. Ces réactions se déroulent chacune dans un domaine différent de liaison à la MTR formé de quatre modules fonctionnels : 1- module de liaison et d'activation du 5-méthylTHF, 2- module C-terminal de liaison à la SAM, requis pour la réactivation réductrice du cofacteur cobalamine, 3- module N-terminal de liaison à l'homocystéine, 4- module liant la cobalamine (Banerjee et al., 1989; Ludwig and Matthews, 1997).

La deuxième réaction a lieu essentiellement dans le foie et dans les reins, et requiert la bétaïne comme donneur de méthyle (Sunden et al., 1997). Celle-ci ne dépend pas de la vitamine B12 et fait intervenir une enzyme hépatique, la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT).

I.5. Cycle des folates

Ce cycle est étroitement lié au cycle de la méthionine, avec le 5-méthylTHF fonctionnant comme donneur de méthyles pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, qui intervient dans les réactions de méthylation cellulaire (Bertolo and McBreairty, 2013; Blom et al., 2006; Wilson et al., 2012). Suite au transport dans les cellules, les folates sont polyglutamylés par la folypolyglutamate synthase (FGPS) pour donner le dihydrofolate (DHF) qui sera converti par la dihydrofolate réductase (DHFR) en tétrahydrofolate. Le tétrahydrofolate résultant est directement converti en 5,10-méthylèneTHF sous l'action de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), enzyme B6-dépendante utilisant la sérine comme donneur de carbone, et le convertissant en glycine. Le 5,10-méthylèneTHF est réduit en 5-MeTHF sous l'action de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), enzyme vitamine B2-dépendante. La MTHFR est ainsi une enzyme clé et d'une grande importance pour la régulation du 5-MeTHF disponible pour la reméthylation de l'Hcy.

Rôle du 5-méthylTHF

Le 5,10-méthylènetétrahydrofolate représente un nœud central impliqué dans plusieurs réactions du métabolisme des monocarbones (figure 2):

1- Synthèse des acides nucléiques :

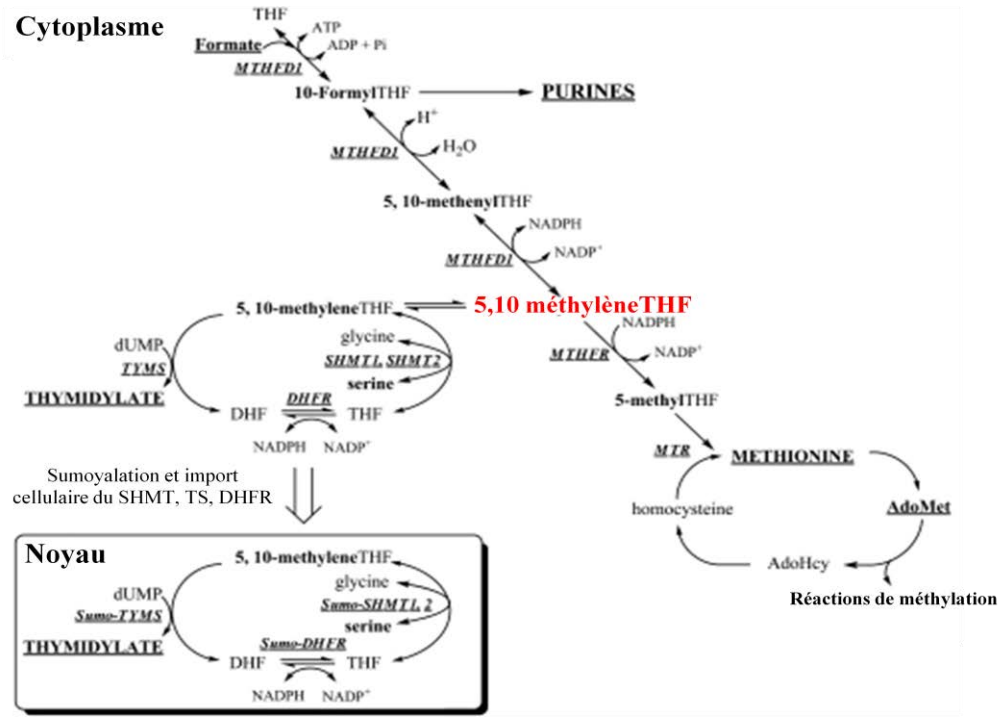
1-i Synthèse des purines via MTHFD1 (méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase (NADP+ dépendante) 1, méhényltétrahydrofolate cyclohydrolase, formyltétrahydrofolate synthétase) qui va convertir le 5,10-méthylènetétrahydrofolate à travers une série de réactions réversibles, en 10-formyl THF, substrat donneur de méthyles pour la synthèse *de novo* des purines.

1-ii Synthèse de la thymidine à travers l'action de la thymidilate synthase (TYMS) qui utilise le 5,10-méthylènetétrahydrofolate pour la conversion du désoxyuridine monophosphate dUMP en désoxythymidine monophosphate dTMP.

2- Synthèse des acides aminés par conversion de l'histidine en acide glutamique. Cette transformation s'effectue dans le cytoplasme, en plusieurs étapes. La dernière implique la transformation du THF en N5,10-méthénylTHF.

3- Conversion de la sérine en glycine par la SHMT, dans la mitochondrie et en présence de THF qui, en acceptant le CH_2OH de la sérine, est transformé en N5,10-méthylèneTHF (Matthews et al., 1982).

4- Synthèse de méthionine catalysée par la MTHFR pour donner le 5-Metétrahydrofolate, substrat donneur de méthyle pour la conversion de l'homocystéine en méthionine via la méthionine synthase, réaction vitamine B12-dépendante.



MTR, la méthionine synthase; TYMS, thymidylate synthase; Pi, phosphate inorganique.

Figure 2 : Métabolisme des folates (d'après (Stover and Field, 2011)).
Compartimentation du métabolisme des folates dans le cytoplasme et le noyau. Le métabolisme des monocarbones dans le cytoplasme est nécessaire pour la synthèse *de novo* des purines, de thymidylate et pour la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Le métabolisme des monocarbones dans les mitochondries est nécessaire pour générer le formate nécessaire pour le métabolisme des monocarbones dans le cytoplasme. Le métabolisme des monocarbones dans le noyau permet de synthétiser la thymidylate à partir de l'uridylate et de la sérine.

II. Régulation du métabolisme des monocarbones

II.1 Rapport SAM/SAH et potentiel de méthylation

Lorsque l'homocystéine s'accumule, il en résulte une augmentation de la SAH et une diminution du ratio SAM/SAH, un index des réactions de méthylation. En plus d'être le substrat des méthyltransférases SAM-dépendantes, la SAM joue aussi un rôle dans la régulation des activités des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'Hcy. Ceci est corrélé au fait que SAM est un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'Hcy par une diminution de la synthèse du 5-MeTHF (Figure 3). Bien que la SAH elle-même ne modifie pas l'activité enzymatique MTHFR, elle peut inverser l'effet inhibiteur de la SAM en entrant en compétition pour son site de liaison (Kutzbach and Stokstad, 1971). Ainsi, le ratio SAM/SAH régule l'activité de la MTHFR et l'augmentation de la SAM se traduit par un basculement du métabolisme de l'Hcy vers son catabolisme, la voie de transsulfuration.

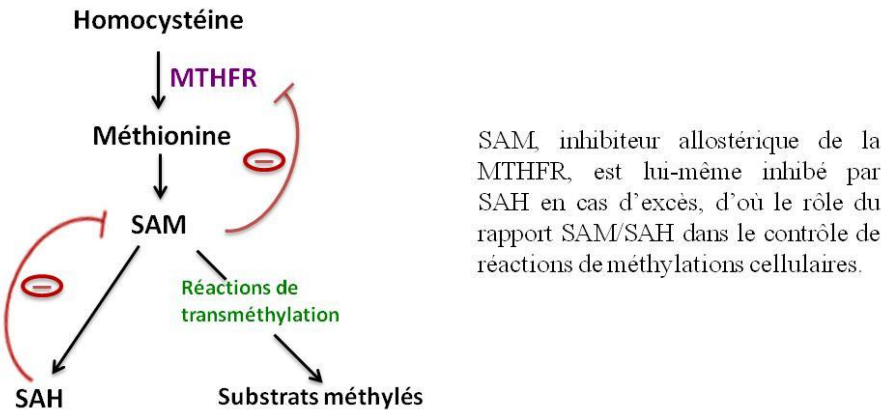


Figure 3: SAM au centre du métabolisme des monocarobnes.

La SAM intervient aussi en tant qu'activateur allostérique de la CBS (Mato et al., 1997). Ainsi, lorsque la SAM est épuisée, l'homocystéine est canalisée vers la reméthylation afin de régénérer la SAM, alors que lorsque le niveau de SAM est élevé, l'homocystéine est canalisée vers la voie de transsulfuration.

II.2. Rôle de la méthionine

Dans la plupart des tissus, l'homocystéine est reméthylée via la MTR ou exportée hors de la cellule. Le foie est l'organe principal de dégradation de la méthionine en excès et de maintien des taux adéquats en homocystéine, ceci via un ensemble unique d'enzymes (MaTI/III, CBS, CTS, BHMT..). Il en résulte que dans le foie, l'augmentation des taux de méthionine conduit à une augmentation de la SAM. Or, la capacité de l'organisme à s'adapter aux variations d'apport en méthionine dans l'alimentation implique l'existence d'une coordination entre voies de la reméthylation et de la transsulfuration. Ce mécanisme de régulation réside dans la capacité de la SAM à inhiber la MTHFR et activer la CBS (Finkelstein, 2007). Ceci entraîne une augmentation du catabolisme de l'homocystéine et sa dégradation par la voie de transsulfuration.

Inversement, lorsque les taux de méthionine diminuent, la concentration de la SAM est insuffisante pour inhiber la MTHFR ou activer la CBS, ce qui entraîne la conservation de l'homocystéine via la reméthylation en méthionine, qui sera favorisée.

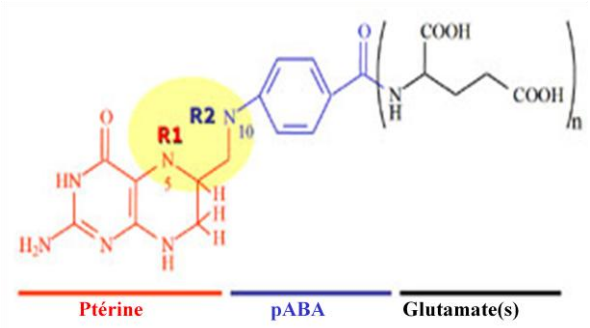
Ce processus est consistant avec le fait que le métabolisme des monocarbones est régulé par des facteurs nutritionnels. Des études ont montré que la modification des apports en groupements méthyles labiles (méthionine et choline) affecte la synthèse *de novo* de la méthionine (Mudd et al., 1980). En plus, le fait que plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des monocarbones soient vitamine B-dépendantes, le statut en folates, cobalamines, et autres vitamines appartenant aux groupes B est à prendre en considération pour expliquer toute dérégulation dans ces différentes voies métaboliques pouvant conduire à une hyperhomocystéinémie.

II.3. Les facteurs nutritionnels

Dans des conditions normales, l'essentiel de l'Hcy est généré suite aux réactions de transméthylation par hydrolyse de la SAH, puis elle est reméthylée en méthionine ou convertie en cystéine par la voie de transsulfuration. L'Hcy est aussi métabolisée en thioester cyclique, l'Hcy thiolactone (Jakubowski, 1997; Jakubowski, 2004). Suite à des dérégulations des voies de reméthylation ou de transsulfuration, la voie de l'Hcy thiolactone devient prédominante, particulièrement en cas d'apport insuffisant en acide folique, vitamine B12 ou vitamine B6, ou suite à des troubles génétiques du métabolisme de la méthionine.

II.3.1. Les folates (vitamine B9)

Le terme folate(s), ou vitamine B9, désigne un ensemble de molécules qui ont pour structure de base l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique). Il s'agit d'une molécule composée d'un noyau ptérine lié à un acide para-aminobenzoïque (pABA) sur lequel s'articule une chaîne polyglutamate (PG) dont le nombre de résidus varie de 1 à 14 (Rebeille et al., 2006), et qui peuvent influencer le transport des folates, leur stabilité et leur utilisation. Cette structure forme une base pour de nombreuses molécules qui se différencient par le niveau d'oxydation du noyau ptérine, par la nature de l'unité monocarbonée liée à la partie ptérine et/ou à la partie pABA, et également par le nombre de résidus constituant la queue polyglutamate. Les dérivés réduits des polyglutamates (dihydrofolate et tétrahydrofolate) constituent les formes biologiques actives. Ainsi, le THF peut transporter des groupements méthyle, méthylène, méthényle et formyle, liés de façon covalente au THF via les atomes d'azote N5 du noyau ptérine et/ou N10 du pABA (Figure 4).



Folates	R1	R2
5-formyl-THF	CHO	H
10-formyl-THF	H	CHO
5,10-méthényl-THF	$=CH^{+}-$	
5,10-méthylène-THF	$-CH_2-$	
5-méthyl-THF	CH3	H
5-formimino-THF	CH=NH	H

Figure 4 : Structure chimique du tétrahydrofolate et ses différents dérivés.

Les dérivés THF varient par les différents radicaux carbonés portés par les azotes N5 et/ou N10, site actif de la molécule de folate.

II.3.1.a. Apports, absorption et stockage des folates

L'organisme étant incapable de synthétiser les folates, l'apport est donc exclusivement d'origine alimentaire, sous forme majoritaire de polyglutamates. L'acide folique est très abondant dans les légumes verts à feuilles. A titre d'exemple, le tableau 1 résume la teneur en folates de quelques aliments, sources principales de folates.

Aliments	Portions	Folates*
Abats de volaille, grillés ou braisés	100 g	345 - 770 µg
Foie d'agneau ou de veau, sauté	100 g	331 - 400 µg
Légumineuses, cuites	100 g	229 - 368 µg
Épinards, Asperges	125 mL (1/2 tasse)	13-140 µg
Pâtes alimentaires enrichies, cuites	125 mL (1/2 tasse)	120 - 125 µg
Haricots de soja, bouillis ou sautés	125 mL (1/2 tasse)	83 - 106 µg
Brocoli, betterave cuits	125 mL (1/2 tasse)	765-90 µg
Laitue romaine	250 mL (1 tasse)	64 µg

Tableau 1 : Principales sources et leurs teneurs en folates
Source : Santé Canada, Fichier canadien sur les éléments nutritifs, versions 2001b et 2005 et ministère de l'Agriculture des États-Unis(USDA), *National Nutrient Database for Standard Reference*.
*µg = microgramme= millionième de gramme

L'absorption intestinale des folates se fait soit selon un phénomène actif, pH-dépendant, soit par diffusion passive au niveau de l'épithélium en cas d'excès en folates (Rosenberg, 1990) (figure 5). L'organe principal de stockage des folates est le foie, qui représente l'organe le plus riche en folates avec le cerveau. Pourtant, ces réserves restent relativement faibles (5 et 15 mg) compte tenu des besoins de l'organisme, surtout pendant les périodes de croissance et de grossesse chez la femme.

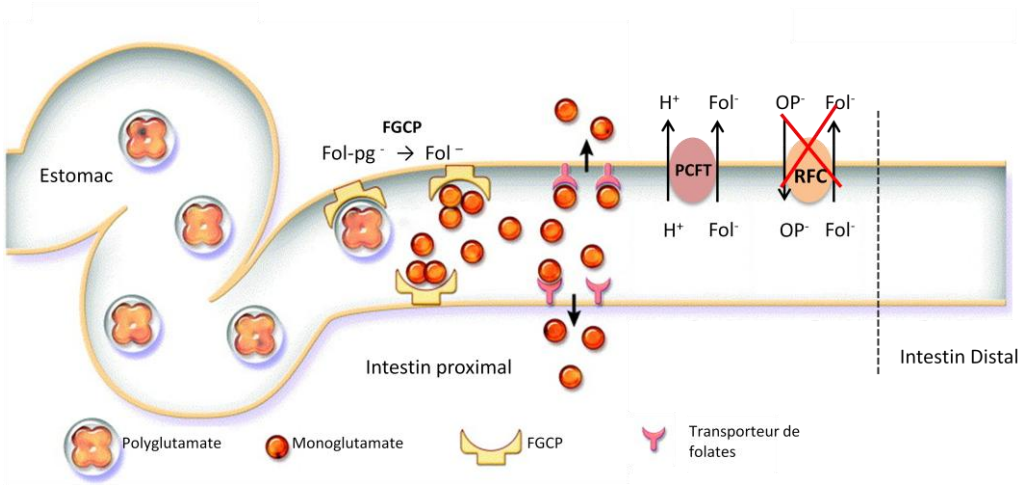


Figure 5 : Absorption des folates.

Les folates alimentaires présents sous forme de polyglutamates sont hydrolysés en monoglutamates sous l'action de la folylpolyglutamate carboxypeptidase (FGCP) ou γ-glutamyl hydrolase (GH) pour être ensuite absorbés dans la cellule intestinale au niveau du jéjunum proximal via le *proton-coupled folate transporter* (PCFT), par un processus de transport pH-dépendant, permettant l'entrée des folates et des ions H+ dans un environnement extracellulaire acide.

Il existe par ailleurs deux récepteurs aux folates, le Récepteur des folates réduits (RFC) encodé par le gène du *reduced folate carrier* (SLC19A1), également exprimé au niveau de la bordure en brosse de l'intestin mais non fonctionnel à ce niveau, son activité optimale nécessitant un pH neutre. Ce récepteur utilise le gradient transmembranaire d'ions phosphate (OP^-) pour réaliser le transport des folates dans la cellule. Le dernier récepteur correspond au *folate receptor* (FRα et FRβ) permettant l'internalisation des folates, et donc leur transport dans la cellule, *via* un mécanisme d'endocytose.

II.3.1.b. Carence en vitamine B9

Comme toute les carences vitaminiques, la carence en vitamine B9 s'observe principalement dans les pays en voie de développement, où elle est associée à une mal- ou dé-nutrition, mais c'est l'une des carences que l'on rencontre le plus fréquemment dans les pays développés : 10 à 20% de la population seraient concernés. Les causes principales de déficience en vitamine B9 résulte de la malnutrition, de la cuisson prolongée des aliments, des régimes amaigrissants, et de l'utilisation de certains médicaments dits « anti-foliques », notamment la pillule contraceptive et les anti-inflammatoires. Pourtant, l'une des causes principales reste surtout un déséquilibre entre les apports et les besoins (accrus chez les femmes enceintes et allaitantes, les nouveau-nés ou les personnes âgées), ainsi que dans certains cas de pathologies digestives (maladie de Crohn, gastrite atrophique..), d'anémies et de proliférations cellulaires malignes... La carence en folates a été surtout impliquée dans la survenue de certains troubles du développement , principalement les défauts de fermeture du tube neural (NTD) ou spina bifida (Smithells et al., 1976). C'est pour cette raison que certains pays occidentaux ont eu recours à un système de supplémentation des farines et céréales alimentaires en acide folique. De plus, une supplémentation périconceptionnelle systématique des femmes enceintes en acide folique a été mise en place (De-Regil et al., 2010) pendant le premier trimestre de la grossesse, réduisant considérablement le risque de malformations congénitales (malformations cranio-faciales, cardiaques, et les anomalies type NTD (Czeizel and Dudas, 1992; Shaw et al., 1994; Werler et al., 1993). Ceci s'avère très important au regard du rôle essentiel des folates dans le processus de programmation fœtale (Gueant et al., 2013b). En effet les études montrent qu'une susceptibilité accrue aux maladies est en partie déterminée lors de la programmation fœtale par des liens entre la nutrition, dont la vitamine B9, et les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Faulk and Dolinoy, 2011; Gabory et al., 2011).

II.3.2. La vitamine B12

La vitamine B12, ou cobalamine (Cbl), doit ce deuxième nom à l'ion cobalt qu'elle contient au centre d'un noyau corrinoïde (atome de Cobalt avec 4 noyaux pyrroles). C'est actuellement la seule biomolécule de ce type possédant une liaison carbone-métal stable (figure 6). C'est ainsi une molécule organométallique, volumineuse, structurellement divisée en trois parties : (1) un groupe planaire avec un noyau corrine centré autour d'un atome de cobalt, (2) un nucléotide qui consiste en une base, le 5,6-diméthylbenzimidazole et un phosphoribose estérifié avec un amino-2 propanolol , (3) un groupement variable R en position axiale supérieure par rapport au premier plan formé par le noyau corrine, et lié à l'atome de cobalt de manière covalente. Ainsi, le terme vitamine B12 regroupe toutes les formes de cobalamines, et non seulement la cyanocobalamine

(CNCbl), qui correspond à la vraie vitamine B12. Plus spécifiquement, on distingue : la Cyanocobalamine, l'Hydroxocobalamine (OHCbl), et en plus de ces deux formes coenzymatiques actives, la Méthylcobalamine (MeCbl), coenzyme de la méthionine synthase qui catalyse la méthylation de l'homocystéine en méthionine dans le cytoplasme, et enfin la 5-désoxyadénosylcobalamine (AdoCbl), coenzyme de la methylmalonyl-CoA mutase, qui catalyse la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA au niveau de la mitochondrie. Le succinyl-CoA est métabolisé à son tour en acide succinique et intégré dans le cycle de Krebs.

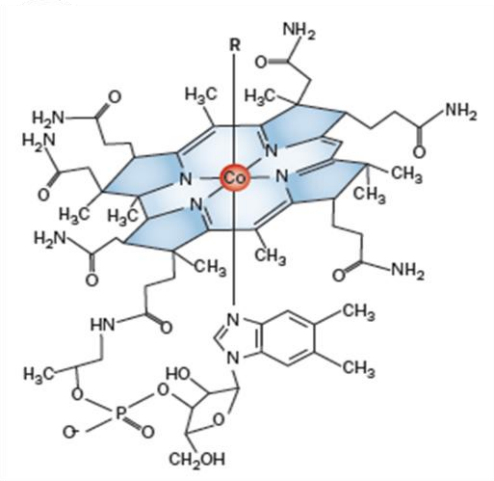


Figure 6 : Structure de la vitamine B12.

II.3.2.a. Apports, absorption et stockage de la vitamine B12

La vitamine B12 est synthétisée par les bactéries intestinales de certains animaux, et les êtres humains étant incapables de la synthétiser, ils dépendent uniquement des apports alimentaires pour combler leurs besoins (Stabler and Allen, 2004). Les principales sources de vitamine B12 sont ainsi la viande (surtout les abats et en particulier le foie (26-58µg/100g), les poissons et les crustacés (3-5µg/100g), les œufs (1-2,5µg/100g) et les laitages (0,3-2,4µg/100g) (O'Leary and Samman, 2010). Le stockage de la vitamine B12 se fait principalement dans le foie (1,5 mg de Cbl sur 2 à 3 mg de réserves totales). Les réserves en cobalamine étant importantes et la perte très faible, les besoins en vitamine B12 sont largement assurés et une carence en B12 n'est détectable qu'au terme de plusieurs années.

Le transport de la vitamine B12 dans les fluides extracellulaires dépend de trois protéines de transport : l'haptocorrine (transcobalamine I ou TCI), le facteur intrinsèque (FI) et la transcobalamine (transcobalamine II ou TCII) (Fedosov, 2012; Nicolas and Gueant, 1995; Nielsen et al., 2012) (figure 7).

Certains complexes protéiques (Cubam, LMBD1, ABCD4, MRP1, CD320, Mégaline) facilitent la circulation de la B12 libre ou des différents complexes transporteurs. Le complexe

Cubam est formé de deux molécules (Gueant et al., 1988): cubiline qui lie le complexe facteur intrinsèque-B12 (Andersen et al., 2010) et l'amnionless (AMN) permettant l'internalisation du complexe Cbl-FI et dont la mutation peut être à la base du syndrome physiopathologique d'Imerslund-Gräsbeck (Fyfe et al., 2013; Grasbeck et al., 1960; Pedersen et al., 2010). La LMBD1, associée à l'ABCD4 appartenant à la famille d'ATP-Binding Cassette, permettent le transport de la vitamine B12 suite à sa libération du facteur intrinsèque dans le cytoplasme (Coelho et al., 2012; Rutsch et al., 2009). La vitamine B12, qui ne reste pas dans la cellule pour être utilisée comme coenzyme ou pour être stockée, est libérée sous forme TCII-B12 dans la circulation sanguine ou les fluides extracellulaires via la protéine MRP1 *(multi-drug resistant protein 1)* ou l'ABCC1 (Beedholm-Ebsen et al., 2010). Suite à la sortie de la B12 dans le flux sanguin, la vitamine liée à la transcobalamine est captée par les cellules du foie et autres organes par le récepteur d'endocytose CD320, protéine transmembranaire présente à a surface cellulaire de tous les tissus (Quadros et al., 2009; Quadros and Sequeira, 2013).

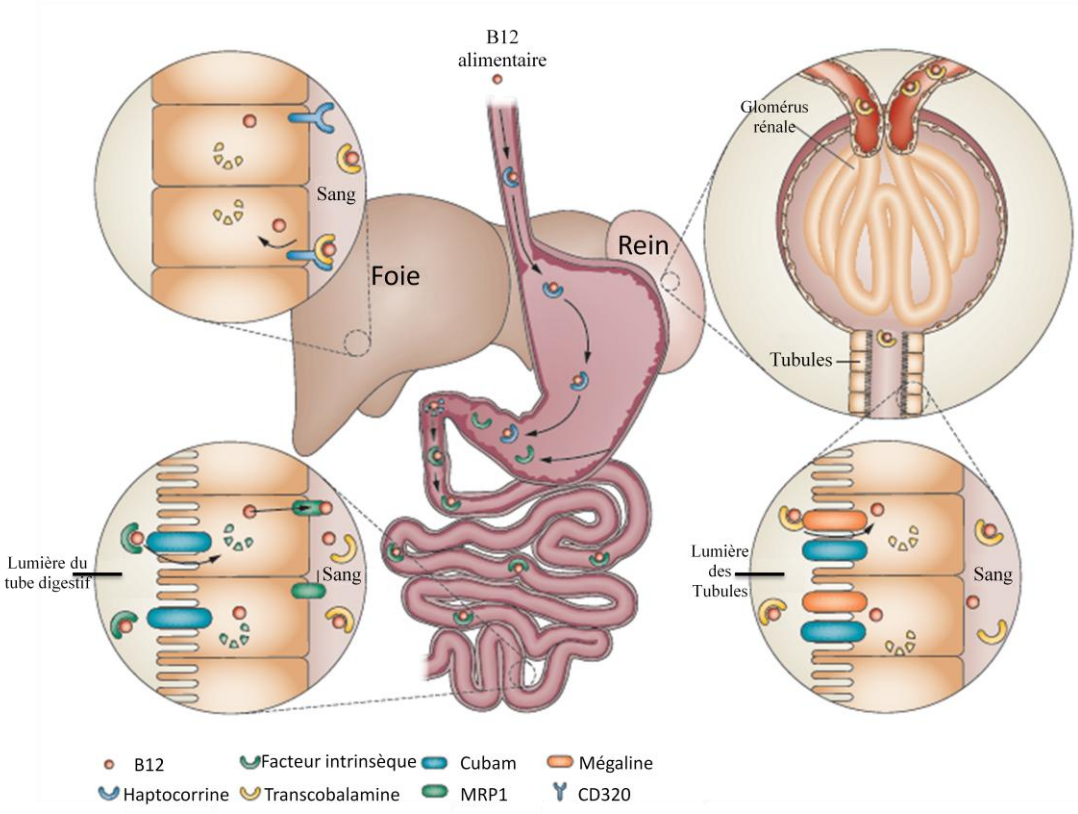


Figure 7 : Absorption et transport de la vitamine B12 (adapté d'après (Nielsen et al., 2012)).

Dans le tractus gastro-intestinal supérieur, la B12 alimentaire libérée par l'acidité de la pepsine gastrique est liée par l'haptocorrine qui, en arrivant dans le duodénum, est dégradée par des enzymes sécrétées par le pancréas, et la B12 libérée est capturée par le facteur intrinsèque sécrété par les cellules pariétales de la muqueuse de la paroi gastrique. Dans l'iléon terminal, le complexe B12-facteur intrinsèque est internalisé par endocytose via le récepteur cubam. A l'intérieur de l'entérocyte iléal, le facteur intrinsèque est dégradé et la B12 est libérée dans le plasma dans la région basolatérale de la cellule par le transporteur ABC MRP1.

Dans le plasma, la B12 est liée à l'haptocorrine ou la transcobalamine II (responsable de la distribution de la B12 aux cellules des tissus périphériques). Dans le foie et autres tissus, l'absorption cellulaire du complexe B12-transcobalamine est médiée par le récepteur CD320, alors que le médiateur mégaline régule la réabsorption du récepteur dans le rein.

II.3.2.b. Carence en vitamine B12

Comme pour les folates, la carence en vitamine B12 est rencontrée dans les pays en voie de développement, principalement par défauts d'apports adéquats en cette vitamine, surtout présente dans les aliments d'origine animale (Stabler and Allen, 2004), mais aussi, plus rarement dans les pays industriels. Dans ce dernier cas, la carence peut survenir en raison de malnutrition surtout chez les sujets végétariens ou suite à un alcoolisme chronique, mais surtout en raison de certaines maladies digestives et de phénomènes de malabsorption, comme dans le cas des déficits congénitaux liés à un déficit en TCII ou en récepteurs du FI (Cylwik and Chrostek, 2011; Tanner et al., 2004).

Causes	Commentaires
Apport alimentaire insuffisant en vitamine B12	Surtout chez les végétariens et dans les pays en développement
Destruction des cellules pariétales gastriques	Maladie autoimmune à l'origine d'une anémie pernicieuse ; les auto-anticorps sont dirigés contre les cellules gastriques ou contre le facteur intrinsèque, empêchant la liaison FI-vitamine B12
Atrophie gastrique	autoimmune ou survenant suite à une infection bactérienne
Maladie de Crohn/ Maladie Coeliaque	Atrophie interférant avec l'absorption des nutriments
Pancréatite chronique	B12 séquestrée par l'haptocorrine dans l'intestin suite à une dégradation inefficace de l'haptocorrine par les enzymes pancréatiques
Intervention chirurgical gastrique	tel le bypass gastrique, sécrétion inadéquate du FI
Traitement aux antiacides	Antiacides pouvant contrer la libération de la B12 des protéines alimentaires

Tableau 2 : Causes de déficience acquise en vitamine B12 (adapté d'après(Nielsen et al., 2012)).

En plus des anémies et du dysfonctionnement gastro-intestinal, les signes cliniques d'une carence en B12 se manifestent par des troubles neurologiques tel l'ataxie, la sclérose combinée de la moelle et l'apparition des foyers de démyénilisation au niveau de la moelle épinière et du cerveau (de Lau et al., 2009; Kalita et al., 2013; Savage and Lindenbaum, 1995).

Bien que les carences en vitamine B9 et B12 soient les mieux caractérisées, l'interaction entre les différentes vitamines appartenant à la famille de vitamines B est à considérer pour mieux comprendre la survenue de certaines pathologies. La déficience en vitamine B6 a été liée à des défauts d'absorption de la vitamine B12 et à une diminution de son stockage dans le foie (Ranke et al., 1960; Yeh and Chow, 1959). La carence en riboflavine (Vitamine B2) entraîne à son tour une déficience en vitamine B6 et est associée à une hyperhomocystéinémie (Jacques et al., 2001). De plus, la choline, la bétaïne et les folates sont des sources d'unités monocarbonnées interchangeables entre elles, ceci s'expliquant surtout par le fait que lors d'une déficience en folates, les groupements méthyles apportés par la bétaïne sont épuisés pour la reméthylation de l'Hcy, augmentant ainsi les besoins en choline (Holm et al., 2007; Kim et al., 1994; Ueland, 2011).

II. 4. Facteurs génétiques

Tout défaut pouvant affecter l'expression des gènes codant les enzymes clés du cycle des monocarbones peut générer une perturbation de ces différentes voies métaboliques. On parle alors de polymorphisme ou variants génétiques, dont la survenue est souvent la conséquence

d'une mutation unique (*single nucleotide polymorphism* ou SNP), avec, en général, association à une hyperhomocystéinémie.

Le gène codant la MTHFR est parmi les plus décrits avec un grand nombre de polymorphismes rapportés. Le polymorphisme le plus commun est MTHFR C677T qui consiste en une substitution d'une cytidine par une thymidine en position 677 sur l'exon 4, dans le domaine catalytique de l'enzyme (Martin et al., 2006; Selhub, 1999). Au niveau protéique, cette mutation autosomique se traduit par une modification d'une valine en alanine(Frosst et al., 1995) entraînant une baisse de l'activité enzymatique variable selon le statut allélique, de l'ordre de 30 à 40% chez les hétérozygotes et de 60-70% chez les homozygotes (Frosst et al., 1995; Sohn et al., 2004; Weisberg et al., 2001). L'impact de ce polymorphisme est folates-dépendant, et ainsi une corrélation entre ce polymorphisme et l'homocystéinémie n'est observée qu'en situation de faibles taux en folates chez les sujets homozygotes (T/T) (Jacques et al., 1996; Stover, 2011).

Les polymorphismes de la MTHFR ont été décrits comme facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, des retards développementaux et des défauts de fermeture du tube neural (Meyer et al., 2004; Thomas and Fenech, 2008).

D'autres erreurs innées d'apports et de métabolisme des folates impliquent des mutations de gènes codant pour les protéines de transport, comme des mutations du gène *proton-coupled folate transporter* (Qiu et al., 2006), des mutations plus rares du gène FOLR1 (Cario et al., 2009; Perez-Duenas et al., 2010), mais aussi des mutations des gènes codant certaines enzymes telles celle du gène de la dihydrofolate réductase (Banka et al., 2011; Cario et al., 2011) et de la méthylèneTHF déshydrogénase (Watkins et al., 2011). Ces différentes mutations ont été associées à différentes manifestations neurologiques, un déclin de la capacité de transport des folates en général et principalement à travers la barrière hémato-encéphalique, des anémies mégaloblastiques et une augmentation des taux d'Hcy et de l'acide méthylmalonique.

D'autres mutations ont été rapportées concernant les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine, sa reméthylation ou sa dégradation par la voie de transsulfuration. En ce qui concerne la Méthionine synthase (MTR ou MS), l'un des polymorphismes prédominants est le MTR A2756G. Même si la corrélation entre la survenue de cette mutation et l'homocystéinémie reste faible et discutable (Bosco et al., 2006; Jacques et al., 2003; Laraqui et al., 2007), elle est considérée comme un facteur de risque d'un certain nombre de pathologies, comme la schizophrénie (Kempisty et al., 2007), les fentes palatines et le spina bifida (Doolin et al., 2002), et le syndrome de Down (Bosco et al., 2003; Gueant et al., 2003).

Concernant la méthionine synthase réductase, le polymorphisme MTRR A66G influence la réduction de la vitamine B12 (Laraqui et al., 2007). Ce polymorphisme a été associé à des maladies coronariennes artérielles (Gueant-Rodriguez et al., 2005) et à des défauts de fermeture du tube neural (Gueant-Rodriguez et al., 2003).

Le transport de cobalamine est aussi affecté par plusieurs polymorphismes touchant le gène de la transcobalamine II, le plus connu étant une mutation TCN C776G qui, au niveau protéique, se traduit par la substitution d'une arginine par une proline (Namour et al., 2001). Cette mutation est corrélée avec le risque de survenue de spina bifida (Christensen et al., 1999) et si elle est associée à une mutation de la MTHFR, cette mutation favorise l'apparition d'une hyperhomocystéinémie et augmente le risque d'avortement spontané (Zetterberg, 2004).

Enfin, des anomalies génétiques peuvent affecter les gènes de la voie de transsulfuration, surtout la CBS dont les polymorphismes les plus connus sont CBS C699T, CBS T833C et CBS G919A. Ils favorisent l'apparition d'une homocystéinurie et d'une homocystéinémie sévère, et sont souvent associés à un retard mental, des anomalies squelettiques et des thromboses (Mudd, 1985). Le polymorphisme BHMT G742A est quant à lui associé à un risque de maladies cardiovasculaires et à une augmentation du risque d'apparition de défauts de fermeture du tube neural, mais certaines études ont associé ce polymorphisme à un effet protecteur, avec une diminution du risque de spina bifida (Morin et al., 2003) et une réduction du risque de mortalité suite à un cancer du sein (Teng et al., 2011).

II.5. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux regroupent diverses causes physiques ou sociales pouvant contribuer à une hyperhomocystéinémie, le plus souvent modérée. Ceux-ci incluent des facteurs physiologiques (âge et sexe), l'exposition à certains médicaments, différentes conditions pathologiques, ainsi que le mode de vie.

Il est connu que les personnes âgées présentent des taux plus élevés d'Hcy, sachant qu'on constate généralement une homocystéinémie normale moins élevée chez les femmes que les hommes, mais après 50 ans, les valeurs rejoignent celles des hommes, ceci pouvant s'expliquer par un rôle éventuel des hormones sexuelles dans l'homocystéinémie (Andersson et al., 1992).

Certains traitements augmentent rapidement l'Hcy dans le sang, comme c'est le cas pour prise de certains médicaments iatrogènes intervenant dans le cycle des monocarbones comme le méthotrexate, le monoxyde d'azote, la procarbazine et l'azaribine qui, respectivement, empêchent l'absorption des folates, de la vitamine B12, de la vitamine B6 et l'activité de la CBS

(Ueland and Refsum, 1989; Ueland et al., 1993). Les contraceptifs, la pénicillamine ou les oestrogènes administrés par voie orale peuvent aussi être à l'origine d'une hyperhomocystéinémie modérée mais qui reste contrôlable en augmentant la prise des vitamines B (Ueland and Refsum, 1989). Des conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires, le diabète de type II, l'arthrite rhumatoïde et certains cancers ont été également associés avec une élévation des taux d'homocystéine (De Bree et al., 2002; Hussein et al., 1999).

Enfin, le mode de vie peut aussi intervenir, sachant que la consommation chronique de tabac (nicotine), d'alcool ou de café pourra favoriser l'hyperhomocystéinémie. Ainsi, chez les sujets alcoolo-dépendants, une hyperhomocystéinémie est corrélée au statut vitaminique en B12, B6, B2 et folates, provoquant une réduction de l'activité de la MS (Cravo and Camilo, 2000; Hultberg et al., 1993; Kenyon et al., 1998). L'administration chronique d'alcool chez le rat peut aussi provoquer une baisse des taux de l'hydroxocobalamine via la réduction du glutathion nécessaire pour sa synthèse (Waly et al., 2011).

En, conclusion, il faut noter que ces différents facteurs nutritionnels, génétiques et environnementaux sont « non spécifiques » en considérant que leurs effets peuvent souvent être additifs ou potentialisés chez certains individus. Par exemple, une étude récente sur 168 patients a montré que l'administration de folates ou de riboflavine avait un effet sur la diminution de l'Hcy suite à un traitement détoxifiant après l'arrêt de la consommation d'alcool (Heese et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que certains cas d'hyperhomocystéinémie d'origine génétique pourraient être aggravés suite à une interaction gène-médicament comme dans le cas des traitements contre des pathologies rhumatologiques, administrés à des sujets homozygotes pour la mutation de *MTHFR (*TT vs CC).

III. Homocystéine

III.1. Différentes formes d'homocystéine circulante

L'Homocystéine, ayant une fonction sulfhydrile libre échangeable avec d'autres groupement thiols, peut exister dans l'organisme sous différentes formes en équilibre d'oxydoréduction : homocystéine, homocystine (deux résidus d'homocystéine réunis par un pont disulfure), disulfure mixte homocystéine-cystéine (Jacobsen, 1998; Refsum et al., 1998). Dans le plasma, 70 % de l'Hcy circule sous une forme liée aux protéines (albumine et hémoglobine) par des ponts disulfure (Jakubowski, 2006). L'homocystéine dite "libre" est essentiellement représentée par les disulfures mixtes, et représente les 30% restants, avec l'homocystéine réduite ne constituant que

1 à 2% de l'homocystéine totale (tHcy) (McCully and Wilson, 1975; Mudd et al., 2000) (figure 8).

Il existe aussi d'autres formes de l'Hcy telles que l'homocystéine thiolactone (HTL), un thioester cyclique représentant 0,29% et 28% de l'Hcy totale respectivement dans le plasma et l'urine, et l'homocystéine liée aux protéines par une liaison amide (N-Hcy-protéine). N-Hcy-hémoglobine et N-Hcy-albumine constituent respectivement chez le sujet sain 75% et 22% de N-Hcy-protéine totale (Jakubowski, 2006).

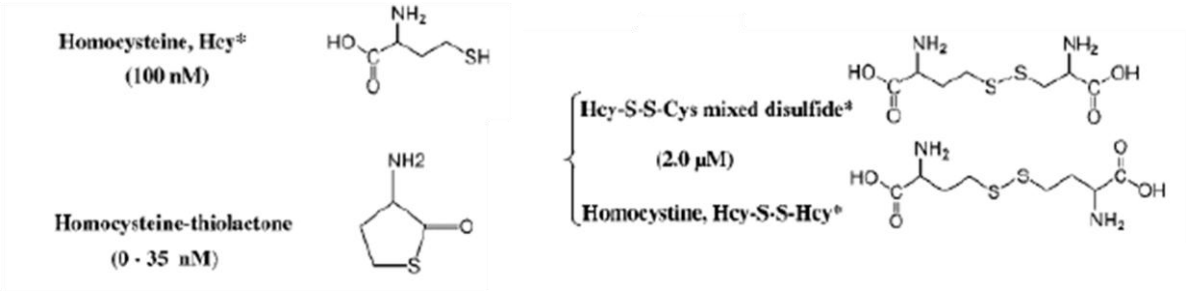
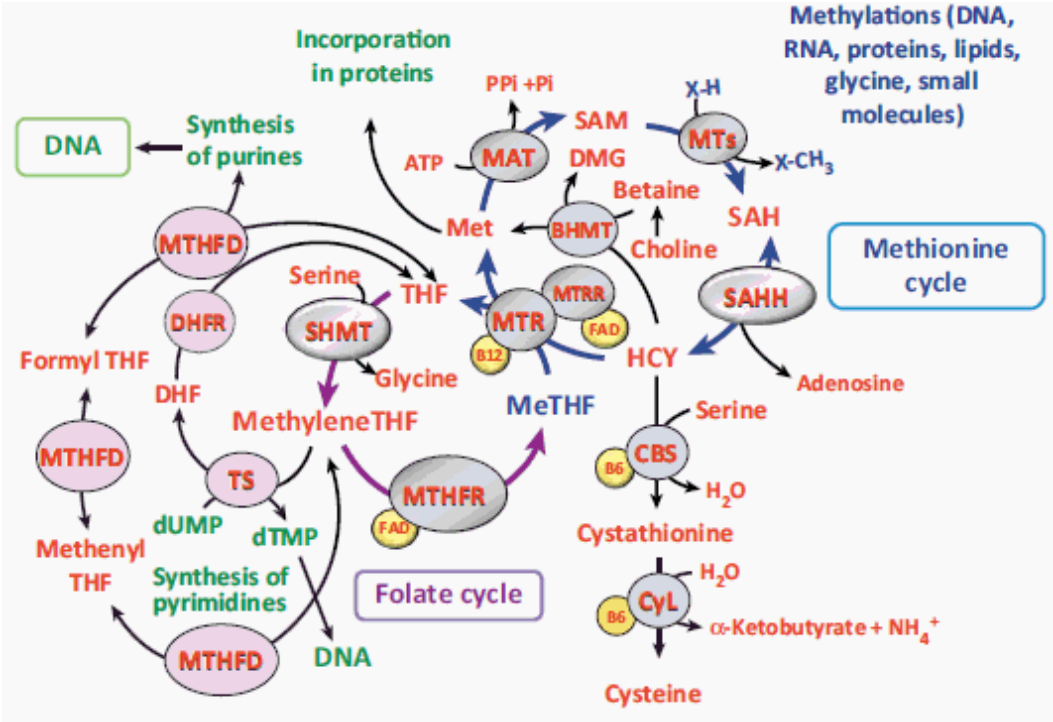


Figure 8 : Différentes formes de l'homocystéine (modifiée d'après (Jakubowski, 2006)).

III.2 Concentrations physiologiques et pathologiques d'homocystéine

A l'état normal, les voies de reméthylation et de transsulfuration sont liées et autorégulées (voir figure 9) de façon à garder un taux d'Hcy constant (taux plasmatique de 10 à 15 µmol/L) (Ueland et al., 1993) ; au-delà de ces valeurs, on peut parler d'hyperhomocystéinémie.



THF : Tétrahydrofolate, **5-MeTHF** : 5- Méthyltétrahydrofolate, **MTHFR** : Méthylène tétrahydrofolate réductase **,** **MTHFD** :5,10-méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase, **DHF** : Dihydrofolate, **DHFR** : Dihydrofolate réductase, **SHMT** : Serine hydroyméthyltransférase, **FAD** : Flavine-Adénine-Dinucléotide, **d-UMP** : Désoxyuratidyl monophosphate, **d-TMP** : Désoxythymidine monophosphate, **Met** : Méthionine, **MTR** : Méthionine synthase, **MTRR** : Méthionine synthase réductase, **HCY** : Homocystéine, **MAT** : Méthionine adénosyl-transférase, **MT** : Méthyle transférase(s), **SAM** : S-adénosylméthionine, **SAH** : S-adénosylhomocystéine, **SAHH** : S-adénosylhomocystéine hydrolase, **BHMT** : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase, **GNMT** : Glycine N-méthyle transférase, **CBS** : Cystathionine β-synthtase, **CyL** : Cystathionine lyase, **TS**, Thymidilate synthase, **X** : substrat à méthylé.

Figure 9: Synthèse du métabolisme de l'homocystéine (Gueant et al., 2013b).
La reméthylation de l'homocystéine pour former la méthionine est catalysée par une enzyme ubiquitaire: la méthionine synthase (MTR) dont le cofacteur est la vitamine B12. La méthylène tétra-hydrofolate réductase catalyse la synthèse du 5-MeTHF, qui fournit le groupement méthyle. Comme la MTR, la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) catalyse la reméthylation de l'Hcy en méthionine, mais en utilisant la bétaïne, et non le méthyltétrahydrofolate comme donneur de méthyle. La BHMT est moins importante que la MTR car, chez l'homme, elle est exprimée uniquement au niveau du foie et du rein (Sunden et al. 1997). Suite aux réactions de transméthylation, la SAM est convertie en SAH qui à son tour est hydrolysé en homocystéine. Ensuite, HCY est soit reméthylée ou métabolisée en cystathionine par la CBS, enzyme vitamine B6-dépendante. Cette voie de transsulfuration est fonctionnelle dans le foie, les reins, l'intestin, le pancréas et le cerveau.

Pour déterminer la concentration d'Hcy, il faut procéder à un dosage de tHcy où toutes les homocystéines sous la forme de ponts disulfures doivent passer sous forme libre et ceci par réduction des ponts disulfures par un agent réducteur. De ce fait, l'homocystéine totale dosée ne compte pas l'homocystéine thiolactone et les N-Hcy-protéines qui possèdent une liaison amide

résistante aux agents réducteurs, et n'intègrent pas ce dosage. L'hyperhomocystéinémie peut se présenter sous trois formes : modérée, intermédiaire et sévère (Tableau 3) (Bottiglieri, 2005).

Concentration d'Hcy (µmol/L)	**Description**	**Causes**
5-15	Normal	
<10	Souhaitable	
16-25	Hyperhomocystéinémie Modérée	Carence en vitamine B6 Diabète Médicaments (Methotrexate, L-Dopa, contraceptifs, antidiabétiques oraux…) Style de vie (Tabac, Alcool, café…)
26-50	Hyperhomocystéinémie Intermédiaire	Carence en folate Carence en vitamine B12 Insuffisance rénale
>50	Hyperhomocystéinémie Sévère	Déficience génétique en CBS Déficit génétique d'absorption de la vitamine B12

Tableau 3: Tableau récaputilatif des concentrations physiologiques et pathologiques en homocystéine et facteurs favorisants l'hyperhomocystéinémie (adapté d'après (Bottiglieri, 2005; Ueland et al., 1993)).

IV. Pathologies associées à l'homocystéine

Une hyperhomocystéinémie est observée chez approximativement 5% de la population générale et a été associée avec certains troubles, bien qu'il soit le plus souvent difficile de déterminer si les symptômes observés chez un patient hyperhomocystéinémique sont dus à l'hyperhomocystéinémie elle-même ou si cette dernière est une conséquence de la pathologie. Ces pathologies peuvent être observées au cours du développement, de la vie adulte, du vieillissement et peuvent affecter différents organes.

IV.1. Homocystéinémie comme facteur de risque des pathologies cardiovasculaires

IV.1.a. Homocystéine et cardiopathies congénitales

Les cardiopathies congénitales (*Congenital Heart Defects* ou CHD) sont des malformations du cœur survenant au cours de sa formation, pendant la vie intra-utérine. Les CHD sont les plus fréquentes parmi les anomalies congénitales et sont responsables d'un décès sur 10 chez les

nouveau-nés. Ces cardiopathies ne sont pas obligatoirement héréditaires, et leur survenue est influencée à la fois par certains facteurs génétiques et environnementaux, notamment ceux dus à des perturbations du cycle des monocarbones, surtout des polymorphismes des gènes *MTHFR* ou *MS*, des méta-analyses ayant montré des liens significatifs entre hyperhomocystéinémie et risques de survenue des cardiopathies congénitales (Verkleij-Hagoort et al., 2007; Zhao et al., 2012).

IV.1.b. Homocystéine et maladies cardiovasculaires

Différentes études ont corrélé une hyperhomocystéinémie à la survenue de maladies cardiovasculaires et à l'athérosclérose chez l'Homme. En 1969, Kilmer McCully (McCully, 1969) avait postulé pour la première fois un effet potentiellement nocif de l'homocystéine sur la paroi vasculaire. Depuis, plusieurs travaux ont associé une carence en folates, en vitamine B12 ou vitamine B6 et/ou une élévation de la méthionine causée par un régime alimentaire riche en protéines, avec une élévation de l'Hcy et l'apparition de l'athérosclérose (Lentz, 2005; Mahalle et al., 2013). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas complètement élucidés, certains travaux semblent indiquer que l'Hcy peut favoriser la thrombose vasculaire par induction des pro-coagulants (Fryer et al., 1993; Rodgers and Kane, 1986). Garcia et al. (Garcia et al., 2011) ont montré qu'une déficience précoce en donneurs de méthyles, associée à une élévation du taux d'Hcy pouvait engendrer une cardiomyopathie chez le jeune rat via une altération de l'acéthylation/méthylation du PGC-1α (*Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivateur-α*) par PRMT1 (*Protein arginine methyl transferase 1*), une méthyltransférase et SIRT1 (*Sirtuin1*), une désacétylase. PGC-1α est un coactivateur de la transcription et joue un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire. Son activité est induite par désacétylation via SIRT1 ou par méthylation via PRMT1. Une carence en donneurs de méthyles conduit ainsi à une acétylation accrue et une diminution de la méthylation de PGC-1α dans le myocarde des animaux carencés, résultat indicatif d'une désactivation fonctionnelle de PGC-1α, pouvant expliquer le développement de l'hypertrophie du myocarde chez les ratons carencés.

IV.2. Homocystéine et diabète

Une hyperhomocystéinémie modérée a été observée chez des patients porteurs d'un diabète de type I avec microalbuminurie et néphropathie, ce qui pourrait expliquer une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires dans cette population (Vaccaro et al., 2000). A ce titre, une méta-analyse récente a montré une réduction des taux d'Hcy plasmatique après supplémentation en acide folique qui était corrélée à une forte tendance vers la diminution du contrôle glycémique comparé à l'effet placebo (Sudchada et al., 2012). De plus, il a été rapporté que certaines complications associées au diabète de type II, comme les neuropathies périphériques, tendaient à augmenter (de 23% selon les auteurs) pour toute augmentation de 1µmol/L d'Hcy plasmatique

(Gonzalez et al., 2012). D'autres études ont également montré une augmentation de l'homocystéinémie chez les patients diabétiques qui développent une athérosclérose ou une insuffisance rénale (Araki et al., 1993; Wiklund et al., 1996).

IV.3. Homocystéine et cancer

Dans différentes études, il a été montré, *in vivo* et *in vitro*, que l'hyperméthylation entraîne une répression des gènes suppresseurs de tumeurs et l'hypométhylation une activation des proto-oncogènes (Jones and Baylin, 2002). Ces événements ont été influencés, à la fois sur culture cellulaire et dans des modèles animaux, par une supplémentation ou une déplétion en donneurs de méthyles, notamment dans des modèles de cancer hépathique (Christman et al., 1993). De plus, des études ont montré que des polymorphismes des gènes de la MS et de la MS réductase sont respectivement liés à un risque augmenté d'adénome, du cancer du côlon et du cancer de sein chez les femmes ménopausées (Ding et al., 2013; Suzuki et al., 2008).

IV.4. Homocystéine et stéatose hépatique

Différentes altérations hépatiques peuvent survenir suite à une accumulation d'homocystéine intracellulaire, telles que les réactions inflammatoires, la nécrose, la fibrose ou la stéatose (Tsukamoto and Lu, 2001). Les problèmes de stéatose associés à une hyperhomocystéinémie ont été évoqués à nombreuses reprises aussi bien chez l'enfant (Carson and Neill, 1962) que chez l'homme adulte dans le cadre d'une stéatohépatie alcoolique ou non-alcoolique (Adinolfi et al., 2005; de Carvalho et al., 2013). Des cas de stéatose ont été aussi décrits chez des animaux mutés pour le gène de la CBS (Namekata et al., 2004; Robert et al., 2005) ou celui de la MTHFR (Schwahn et al., 2003; Siqueira et al., 2011). La déficience en donneurs de méthyles pourra contribuer à une stéatose hépatique par accumulation des acides gras oxydés selon des mécanismes d'altération de la méthylation (Pooya et al., 2012).

IV.5. Homocystéine et ostéoporose

L'hyperhomocystéinémie a été récemment associée à la perte osseuse au niveau de l'os coxal et aux fractures spinales chez les femmes ménopausées (El Maghraoui et al., 2012; Kim et al., 2013). Une élévation de l'Hcy totale avait été corrélée avec une augmentation du risque de fractures des os, même si un lien direct n'est pas avéré. Une revue systématique avait pourtant trouvé une preuve d'association entre tHcy et risque de fracture augmenté, mais il n'y avait pas de preuves suffisantes pour prédire un lien entre ce risque et une carence en B12 (Herrmann et al., 2007). Parallèlement, un apport en acide folique, mais pas en vitamine B2 ou B12, semblerait être associé à une augmentation de la densité minérale osseuse chez des femmes ménopausées (Rejnmark et al., 2008)

IV.6 Homocystéine et atteintes cérébrales

L'hyperhomocystéinémie a été aussi largement décrite dans le cadre de la survenue de plusieurs anomalies neurologiques à différents stades de la vie (défauts de développement cérébral, troubles neuropsychologiques, maladies neurodégénératives). L'Hcy exerce, en effet, des effets neurotoxiques (apoptose, stress oxydant, dommages de l'ADN) expliquant l'apparition de diverses pathologies et troubles neurologiques.

Une description plus détaillée de l'implication de l'Hcy dans les atteintes cérébrales sera présentée plus loin dans cette revue bibliographique, dans le second chapitre consacré au cerveau.

V. Homocystéinylation des protéines

En plus des voies de la transulfuration et de la reméthylation, l'Hcy, dans un contexte d'accumulation, peut interagir avec certaines protéines. On parle alors de protéines « homocystéinylées ».

V.1. Formation des protéines S-homocystéinylées

Il existe deux types de liaison Hcy-protéine la N-homocystéinylation et la S-homocystéinylation. Cette dernière passe par la formation de ponts disulfures (Perna et al., 2006). La formation des disulfures mixtes comme réponse fonctionnelle à la modification oxydative dans des conditions pathologiques ou physiologiques est un processus important qui se déroule dans tous les compartiments biologiques. L'augmentation de la S-thiolation des protéines est considérée comme un marqueur in vivo de dommages oxydatifs (Di Simplicio et al., 2003; Giustarini et al., 2012). Les protéines du plasma S-thiolées ont été détectées chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires (Di Giuseppe et al., 2003; Mangoni et al., 2013). Les thiols dans le plasma sont principalement liés à l'albumine, mais les interactions entre Hcy et certaines protéines ont aussi été rapportées (Lim et al., 2003; Majors et al., 2002). Ces modifications post-traductionnelles de l'Hcy peuvent avoir des conséquences importantes au niveau fonctionnel en altérant la fonction des protéines impliquées (Hajjar et al., 1998; Majors et al., 2002; Undas et al., 2001). Une étude récente a identifié 78 protéines S-homocystéinylées, normalement associées à des taux élevés en Hcy (Silla et al., 2013). Pourtant, la toxicité de la liasion protéines-S-homocystéine est moins prononcée que celle de l'Hcy elle même ou de la liaison protéines-N-Hcy (Rodriguez-Esparragon et al., 2012), ceci pouvant s'expliquer par la réversibilité de la liaison protéines-S-Hcy (Perna et al., 2006).

V.2. Homocystéine thiolactone et formation des protéines N-homocystéinylées

l'Hcy peut être convertie par l'enzyme méthionine-tRNA synthase (MetRS ou MARS) en Hcy thiolactone, un thioester cyclique de l'homocystéine (Jakubowski, 1997; Jakubowski and Goldman, 1993). Cette voie devient prédominante quand les voies de reméthylation ou de transsulfuration sont perturbées suite à des altérations génétiques des enzymes du métabolisme de l'homocystéine (CBS, MTR, MTHFR) ou à des défauts d'apports en folates, vitamine B12 ou B6, et peut ainsi conduire à une modification post-traductionnelle des protéines.

L'Hcy thiolactone est formée dans une réaction d'édition d'erreur pendant la biosynthèse des protéines quand l'Hcy prend, à tort, la place de la méthionine avec laquelle elle partage un grand degré d'homologie (Jakubowski, 2011) (figure 10). Le métabolisme subséquent de l'Hcy thiolactone se fait par deux voies. La première voie implique une réaction non-enzymatique, alors que la voie la plus importante consiste en une hydrolyse enzymatique à activité thiolactonase. Il s'agit soit d'une hydrolyse extracellulaire catalysée par l'enzyme paraoxonase 1 (PON1) dont l'activité a été surtout démontrée sur les lipoprotéines de haute densité dans le sang (Perla-Kajan and Jakubowski, 2012), soit une activité intracellulaire catalysée par la bléomycine hydrolase (Zimny et al., 2006)

En 2012, Borowczyk et al., (Borowczyk et al., 2012) ont confirmé le rôle protecteur de l'enzyme PON1 contre l'accumulation de l'Hcy thiolactone (HTL) en observant une augmentation significative de cet intermédiaire dans le cerveau des souris PON1$^{-/-}$. De plus, la fréquence des crises épileptiques induites par des injections intra-péritonéales de L-Hcy-thiolactone était significativement plus élevée chez les souris PON1$^{-/-}$, fournissant ainsi la première preuve directe que l'HTL, métabolite de l'Hcy, exerce des effets neurotoxiques, plutôt que l'Hcy elle-même.

L'HTL a des propriétés réactives uniques qui peuvent mener à l'homocystéinylation de nombreuses protéines en réagissant avec les groupes ε-amines libres des résidus lysine, formant les N-Hcy-protéines (Jakubowski, 2000; Jakubowski et al., 2000). Jusqu'alors, les sites de N-homocystéinylation n'ont été étudiés que sur deux protéines humaines, l'albumine sérique et le fibrinogène, alors que les sites pour la N-homocystéinylation du cytochrome C ont été identifiés *in vitro* (Perla-Kajan et al., 2007; Sauls et al., 2006; Sikora et al., 2010). La formation de cette liaison N-Hcy-protéine conduit à des changements structuraux des protéines ayant pour résultat leur agrégation, une diminution de leur activité biologique, allant même jusqu'à leur dégradation prématurée (Ferretti et al., 2010; Sibrian-Vazquez et al., 2010). Les N-Hcy-protéines sont sujettes aux dommages oxydatifs (Sibrian-Vazquez et al., 2010), à l'agrégation (Khazaei et al., 2012; Khodadadi et al., 2012; Stroylova et al., 2011) ; elles sont toxiques (Paoli et al., 2010) et immunogènes (Jakubowski, 2005).

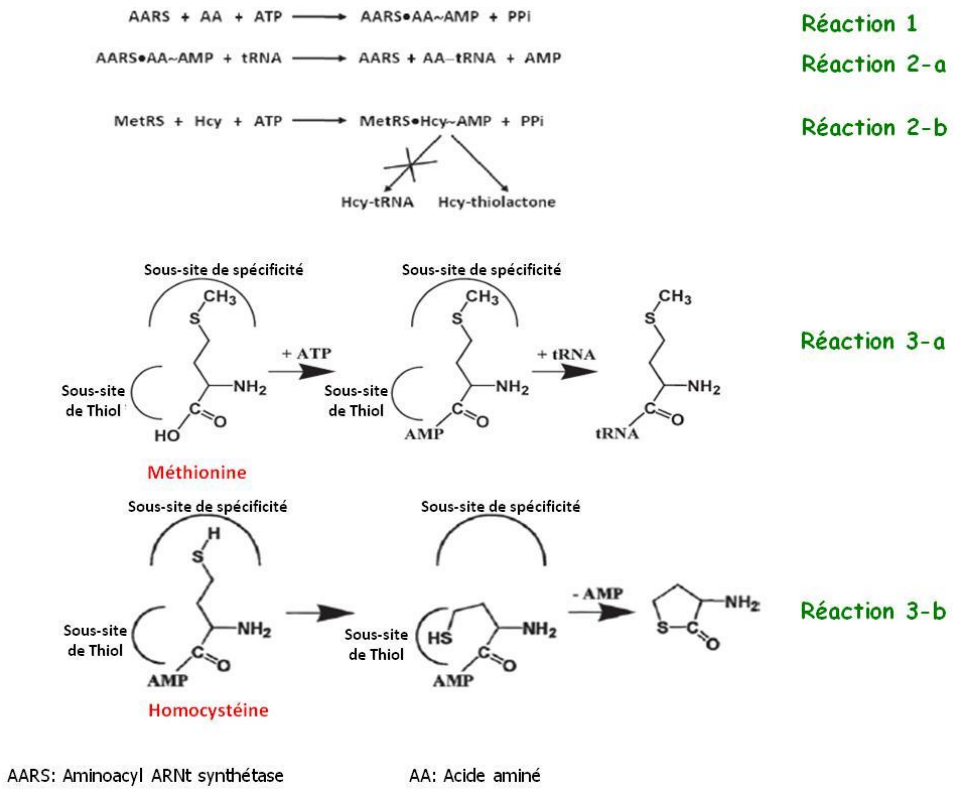


Figure 10 : Réaction d'édition de l'homocystéine (Adapté d'après (Jakubowski, 2011)).
Le chargement d'un ARNt avec un acide aminé, catalysée par une aminoacyl-ARNt (AARS) remplit deux fonctions importantes dans la synthèse des protéines : le transfert de l'information permettant la traduction du langage de l'acide nucléique en protéine, et l'activation chimique générant une liaison ester à haute énergie entre le groupe carboxyle d'un acide aminé (AA) et un groupe hydroxyle de l'extrémité 3'-terminale de l'adénosine de l'ARNt (Réaction 1, 2-a et 3-a). Due à son homologie avec la méthionine, l'Hcy intracellulaire peut être faussement activée par l'enzyme méthionine-ARNt syntéthase et convertie en un complexe intermédiaire homocystéine-AMP. Ensuite, ce complexe est catabolisé en Hcy thiolactone, empêchant de ce fait l'incorporation de l'homocystéine dans les chaînes naissantes de polypeptide (Réaction 2-b et 3-b).

V.3. N-homocystéinylation et pathologies

L'Hcy thiolactone a récemment suscité l'attention pour son rôle potentiel dans l'athérosclérose et les anomalies neurologiques, comme dans celles survenues suite à des troubles génétiques de la CBS ou la MTHFR (Chwatko et al., 2007; Jakubowski et al., 2009). Ainsi, des patients déficients en CBS manifestent des taux élevés en N-Hcy prothrombotique, ce qui pourra expliqué la susceptibilité accrue à la thrombose observée chez ces patients (Jakubowski et al., 2008). Ce métabolite pourra aussi affecter les propriétés adhésives des plaquettes sanguines, expliquant ainsi certaines caractéristiques prothrombotiques de l'Hcy (Malinowska et al., 2012)

La N-homocystéinylation du fibrinogène peut entraîner une résistance anormale des caillots de fibrine contre leur lyse, contribuant ainsi, chez les sujets hyperhomocystéinémique, à un risque accru des maladies cardiovasculaires (Sauls et al., 2006) mais aussi à la survenue, entre

autres, d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques ou d'arthrite rhumatoïde (Kwasny-Krochin et al., 2010; Undas et al., 2010).

De plus, chez l'Homme, l'Hcy thiolactone secrétée dans la circulation peut s'associer aux protéines du plasma ; ceci pourrait potentiellement contribuer au développement des complications vasculaires chez les patients diabétiques (McConnell, 1995). Ainsi, des études récentes suggèrent que l'homocystéine thiolactone pourrait éventuellement provoquer des altérations des récepteurs à l'insuline et ainsi induire une insulinorésistance via une inhibition de la synthèse insulino-stimulée d'ADN ou de protéines (Deacon et al., 1994). De plus, des études in vitro et in vivo montrent que l'HTL pourait induire des modifications structurales et une fibrillation de l'insuline, allant ainsi jusqu'à provoquer son agrégation (Frey and Hauser, 2003; Mitchell, 2005).

En effet, la N-homocystéinylation des protéines conduit à leur agrégation formant ainsi des sortes de fibrilles tel les fibrilles de l'insuline ayant un rôle possible dans les complications diabétiques (Mitchell, 2005) mais aussi surtout les fibrilles type β-amyloïdes, facteurs de risque important dans la survenue de la maladie d'Alzheimer (Caceres et al., 1992; O'Rahilly and Muller, 2002).

Enfin, la teneur en groupes carbonyles des protéines est augmentée de manière significative en conséquence de la réaction de l'albumine de sérum humain avec l'Hcy thiolactone (Sibrian-Vazquez et al., 2010). Or, il a été montré que ces groupes carbonyles des protéines s'accumulent chez des sujets hyperhomocystéinémiques et ceci dans le cas des pathologies neurologiques et les maladies liées au vieillissement comme la maladie d'Alzheimer (Craig et al., 2012; Dehmelt and Halpain, 2004; DiTella et al., 1996), le syndrôme de Werner (Flynn et al., 2012), et le syndrôme de détresse respiratoire (Garvalov et al., 2007). Ces données viennent supporter l'hypothèse que les carbonyles de protéines, produits de leur homocystéinylation, peuvent être à l'origine de maladies liées au vieillissement.

Chapitre II : Le cerveau : développement, différenciation et pathologies liées à l'homocystéine

I. Développement du système nerveux central

I.1. Biologie du développement du système nerveux central

L'implantation embryonnaire résulte de l'interaction entre un embryon parvenu au stade blastocyste dans la cavité utérine et l'endomètre décidualisé à la suite des sécrétions ovariennes et de l'action des facteurs de croissance. L'embryon arrivant au cinquième jour dans la cavité utérine où il doit s'implanter, plusieurs facteurs environnementaux peuvent interférer avec son adhésion ou sa pénétration dans l'endomètre. Dans la semaine qui suit, l'embryon est alimenté en nourriture et en oxygène par les cellules composant l'enveloppe de l'utérus. Le placenta se développe ainsi progressivement et assure les besoins de l'embryon puis du fœtus à partir du sang maternel, d'où l'importance du régime alimentaire maternel et son influence sur le développement embryonnaire.

Chez l'homme, au début de la 3ème semaine de grossesse, débute un phénomène suite auquel les cellules du blastoderme subissent des mouvements morphogénétiques embryonnaires. Ce processus correspond à la gastrulation, impliquée dans la différenciation nécessaire pour l'agencement des trois couches germinales et la formation des feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La chorde dorsale se forme à partir du mésoderme, et va émettre des signaux inducteurs vers l'ectoblaste, entraînant une différenciation de ses cellules en cellules précurseurs neurales. Durant ce processus appelé neurulation, l'ectoderme forme un épaississement, la plaque neurale (milieu de la 3ème semaine) (Figure 11A). Les bords de cette plaque neurale vont se creuser en gouttière neurale (Figure 11B) dont les bords se redressent et se rejoignent pour fermer le tube neural (milieu de la 4ème semaine chez l'Homme, 9ème jour embryonnaire chez la souris (E9)) (Figure 11C-D) (McConnell, 1995; Temple, 2001). La fermeture se produit près de la jonction du rhombencéphale et de la moelle épinière. C'est un processus bidirectionnel ; ainsi, caudalement, le processus de fermeture continue jusqu'à la fermeture du neuropore caudal, mais dans la région rostrale un deuxième site de fermeture apparaît dans le prosencéphale (O'Rahilly and Muller, 2002).

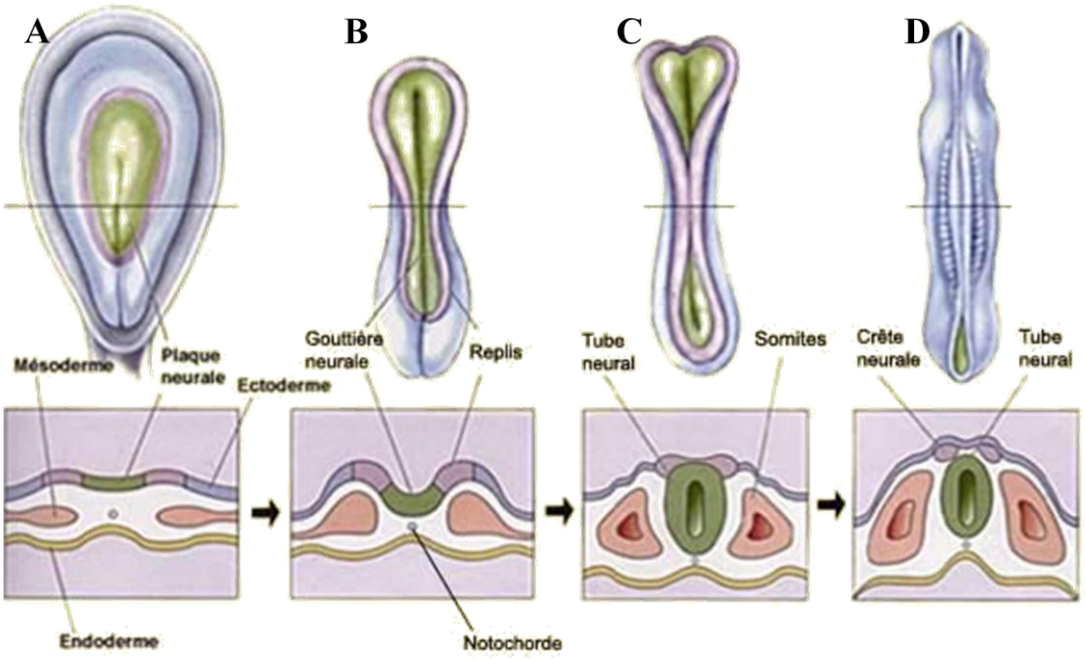


Figure 11 : Neurulation et formation du tube neural. (Disponible sur le site http://lecerveau.mcgill.ca/).
Vues dorsales (en haut) et coupes transversales (en bas) de différents stades de neurulation de l'embryon. A) Formation de la plaque neurale. B) Elévation des crêtes neurales. C) Fusion du tube neural. D) Fermeture du tube neural

Après la fermeture du tube neural antérieur, les ébauches des principales régions du cerveau prennent forme. Au sein du neuroépithélium, une succession de divisions cellulaires entraîne la formation des trois vésicules cérébrales primaires : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur).

La partie la plus rostrale du prosencéphale se différencie en télencéphale (hémisphères cérébraux, cortex et striatum). Le télencéphale se forme par évagination des hémisphères cérébraux qui se développent vers la 5ème semaine et, vers le 2ème mois, des renflements appelés éminences ganglionnaires se forment pour donner plus tard le striatum, l'amygdale et une bonne partie des neurones GABAergiques du cortex (Deacon et al., 1994). Le reste du télencéphale donne naissance aux diverses parties du cortex formant particulièrement les structures hippocampiques. La majorité des neurones de l'hippocampe sont des neurones excitateurs glutamatergiques engendrés dans les zones ventriculaires. Le diencéphale donnera naissance au thalamus et à l'hypothalamus ainsi que les cupules optiques.

Enfin, dans la région caudale, le métencéphale formera le cervelet et le pont, alors que le myélencéphale est le précurseur du futur bulbe rachidien. Le mésencéphale donnera lieu à la formation du tronc cérébral (figure 12).

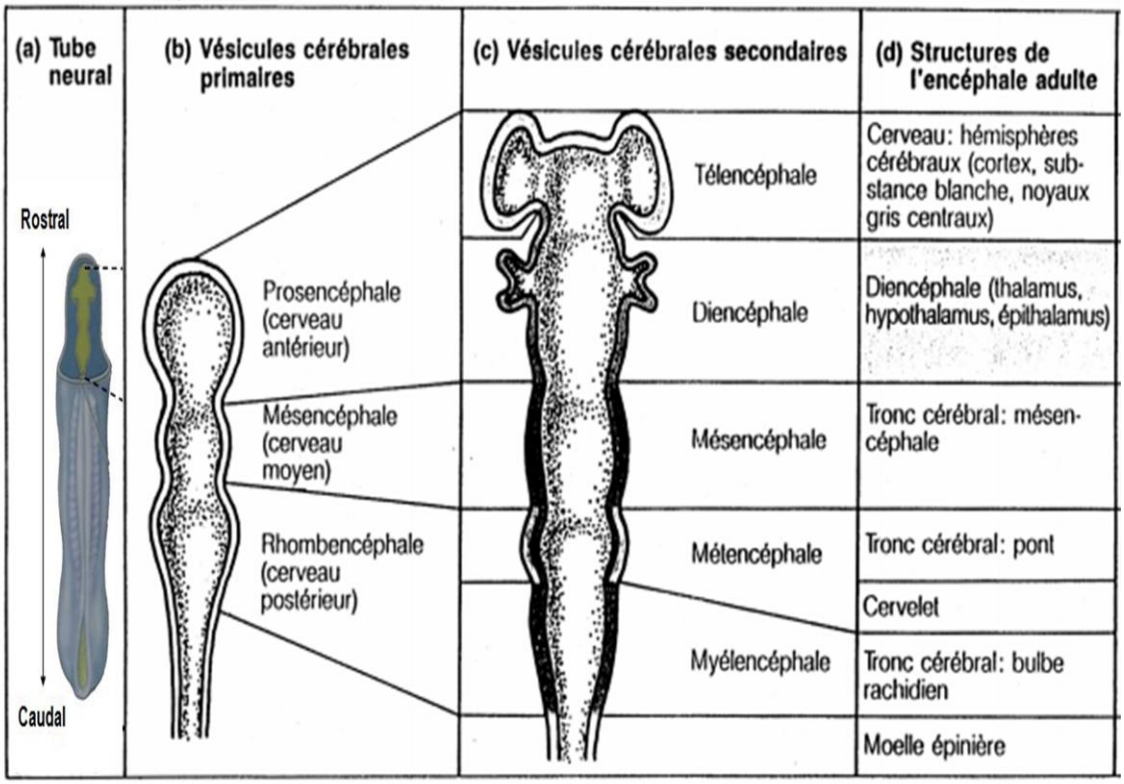


Figure 12 : Premières étapes du développement embryonnaire du système nerveux central chez les vertébrés (Disponible sur le site http://www.ufrsdv.u-bordeaux2.fr, modifiée).
A) stade tube neural. B) stade trois vésicules. C) stade cinq vésicules. D) structures cérébrales formées.

I.2. Défauts congénitaux du développement cérébral

I.2.a. Anomalies de fermeture du tube neural

Les malformations congénitales les plus fréquentes sont les anomalies de fermeture du tube neural (AFTN) consistant en des défauts structuraux le long de l'axe neural du cerveau en développement pouvant se situer du cerveau jusqu'au sacrum. Classiquement, les AFTN sont divisées en 2 groupes : les anomalies affectant les structures crâniennes, comme l'anencéphalie et l'encéphalocèle, et les anomalies impliquant les structures médullaires, le Spina Bifida (SB). Les malformations crâniennes sont les plus évidentes cliniquement, tandis que le spina bifida peut aller d'une anomalie sévère, évidente, ouverte (SB aperta) à une forme moins sévère, moins facilement reconnaissable (SB occulta) (Frey and Hauser, 2003; Nielsen et al., 2006). Le spina bifida est localisé au niveau de la colonne vertébrale, de ses enveloppes et des vertèbres qui l'entourent où la grande majorité résulte de l'échec de l'élévation et de fusions des crêtes neurales. Il est caractérisé par l'absence de soudure des arcs postérieurs et de l'apophyse épineuse d'une (SB occulta) ou de plusieurs vertèbres s'accompagnant d'une herniation de la moëlle épinière (myéloméningocèle), laquelle est mise à nu au même titre que les terminaisons nerveuses. Dans le cas de la forme méningocèle, seules les méninges font protrusion au travers des arcs vertébraux déhiscents.

La prévalence des AFTN est de 0,5 à 2/1000 grossesses dans le monde (Mitchell, 2005). Ces malformations entraînent dans les cas les plus sévères une paralysie des membres inférieurs de l'enfant, des troubles sensitifs ainsi qu'une incontinence.

I.2.b Fentes labio-palatines

Une autre malformation congénitale est la fente labio-palatine qui concerne en moyenne un enfant sur mille chez les Européens. On distingue deux formes de fente : la fente palatine, touchant le palais de la cavité buccale, et la fente labiale, correspondant à une interruption de la lèvre souvent associée à une fissure entre la deuxième incisive et la canine. La fente labio-palatine associe les deux types de fentes et dans 30% des cas, elle peut être associée à d'autres malformations - cardiaques, digestives ou au niveau du cerveau. L'origine de ces anomalies remonte à la 5ème jusqu'à la 7ème semaine de grossesse, où deux parties, appelées bourgeons, se soudent lors du développement du visage du fœtus : le bourgeon maxillaire qui correspond au bas du visage, et le bourgeon naso-frontal qui constitue le nez et le front. Cette anomalie s'accompagne de difficultés de parler et de s'alimenter.

II. Différenciation cellulaire

Le terme de « différenciation » est utilisé pour caractériser le processus de maturation s'exerçant sur un précurseur, et provoquant sa transformation progressive en cellule maure, morphologiquement et fonctionnellement différenciée.

II.1. Types cellulaires présents dans le système nerveux central (SNC)

Au niveau tissulaire, et après la différenciation cellulaire, le système nerveux central est constitué de deux grands ensembles de cellules : les neurones et les cellules gliales.

Les cellules gliales sont les plus nombreuses et constituent 90% des cellules du SNC, et sont elles-mêmes subdivisées en trois types : oligodendrocytes, astrocytes et cellules épendymaires. Ces cellules occupent tout l'espace entre les neurones, leur assurant un soutien structural et métabolique.

Les astrocytes sont des cellules étoilées pourvues de prolongements ramifiés en contact direct avec les vaisseaux sanguins et les neurones, ce qui permet l'échange de nutriments entre sang, liquide céphalorachidien et neurones. Elles participent ainsi à la constitution de la barrière hémato-encéphalique. Leur cytoplasme renferme un type particulier de filaments intermédiaires : la protéine glio fibrillaire acide (GFAP). Les oligodendrocytes, dont les prolongements enveloppent les axones des neurones, ont pour fonction principale d'assurer la myélinisation. La myélinisation des neurones permet d'isoler les axones de leur environnement et donc d'assurer une meilleure conduction de l'information nerveuse. Il existe deux types principaux

d'oligodendrocytes : l'oligodendrocyte clair présent chez le fœtus et le nouveau-né ; il s'agit d'une cellule de grande taille, active, fréquemment en division ; et l'oligodendrocyte sombre rencontré chez l'adulte ; c'est une cellule de petite taille, qui ne se divise pas. Enfin, les cellules épendymaires bordent l'épendyme (d'où leur nom) et les ventricules cérébraux, séparant le tissu nerveux du liquide céphalo-rachidien.

Les neurones constituent l'unité structurale de traitement de l'information dans le système nerveux central. Leur fonction est de recevoir, traiter et envoyer « des informations » vers d'autres neurones, en passant par les synapses, point de connexion entre les neurones. Ce système actif nécessite des dépenses métaboliques très élevées (20% du métabolisme de l'organisme). Il est constitué essentiellement de trois grands types de neurones : les neurones moteurs (pour transporter des informations motrices), les neurones sensoriels (pour transporter des informations sensorielles) et les interneurones (qui transmettent des informations entre les différents types de neurones).

II.2. Différenciation et mise en place des lignages cellulaires

Il est connu qu'à l'exception de la microglie, toutes les cellules constituant le SNC dérivent du neuroectoderme. Ainsi, neurones, astrocytes et oligodendrocytes dérivent d'un précurseur commun, une cellule souche neurale (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2008). La cellule souche est une cellule multipotente présente dans le neuroépithélium (Alvarez-Buylla et al., 2001). En effet, comme décrit plus tôt, le neurectoderme s'invagine en gouttière neurale dont les bords se relèvent pour former le tube neural qui contient ces cellules souches qui se développent avec une intense activité mitotique (Mione et al., 1997; Temple, 2001). Ensuite, la différenciation de ces cellules épithéliales commence dans le rhombencéphale dès la fin de la 4e semaine, et ceci selon un phénomène régulé de manière spatio-temporelle (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2008; Temple, 2001). De façon générale, la différenciation neuronale a lieu à des stades embryonnaires précoces et la différenciation des cellules neuroépithéliales en neuroblastes est maximale entre la 15ème et la 20ème semaine, avec un second pic vers la 25ème semaine. Les deux autres lignages apparaissent plus tardivement pendant le développement embryonnaire, allant même jusqu'au stade postnatal, ce qui pourrait expliquer la présence des cellules souches nerveuses adultes.

Pendant la différenciation, les mécanismes par lesquels une cellule souche donne lieu à différents types cellulaires ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, il est maintenant connu que ce phénomène passe par la formation de précurseurs intermédiaires aux potentialités progressivement limitées et qui aboutiront à des cellules différenciées à différents stade du développement (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) (figure 13).

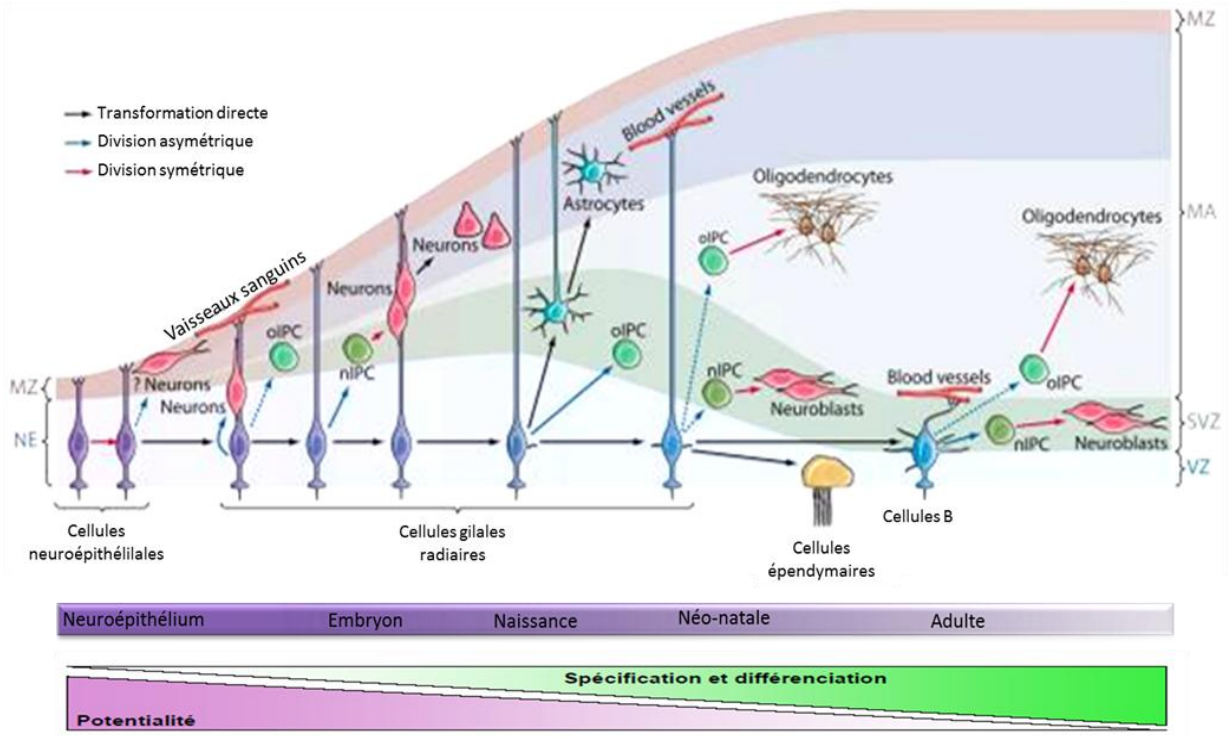


Figure 13 : Nature gliale des cellules souches neurales (CSN) dans le développement et chez l'adulte (Adapté d'après (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)).

Pendant le développement, la plupart des cellules neuroépithéliales se divisent symétriquement pour produire des cellules neuroépithéliales dont certaines sont susceptibles de générer des neurones précoces par division asymétrique. Avec l'épaississement de l'épithélium du cerveau en développement, les cellules neuroépithéliales s'allongent et se transforment en cellules gliales radiaires. Ces cellules gliales radiaires (RG) se divisent de manière asymétrique pour générer des neurones directement ou indirectement par l'intermédiaire des cellules progénitrices intermédiaires (nIPCs). Les oligodendrocytes dérivent également des RG à travers d'autres cellules progénitrices intermédiaires, les oIPCs.

Avec l'épaississement du cerveau et à la fin du développement embryonnaire, la plupart des RG se détachent du côté apical et se convertissent en astrocytes tandis que la production oIPC continue. Une sous-population de cellules gliales radiaires conserve le contact apical et continue à fonctionner en tant que cellules souches. Les cellules gliales radiaires néonatales continuent à générer des neurones et des oligodendrocytes par les nIPCs et oIPCS. Cependant certaines sont converties en cellules épendymaires, tandis que d'autres se transforment en astrocytes SVZ adultes (cellules de type B) qui continuent à fonctionner comme cellules souches chez l'adulte.

IPC, cellules progénitrices intermédiaires; MA, manteau; MZ, zone marginale; NE, neuroépithélium; nIPC, cellules progénitrices neuronales; oIPC, cellules progénitrices oligodendritiques; SVZ, zone subventriculaire; VZ, zone ventriculaire.

III. Différenciation neuronale

La spécification cellulaire en cellule neuronale ou gliale est contrôlée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (Caldwell et al., 2001; Pathania et al.). Les facteurs intrinsèques correspondent notamment à certains facteurs de transcription. On regroupe sous le terme de facteurs extrinsèques les facteurs extérieurs à la cellule, tels que certains facteurs de croissance, ainsi que les interactions entre cellules voisines.

La morphologie des cellules est aussi essentielle pour leur fonction. Les neurones possèdent des neurites qui donneront naissance à un axone et plusieurs dendrites pour transmettre les

signaux du système nerveux central. Le processus de polarisation neuronale, qui permettra de générer l'axone, est guidé par le cytosquelette.

III.1. Polarisation neuronale

Au moment de la différenciation, les neurones se présentent sous forme de sphères non polarisées, qui migrent ensuite vers leur destination finale (Marin et al.). Suite à leur migration, des neurites mineurs commencent à se former (LoTurco and Bai, 2006) dont l'un s'allongent pour donner l'axone.

La différenciation des cellules neuronales implique la présence d'un domaine à l'avant de la cellule spécialisé dans le mouvement cellulaire. Effectivement, le phénomène de croissance de l'axone et des dendrites est guidé par une structure particulière, nommée cône de croissance (Lowery and Van Vactor, 2009; Stiess and Bradke, ; Witte et al., 2008).

Au centre du neurone qui s'allonge pour former un cône de croissance en progression, un cytosquelette se forme par polymérisation de tubuline α et β. Ensuite, c'est la polymérisation de l'actine qui provoque l'avancement du cône de croissance en se projetant pour former des filopodes (figure 14). La bonne mise en forme du cytosquelette des neurites conditionne l'établissement de connexions fonctionnelles entre les neurones, et ainsi la transmission de l'influx nerveux le long des axones et au niveau des synapses.

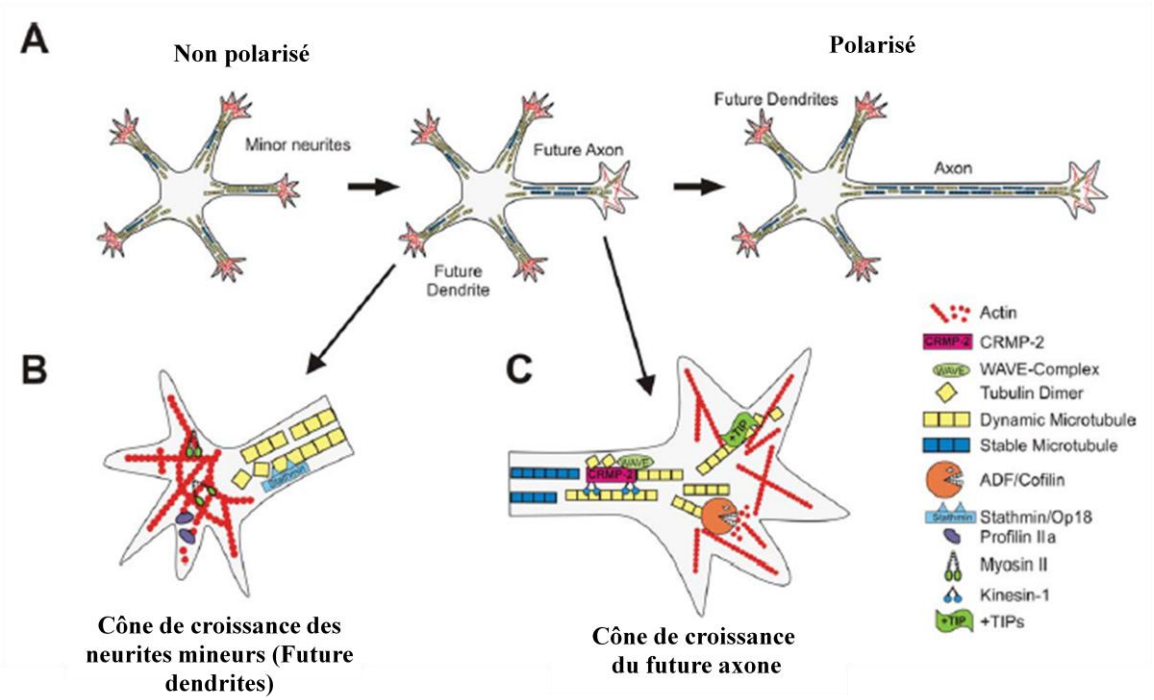


Figure 14 : Régulation de la formation des dendrites et de l'axone par le cytosquelette (D'après (Stiess and Bradke)).

A) Polarisation neuronale : un des neurites s'allongent pour former l'axone. Cette spécification est régulée par le cytosquelette par stabilisation des microtubules et déstabilisation des microfilaments d'actine qui deviennent plus dynamique dans ce qu'on appelle le « Cône de croissance ». B) Cône de croissance des neurites mineurs, petit et moins dynamique que celui de l'axone. Les myosines II stabilisent les microfilaments d'actine qui deviennent plus rigides. C) Cône de croissance dynamique du futur axone. Les microfilaments d'actine sont déstabilisés par le complexe ADF/Cofiline, ce qui conduit à la polymérisation des tubulines et la protrusion des microtubules.

III.2. Rôle du cytosquelette dans la différenciation

Comme son nom l'indique, le cytosquelette est l'ossature de la cellule ; il régit l'organisation intracellulaire de ses composants. Il est essentiel à la différenciation de la cellule car il intervient dans de nombreux processus tels que l'acquisition et le maintien de la morphologie et la polarité cellulaire (Witte et al., 2008). C'est une structure dynamique et constamment réorganisée lors de la division cellulaire, de la migration, du transport vésiculaire, et de la formation de prolongements cellulaires, axone et dendrites.

Le cytosquelette est constitué de polymères de protéines, qu'on qualifie aussi de fibres étant donnée leur taille importante à l'échelle cellulaire. On les classe en trois catégories d'après leur diamètre en microscopie électronique : les microtubules (MT) (25 nm de diamètre), les microfilaments d'actine (7 à 9 nm) et les filaments intermédiaires (10 nm). Toutes ces composantes sont renouvelées en permanence par polymérisation, et ce sont ces réorganisations dynamiques du cytosquelette d'actine et de microtubules qui coopèrent pour réguler la différenciation, la migration neuronale et finalement la mise en place du SNC.

III.3. Organisation du cytosquelette

III.3.1. Microtubules et protéines associées

Les microtubules sont formés de deux sous-unités non identiques de tubuline α et β capables de s'auto-associer longitudinalement pour former les protofilaments qui s'associent à leur tour de manière hélicoïdale formant une structure rigide de forme cylindrique (figure 15). Ce sont des structures polarisées et dynamiques. Les microtubules présentent une extrémité « plus » où l'incorporation de tubuline est favorisée, et une extrémité « moins » où la perte de tubuline est importante et dont la vitesse d'incorporation des dimères est plus lente (Howard and Hyman, 2003). Cette polarité des microtubules est essentielle pour l'accrochage et le déplacement de complexes protéiques.

La présence de GTP, à l'extrémité du microtubule, rend celui-ci plus stable, tandis que son hydrolyse en GDP entraîne un affaiblissement des liaisons entre dimère et polymère et le fragilise, conduisant ainsi à sa dépolymérisation (figure 15) (Quiniou et al., 2013). Dans les neurones, les microtubules sont particulièrement stables comparés à ceux d'autres types cellulaires (Seitz-Tutter et al., 1988). Cette stabilité est due à des modifications de la tubuline conférant une conformation particulière aux microtubules. L'une des modifications majeures est l'acétylation qui se produit sur la tubuline polymérisée en microtubules en état stable, et non pas sur celle des microtubules qui sont dans une dynamique de polymérisation/dépolymérisation rapide (Asthana et al., 2013).

La stabilité des microtubules est aussi due à une conformation particulière qu'ils acquièrent grâce à des protéines associées aux microtubules ou MAPs. Ces MAPs sont regroupées en deux grands groupes selon leur fonction. On distingue ainsi les MAPs structurales des MAPs motrices.

Les MAPs structurales, principalement les MAPs de types I (MAP-1) et II (MAP-2) et les protéines Tau (tubuline-associated unit), sont responsables de la bonne conformation des microtubules et régulent leur architecture et leur stabilisation. D'une manière générale, MAP-2 est nécessaire à la formation globale des neurites (Caceres et al., 1992) alors que MAP-1 et Tau sont plutôt nécessaire à la formation des axones (Dehmelt and Halpain, 2004; DiTella et al., 1996).

Les MAPs motrices se chargent du déplacement le long des microtubules des protéines nécessaires au fonctionnement neuronal, et permettent le mouvement pour maintenir la place des organites de la cellule. Cette activité nécessite de l'énergie, sous forme d'ATP. Ce sont des ATPases telles les kinésines et les dynéines. La kinésine se déplace vers l'extrémité positive des microtubules, on parle du transport antérograde, tandis que les dynéines transportent vers l'extrémité négative des microtubules, on parle du transport rétrograde.

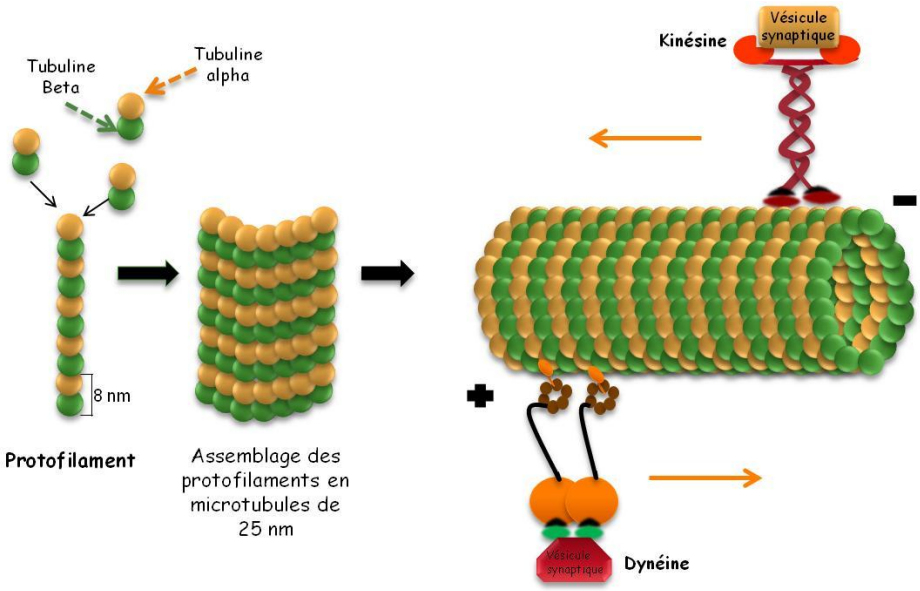


Figure 15 : Les microtublues.

La formation des microtubules débute par l'association des monomères de tubulines α et β pour former un protofilament. Les protofilaments s'associent ensuite longitudinalement et de manière hélicoïdale afin de former un microtubule. Les microtubules sont associés à des protéines structurales jouant un rôle dans leur stabilisation, et à des protéines motrices responsables du déplacement le long des microtubules des protéines nécessaires au fonctionnement neuronal.

III.3.2. Actine

Les microfilaments d'actine sont composés de monomères d'actine polymérisés dans une structure fibrillaire sous forme de double hélice. Ce sont des structures dynamiques et polarisées, et le facteur qui règle leur stabilité est l'ATP. En effet, l'extrémité « plus » va avoir tendance à capter de l'ATP-actine, favorisant ainsi la polymérisation à cette extrémité. En revanche, à l'extrémité « moins », l'ADP-actine cause le déplacement de l'équilibre vers la dépolymérisation. Cette dépolymérisation implique différentes protéines comme l'ADF/Cofiline (*Actin depolymerizing factor/Cofilin*). Cette protéine se trouve enrichie dans le cône de croissance et sa surexpression induit la croissance axonale (Flynn et al., 2012; Ford et al., 2010; Garvalov et al., 2007). L'interaction de l'actine avec la vinculine est aussi importante pour son regroupement et sa polymérisation, et par conséquence pour assurer son rôle de motilité dans le cône de croissance (Thompson et al., 2013).

Dans le cône de croissance d'un axone en formation, le cytosquelette d'actine devient plus dynamique et moins condensé, comparé à celui des futurs dendrites (Kunda et al., 2001). Les myosines jouent aussi un rôle dans la régulation de ce dynamisme (Craig et al., 2012). En effet, l'inhibition de la myosine II non musculaire (*non-muscle myosin*) déclenche l'extension des neurites et la croissance de l'axone alors qu'elle affecte négativement l'extension des dendrites (Flynn et al., 2009; Kollins et al., 2009). De la même façon, l'inhibition de la liaison tropomyosine-actine pourrait inhiber la formation des extensions neuritiques (Moroz et al., 2013) (figure 16).

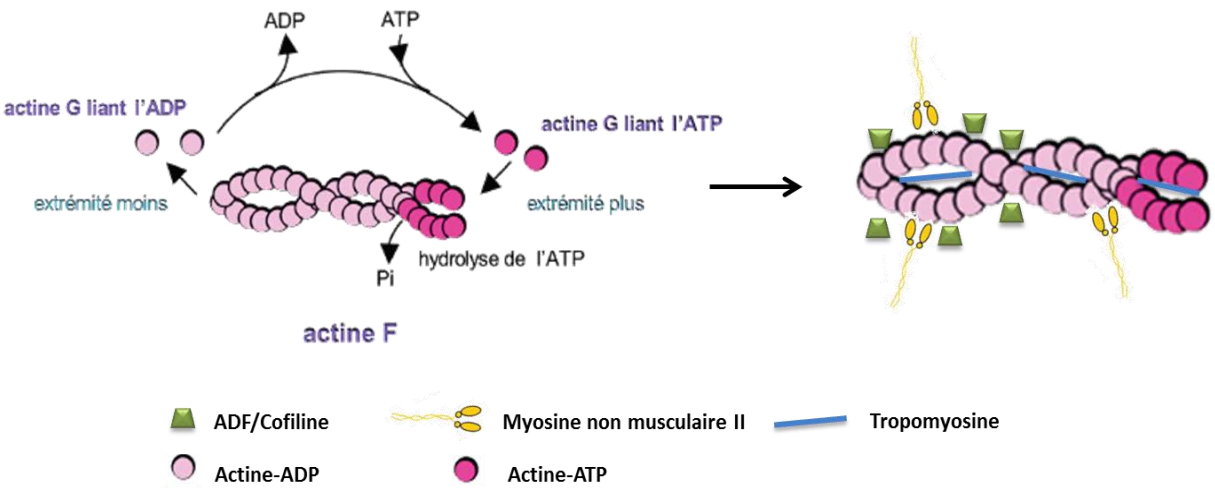


Figure 16 : Les microfilaments d'actine.
Le complexe ADF/Cofiline se lie aux microfilaments d'actine à l'extrémité moins liant l'ADP, accélérant ainsi la dépolymérisation. Les myosines sont des protéines motrices qui se lient aussi aux microtubules et utilisent l'énergie provenant de l'ATP pour générer la force nécessaire au mouvement des neurones. La présence des tropomyosines empêche la liaison des myosines II à l'actine, régulant ainsi le dynamisme et la stabilité du cytosquelette d'actine.

III.3.3. Filaments intermédiares

Ce sont les éléments les moins dynamiques du cytosquelette, et ils sont non polarisés. Dans le système nerveux, ils sont désignés sous le terme de neurofilaments (NF). Ce sont des hétéropolymères composés de trois sous-unités, à savoir polypeptides neurofilamentaires lourds, moyens et légers (NFH, NFM et NFL, respectivement) (Yuan et al., 2012). Les neurones peuvent aussi exprimer d'autres protéines de filaments intermédiaires, y compris la nestine et la vimentine (Perrin et al., 2005).

Au niveau des neurones, les neurofilaments interviennent dans la croissance radiale de l'axone et déterminent ainsi son diamètre (Hoffman et al., 1987). Or, le diamètre d'un axone est directement corrélé à la vitesse de conduction de l'influx nerveux. Ainsi, des défauts d'expression des neurofilaments pourraient être à la base des défauts de transport axonal impliqués dans plusieurs maladies dégénératives (Sadananda and Ray, 2012). Une maladie dans laquelle l'accumulation de neurofilaments a été décrite est la sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie neurodégénérative progressive et mortelle causée par la dégénérescence des neurones moteurs (Lu et al., 2012). Des données récentes suggèrent que les NFs pourraient servir de biomarqueurs pronostiques d'une lésion ou de dégénérescence axonale rétrograde au cours de certains syndromes neurologiques (Dujmovic et al., 2013; Kuhle et al., 2013).

IV. Homocystéine et pathologies développementales et neurologiques

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'hyperhomocystéinémie a fréquemment été associée, notamment en relation avec ses effets toxiques, à la survenue de différentes

anomalies du développement, de troubles neuropsychologiques (dépression, schizophrénie, démence…) et de maladies neurodégénératives. Ce chapitre passe en revue ce lien à la lumière des données de la littérature.

IV.1. Homocystéine et pathologies gravidiques

De nombreuses études ont montré que les carences en vitamine B pendant la période péri-conceptionnelle sont associées à des problèmes de fertilité, tant chez l'homme que chez la femme, et à des avortements spontanés à répétition (Forges et al., 2007). A ce titre, la déficience en B12, le polymorphisme des gènes codant pour la MTHFR et le gène du récepteur des folates réduits pourraient rendre compte d'environ 40% des cas d'infertilité non expliquée chez au moins un des deux partenaires impliqués (Altmae et al., 2010; Pront et al., 2009; Sery et al., 2012).

L'hyperhomocystéinémie a été associée à l'apparition de plusieurs pathologies gravidiques, comme la pré-éclampsie, l'hématome rétro-placentaire, les défauts de pré-implantation des embryons, retard de croissance intra-utérin, mort *in utero*...

Différentes études cliniques (Dekker et al., 1995; Rajkovic et al., 1997) ont rapporté que 20% des femmes présentant une pré-éclampsie sévère à survenue précoce avaient une hyperhomocystéinémie avec atteinte de cellules endothéliales vasculaires via un stress oxydant (Roberts et al., 1989). En fait, il a été démontré que les propriétés pro-oxydantes de l'homocystéine peuvent être à l'origine d'un retard du développement des blastocystes bovins et murins (Ikeda et al., 2010; Menezo et al., 1989).

En 1989, Menezo et ses collaborateurs avaient alors montré que la conversion de la méthionine en SAM existe dans les ovocytes murins et les embryons préimplantatoires. Par ailleurs, La diminution d'apport en folates ou en méthionine avait pour effet l'inhibition de la division cellulaire, empêchant le passage d'un stade développemental à un autre, souvent par blocage au stade de 8 cellules, empêchant ainsi la formation des blastocystes (Menezo et al., 1989; O'Neill, 1998). Depuis, il a été récemment montré que les ovocytes et les embryons préimplantatoires des mammifères expriment quasiment toutes les enzymes qui participent à la régulation du cycle des monocarbones (Benkhalifa et al., 2010; Ikeda et al., 2012; Ikeda et al., 2010; Kwong et al., 2010), de même que celles intervenant dans le transport des folates (Matherly et al., 2007), suggérant ainsi qu'ils peuvent métaboliser indépendamment les nutriments intervenant dans la régulation de ce cycle.

La perturbation du métabolisme des monocarbones pourrait ainsi être à l'origine des défauts de pré- implantation des embryons, associés à la survenue des avortements spontanés. C'est en

1993 que Wouters (Wouters et al., 1993) avait, pour la première fois, associé les avortements spontanés à un excès d'Hcy par la perturbation subséquente de l'implantation suite à une altération des vaisseaux déciduaux ou chorioniques. Par ailleurs, deux équipes (Burke et al., 1992; Leeda et al., 1998) ont montré que les enfants de nés de femmes présentant une hyperhomocystéinémie avaient sept fois plus de risque de développer un retard de croissance intra-utérin que dans la population normale. Les différents problèmes rencontrés passent, au moins en partie, par les effets de l'homocystéine qui provoque des maladies vasculaires placentaires (infarctus ou décollement placentaire) et un déséquilibre hormonal à l'origine notamment du syndrome de Stein-Leventhal (Chakraborty et al., 2013; Ebisch et al., 2007; Forges et al., 2007; Sibai, 1999).

IV.2. Homocystéine et défauts de fermeture du tube neural

En 1976, Smithels et ses collaborateurs (Smithells et al., 1976) ont montré qu'une hyperhomocystéinémie au cours de la grossesse, augmente significativement le risque d'apparition de pathologies de développement du système nerveux, principalement avec des anomalies de la formation du tube neural (ou *Neural Tube Defect*, NTD) chez le fœtus, aboutissant à un des différents types de spina bifida, avec des conséquences plus ou moins graves.

Il est actuellement admis que parmi les facteurs environnementaux connus comme des déterminants de la survenue des NTD, le statut en folates est l'un des facteurs les plus importants à considérer dans l'étiologie de ces anomalies (van der Put and Blom, 2000). En 2005, Boyles et al. (Boyles et al., 2005) ont publié une revue résumant la liste des gènes candidats dans la survenue des NTD et une mise à jour de cette liste montre la présence significative des gènes relatifs au métabolisme des monocarbones et au transport des folates (Farkas et al., 2013b; Greene et al., 2009). Ainsi la présence d'une hyperhomocystéinémie, suite à une perturbation de ce métabolisme pendant la prolifération, la différenciation et la mort des cellules néoformées lors de la formation du tube neural, est associée à des spina bifida. Sur des cultures de cellules cérébrales embryonnaires, des auteurs ont montré que la baisse de folates ou l'inhibition du métabolisme des monocarbones réduit la prolifération des cellules souches astrocytaires et neuronales et augmente l'apoptose en modifiant la quantité et l'appariement des nucléotides à l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire (Kruman et al., 2002; Mattson et al., 2000). La déficience en vitamine B12 durant la gestation provoque également une augmentation des altérations du développement du système nerveux du fœtus (Li and Sheng, 2003).

Certaines études avaient montré que les défauts de fermeture du tube neural ne serait pas dues à une action directe de l'homocystéine, mais à une anomalie de fonctionnement de la

méthionine synthase ou à un polymorphisme au niveau de son gène (Gueant-Rodriguez et al., 2003; Ouyang et al., 2013). L'altération de l'enzyme engendrerait certes une accumulation de l'homocystéine mais aussi un déficit de méthionine nécessaire à la synthèse de la myéline.

Le lien entre NTD et hyperhomocystéinémie a été étudié dans plusieurs modèles animaux qui permettent d'étudier d'avantage les mécanismes de survenue de ces anomalies. Il a été montré que l'Hcy provoque des perturbations dans la morphologie de la moelle épinière en lien avec un changement de l'expression de certains gènes de développement, Pax 1/9 et Sox9 dans le mésenchyme axial (Kobus et al., 2013). En plus, des altérations squelettiques de type syndactylie et queue tordus observés dans des modèles de rongeurs, et équivalentes aux anomalies de fermeture du tube neural observées chez l'homme, sont associées à la déficience en folates sans que ceci soit lié à la diminution de potentiel de méthylation lié à la carence (Burren et al., 2010; De Castro et al., 2010).

IV.3. Homocystéine et fentes labio-maxillo-palatines

A côté des malformations neurales, on distingue des malformations faciales telles que les fentes labio-maxillo-palatines représentant la malformation faciale la plus fréquente. La survenue de ces malformations est attribuée à l'association de facteurs génétiques et nutritionnels.

Différents facteurs environnemenataux semblent jouer un rôle dans la formation des fentes labiopalatines (FLP: fente labiale et fente palatine). Ainsi, les femmes ayant un enfant atteint présentaient des apports en thiamine, niacine et pyridoxine significativement inférieurs à ceux des mères témoins. Toutefois, l'apport en folates reste le déterminant majeur dans la protection contre la survenue de ces malformations. L'effet protecteur d'un apport élevé en vitamines B n'a été mis en évidence que chez les femmes prenant des compléments d'acide folique (Krapels et al., 2004; Schubert and Krost, 2006). De plus, différentes études ont mis en évidence qu'une inactivation du gène *Folbp1* (*Folic acid-binding protein one*), médiateur du transport de l'acide folique dans les cellules épithéliales, sur un modèle de souris *Folbp1-/-* entraîne des anomalies de fermeture du tube neural et des malformations cranio-faciales telles que les fentes labio-maxillo-palatines pouvant même aller jusqu'à la mort *in utero* du foetus. Une supplémentation en acide folique des mères avant et pendant la gestation sauve une majorité de foetus d'une mort prématurée avec une diminution de ces malformations qui se manifestent par un défaut de fermeture fronto-nasale, et l'absence au niveau des maxillaires de l'axe bilatéral (Spiegelstein et al., 2004; Tang et al., 2005).

Un lien direct a été établi entre la survenue des FLP et l'hyperhomocystéinémie, le polymorphisme des gènes *MTHFR*, la MTR et la BHMT (Chorna et al., 2011; Hu et al., 2011;

Verkleij-Hagoort et al., 2007; Wong et al., 1999). De plus, une étude récente a montré que le degré d'augmentation de l'Hcy susceptible de provoquer ces malformations est plus élevé chez les femmes, ce qui pourrait expliquer la prévalence plus élevée de survenue des FLP chez les garçons (Kumari et al., 2013).

IV.4. Homocystéine et autres pathologies développementales

La trisomie 21 (Syndrôme de Down) est une anomalie chromosomique congénitale ayant pour origine des perturbations métaboliques et génétiques provoquant la présence d'un chromosome surnuméraire pour la 21ème paire par défaut de division durant la méiose.

Une carence en folates et en donneurs de groupements méthyles pourrait être impliquée dans ce défaut de division chromosomique provoquant une diminution des performances intellectuelles, des troubles neurologiques et des signes de démence (Leblhuber et al., 2001; Mohanty et al., 2012; van Leeuwen et al., 2000). La présence d'une mutation au niveau de certains gènes impliqués dans le métabolisme des monocarbones, associée à un statut insuffisant en donneurs de méthyles et une augmentation des concentrations en acide méthylmalonique (MMA), a pour conséquence une altération du développement du tube neural et la survenue du syndrôme de Down (Wilson et al., 1998; Zampieri et al., 2012). La double hétérozygotie MTR 2756 A→G et MTRR 66A→G chez une mère représente le risque le plus élevé d'avoir un enfant porteur d'une trisomie 21 (Bosco et al., 2003). Chez l'enfant, la déficience en vitamine B12 peut engendrer divers problèmes (hypotonie sévère, apathie…) qui pourraient être le reflet d'un déficit de la myélinisation (Lovblad et al., 1997). Par ailleurs, la déficience hériditaire de la transcobalamine II provoque des anomalies neurologiques caractérisées par un retard intellectuel, une ataxie… (Thomas et al., 1982).

IV.5. Homocystéine et pathologies neurologiques chez l'adulte

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la prévalence en 2011 en France des troubles psychiatriques tels que les épisodes de dépression et d'anxiété et la schizophrénie est respectivement de 8%, 17% et 1% de la population adulte. Le même rapport publié par l'OMS indiquait que les troubles mentaux constituent une des plus lourdes charges en termes de morbidité dans le monde, affectant environ 450 millions de personnes, soit entre 20 et 25% de la population en Europe.

Différents facteurs génétiques et environnementaux contribuent à la mise en place de ces pathologies, parmi lesquels ceux associés à une hyperhomocystéinémie. En 1970, Reynolds et al., (Reynolds et al., 1970) furent les premiers à montrer que des patients souffrant de dépression présentaient des taux de folates plasmatiques faibles comparés aux sujets non dépressifs. Plus récemment, Bottiglieri et al., ont mené des travaux sur des patients atteints de dépression et

d'hypovitaminose en B12/B9 et ont apporté la preuve d'un mécanisme impliquant l'hyperhomocystéinémie, la SAM et des perturbations dans les réactions de méthylation et du métabolisme des neurotransmetteurs (dopamine, noradrénaline et sérotonine) avançant ainsi l'effet bénéfique d'un traitement par la SAM contre les manifestations dépressives (Bottiglieri et al., 2012; Bottiglieri et al., 1990; Bottiglieri et al., 2000). D'autres études ont montré aussi l'effet bénéfique de la supplémentation en folates pour soigner la pathologie (Alpert et al., 2000; Papakostas et al., 2012).

Parallèlement à la dépression, des travaux ont montré un risque accru de développer une schizophrénie en cas d'hyperhomocystéinémie associée à une carence en folates ou à un polymorphisme du gène *MTHFR* (Regland et al., 1995; Susser et al., 1998). Des études de cas récents ont montré un lien significatif entre l'hyperhomocystéinémie et la survenue de schizophrénie ou de troubles anxieux (Mabrouk et al., 2011; Meier et al., 2010).

IV.6. Homocystéine et pathologies liées au vieillissement

IV.6.1. Homocystéine et maladie de Parkinson

Une perturbation du métabolisme des monocarbones pourrait être corrélée à l'apparition de la maladie de Parkinson (MP) que ça soit par augmentation de l'homocystéine plasmatique (Heider et al., 2004), surtout s'il existe un polymorphisme de la MTHFR (Bialecka et al., 2012; Fong et al., 2011), ou par diminution du potentiel de méthylation (rapport SAM/SAH) (Kaut et al., 2012; Obeid et al., 2009). Une hyperhomocystéinémie est surtout observée suite à un traitement par Levodopa (L-dopa), traitement contre la MP, avec des implications dans la survenue de certains dommages oxidatifs et des troubles cognitifs et démentiels au cours de la maladie (Gorgone et al., 2010; Isobe et al., 2010; Zoccolella et al., 2010). Une étude réalisée par Lee et al. (Lee et al., 2010) suggère qu'une thérapie permettant de diminuer les taux d'Hcy pourrait prévenir la perte osseuse chez les patients parkinsoniens traités à la lévodopa.

Des études ont montré que la baisse de l'apport en donneurs de méthyles à l'origine d'une hyperhomocystéinémie pourrait accélérer le processus de neurodégénérescence (Qureshi et al., 2008). Bien que la carence en folates semble être plus déterminante dans la survenue de la MP comparée aux autres vitamines du groupe B (dos Santos et al., 2009; Duan et al., 2002; Triantafyllou et al., 2008), la carence en B12 a aussi été impliquée et associée aux troubles cognitifs observés (Triantafyllou et al., 2008).

IV.6.2. Homocystéine et maladie d'Alzheimer

De nombreuses études ont associé une augmentation des taux d'Hcy plasmatique à la survenue de la maladie d'Alzheimer (MA) (Czapski et al., 2012; Ray et al., 2013; Zhang et al., 2008a). Cependant, la question fréquemment soulevée est de savoir si l'homocystéine est un

agent causal ou un biomarqueur de la pathologie (Farkas et al., 2013a; Zhuo et al., 2011). Farkas et al. ont montré dans un modèle de la maladie d'Alzheimer chez les souris transgéniques « ArcAβ », qu'un régime pauvre en donneurs de méthyles favorise davantage l'augmentation des taux d'Hcy par rapport aux souris témoins. Ils postulent ainsi que ces souris transgéniques seraient plus sensibles aux effets de la déplétion, notamment en 5-MeTHF, et donc plus vulnérables. Ceci fait valoir que la pathologie pourrait prédisposer à l'hyperhomocystéinémie considérée comme conséquence de la MA. Cependant, les auteurs ont aussi observé que la réduction des folates alimentaires et l'augmentation de l'homocystéine sont associées à une augmentation des concentrations des peptides β-amyloïdes, que ce soit dans le plasma (jeunes animaux) ou le cerveau (animaux âgés). Ceci suggère que le régime favorisant une hyperhomocystéinémie pourrait aggraver la pathologie chez les souris transgéniques. D'autres travaux ont aussi mis l'accent sur le rôle bénéfique d'un apport en donneurs de méthyles, avec un rôle protecteur de la supplémentation en bétaïne contre la perte de mémoire, ou aussi de folates et B12 contre l'atrophie de la substance grise et le déclin cognitif global (Chai et al., 2013; Douaud et al., 2013).

Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés pour décrire la toxicité de l'homocystéine dans la MA (Zhuo et al., 2011). Ainsi, il pourrait s'agir d'un effet du stress oxydant, du stress du réticulum endoplasmique (Cankurtaran et al., 2013; Kim et al., 2008; Tchantchou et al., 2008), de régulation épigénétique par action de désacétylation/déméthylation (Linnebank et al., ; Vadnal et al., 2012), de dommages excitotoxiques au niveau des récepteurs NMDA (Ho et al., 2001), d'élévation des peptides β-amyloïdes dans les neurones (Hasegawa et al., 2005), de l'augmentation de la phosphorylation des protéines Tau par inactivation de la protéine phosphatase (Zhang et al., 2008a) ou, plus certainement, d'une combinaison de plusieurs facteurs. De plus, l'augmentation de l'homocystéine associée à un polymorphisme MTHFR 677TT est un facteur de risque indépendant dans l'apparition de la maladie (Anello et al., 2004; Fernandez and Scheibe, 2005).

Par ailleurs, il est bien connu que les individus porteurs de l'isoformes ε4 de l'apolipoprotéine E, protéine jouant un rôle dans le transport du cholestérol et des phospholipides, présentent un risque accru de développer une MA. A ce titre, plusieurs études cliniques ont rapporté l'existence d'une corrélation entre les polymorphismes ApoE4 et MTHFR dans les cas de MA (Anello et al., 2004; Fernandez and Scheibe, 2005; Nishiyama et al., 2000). Des données plus récentes suggèrent aussi que la MA serait associée à des niveaux plus faibles de SAM dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) humain, et donc une capacité réduite de

méthylation cellulaire, d'autant qu'une analyse exploratoire a montré que les taux de SAM étaient également réduits chez des sujets porteurs de l'allèle ApoE4 (Linnebank et al.).

Par ailleurs, des études récentes tendent à impliquer une toxicité de l'Hcy par homocystéinylation de certaines protéines, pouvant secondairement conduire à une accumulation des peptides β-amyloïdes. Des études *in vitro* indiquent aussi que la N-homocystéinylation des protéines provoque leur agrégation à la façon du peptide β-amyloïde, allant même jusqu'à suggérer un changement des propriétés des protéines N-homocystéinylées pour acquérir un caractère amyloïdogène (Paoli et al., 2010; Stroylova et al., 2012; Stroylova et al., 2011). Khodadadi et al. (Khodadadi et al., 2012) ont montré que l'homocystéinylation des résidus lysine contribue à augmenter la neurotoxicité du peptide Aß et ceci par stabilisation des oligomères intermédiaires solubles. Un autre mécanisme pourrait aussi impliquer la diminution de l'activité de l'homocystéine thiolactonase (Suszynska et al., 2010). Enfin, Karima et al. (Karima et al., 2012) ont montré que la N-homocysteinylation *in vitro* de la protéine tau humaine (isoforme 4R/1N) inhibe sa fonction via une altération de la liaison spécifique tau-tubuline, empêchant ainsi la liaison de tau aux microtubules.

V. Mécanismes mis en jeu

V.1. Programme neurogénique

Un grand nombre de gènes agissent en synchronisation pour influencer le destin cellulaire au cours de la détermination des différents lignages. Ainsi, très tôt durant le développement, voire même avant la gastrulation, certains systèmes comme les facteurs de croissance Fgf, les protéines Wnt, et leurs récepteurs, permettent l'initialisation du destin neural de cellules souches, en agissant sur la division cellulaire (prolifération), le rattachement des cellules les unes aux autres (adhésion), le mouvement cellulaire (migration) et d'autres activités cellulaires (Farias et al., 2009). Ensuite, durant le processus de neurulation, l'identité de l'ectoderme est maintenue par sécrétion de Bmp (surtout Bmp4 et 7), et la transformation de cellules ectodermiques en tissu neural se fait spontanément suite à un blocage de ce signal Bmp.

V.1.1. Induction neurale et structuration de la moelle épinière

Les Bmp (*Bone morphogenetic proteins*) sont des protéines morphogènes impliquées dans l'induction neurale et la structuration de la moelle épinière en interagissant avec d'autres voies développementales (Shh, Wnt, Notch, Pax...). En effet, la première étape de l'induction neurale consiste en une répression du signal Bmp suite à la liaison de Bmp avec un de ses antagonistes (Noggin, Chordin..), l'empêchant ainsi de se lier à ses propres récepteurs (Krause et al., 2011; Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). Ensuite, l'intégration des signaux permettant la

régionalisation de la plaque neurale permet de définir des territoires spécifiques. Ces signaux sont activés selon des gradients opposés d'expression de deux morphogènes, les Bmp et les Shh (*Sonic Hedgehog*), dans l'axe dorso-ventral du tube neural. Shh est indispensable à la mise en place de la partie ventrale du tube neural, alors que la partie dorsale est dépendante d'un gradient de morphogène inverse, Bmp 4, 5 et 7 (Tozer et al., 2013) (Figure 17). Ainsi, le déterminisme de l'identité cellulaire est régulé par le signal Shh/Bmp et ceci, soit en coopération avec la voie Notch régulant les gènes proneuraux, soit en inhibant de façon temporelle des gènes impliqués dans la différenciation et la maintenance des cellules souches neurales, comme Pax6 (Liu and Niswander, 2005; Timmer et al., 2002).

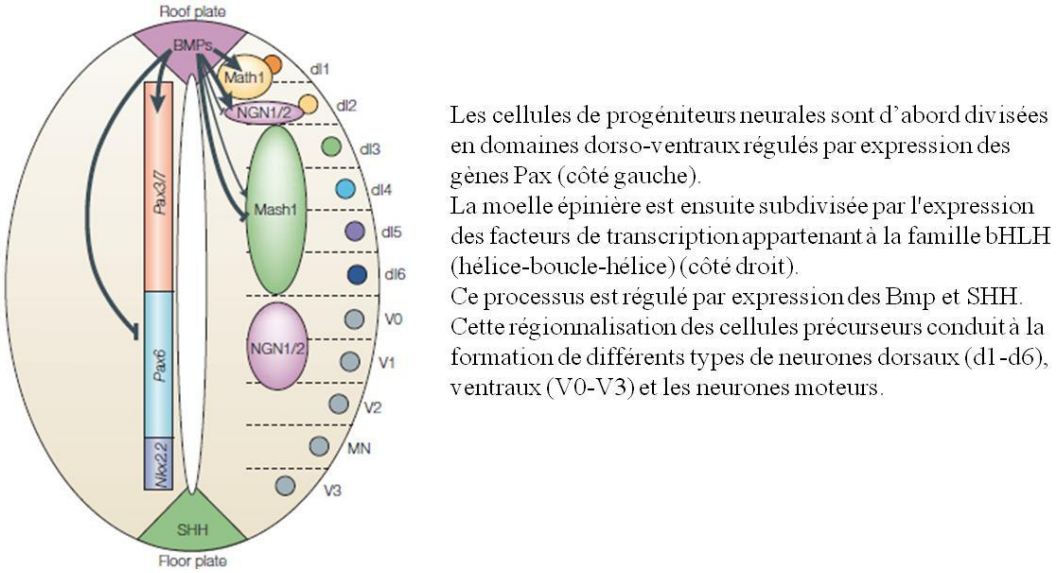


Figure 17: Structuration de la moelle épinière le long de son axe dorso-ventral (d'après (Liu and Niswander, 2005)).

V.1.2. Régulation de la prolifération cellulaire

La voie de signalisation Notch est progressivement apparue comme un élément majeur au cours du développement du SNC. Cette voie est connue pour contrôler la balance entre la prolifération et la différenciation des cellules souches et des progéniteurs neuronaux (Nagao et al., 2007). Il a été rapporté récemment que les folates exerceraient leur influence sur la prolifération cellulaire et la différenciation des cellules souches au moins en partie par l'activation de cette voie (Zhang et al., 2008b). Notch se lie à son ligand Delta, et le signal engendré permet de contrôler l'expression de facteurs de transcription intervenant dans le programme neurogénique (Hes1, Hes5). Hes5 agit en coopération avec les gènes appartenant à la famille Sox (*SRY-related HMG box*), en particulier avec Sox-2, pour contrôler la maintenance de la prolifération des cellules (Lugert et al., 2010). Hes1, à son tour, réprime l'expression des bHLH activateurs de l'expression des gènes pro-neuronaux, tels que Mash1, Math1 ou les neurogénines. Il y a alors maintien de la prolifération aux dépens de la différenciation.

Mash1/Ascl1 intervient dans l'induction temporelle de la différenciation (Sugimori et al., 2007). Ainsi, une notion importante dans le contexte du développement est l'expression de ce facteur de transcription en fonction du stade de développement et du domaine tissulaire. Il a été montré que l'inactivation de Hes1 et l'expression inappropriée de Mash1 au cours de la neurulation (figure 18), entraîne l'expression précoce de marqueurs de différenciation neuronale et des anomalies de fermeture du tube neural au niveau cranial (Copp et al., 2003). Une autre étude a rapporté un lien entre les perturbations d'expression de Hes1 et Mash1, en relation avec des défauts de développement du tube neural, et des mécanismes épigénétiques folate-dépendants (Ichi et al., 2010). La répression exercée par ces facteurs bHLH pro-neuraux exercent à leur tour une répression des gènes appartenant à la famille *pax (pax6)* dont l'expression participe au maintien de l'auto-renouvèlement des progéniteurs neuronaux (Sansom et al., 2009; Sugimori et al., 2007). De plus, Pax6 inhibe l'expression d'autres membres de la famille Pax impliqués dans la différenciation et l'identité neuronale, comme Pax2 (Matsunaga et al., 2000). Or, Pax2 est un facteur de transcription tissu-spécifique important pour la formation du tube neural (Matsunaga et al., 2000) et son expression prématurée et inappropriée pourrait participer aux anomalies de formation du tube neural, souvent en lien avec la carence en donneurs de méthyles.

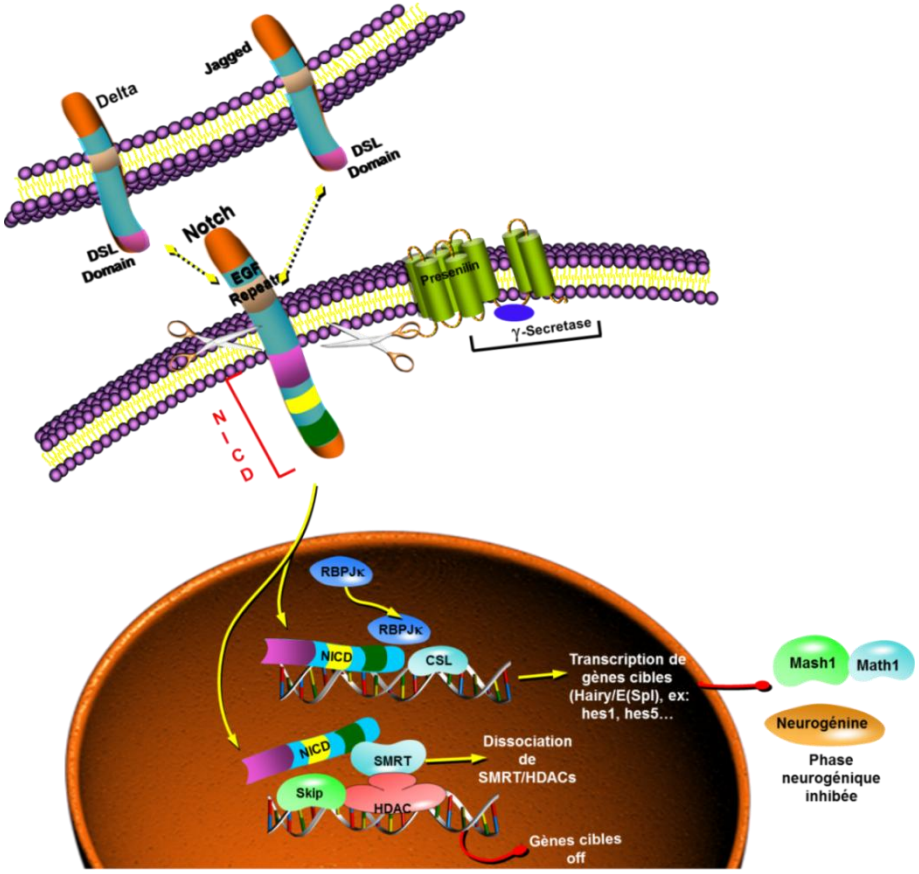


Figure 18 : Voie de signalisation Notch. (Disponible sur www.sabiosciences.com, modifiée)

Enfin, différentes études ont montré une interaction entre la voie Notch et la voie Stat3 dans l'induction de la différenciation neuronale. Ainsi, l'activation de Stat3 par phosphorylation (Tyr705/Ser727) est Notch-dépendante (Gouti and Gavalas, 2008). Or, Stat3 est un facteur de transcription jouant un rôle dans la survie cellulaire, le maintien de l'état indifférencié des cellules, et la neuroprotection (Zhao et al., 2011).

V.1.3. Différenciation et maturation cellulaires

Lors de la différenciation, les marqueurs spécifiques des cellules souches disparaissent progressivement. Parmi ceux-ci, figurent des gènes régulant le cycle cellulaire (Notch, Myc), les marqueurs d'autorenouvèlement (Neurog2 ou Ngn2), les gènes régulant les communications cellules-cellules (Dhh, Jag1...) ou les molécules d'adhésion cellulaire (N-CAM).

Bien que la différenciation soit régulée en réponse aux différents signaux transmis par une multitude de voies de signalisation, un autre élément important intervenant dans la régulation de la différenciation est le temps. En effet, un même foyer d'une zone définie pourrait engendrer des types cellulaires différents selon les moments du développement. Ainsi, les trois types cellulaires majeurs du SNC dérivent d'un seul précurseur engendrant d'abord les neurones, puis les astrocytes et enfin les oligodendrocytes (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Ceci est contrôlé par des gènes et facteurs de transcription spécifiquement exprimés par chaque type cellulaire, ou aussi suite à la modification de certains facteurs par méthylation, acétylation ou phosphorylation (Chittka et al., 2012; Li et al., 2011; Rodnight et al., 1997; Yao et al., 2013). Il a été montré que certains gènes possèdent des séquences NRSE (*neuronal restrictive silencer element*) qui se lient soit au facteur transcriptionnel REST (*repressor element transcription factor*) soit au NRSF (*neuron restrictive silencer factor).* Dans les neurones, le complexe REST/NRSF, séquestré dans le cytoplasme, est incapable de se lier aux séquences NRSE, exprimant ainsi les gènes cibles neuronales (Abrajano et al., 2009; Qureshi et al., 2010; Xie et al., 2012). REST et ses cofacteurs (MeCP2, LSD1, G9a) permettent de contrôler les différenciation, morphologie et maturation neuronales(Abrajano et al., 2009; Fuentes et al., 2012; Rossbach, 2011) (figure 19).

D'autres facteurs de transcription, essentiellement GFAP, mais aussi Stat3 et TGF-β (*transforming growth factor*) contrôlent l'activation astrocytaire, alors que Olig2 est le facteur transcriptionnel essentiel à la formation des oligodendrocytes (Li et al., 2011; Maire et al., 2009; Romao et al., 2008; Urayama et al., 2013).

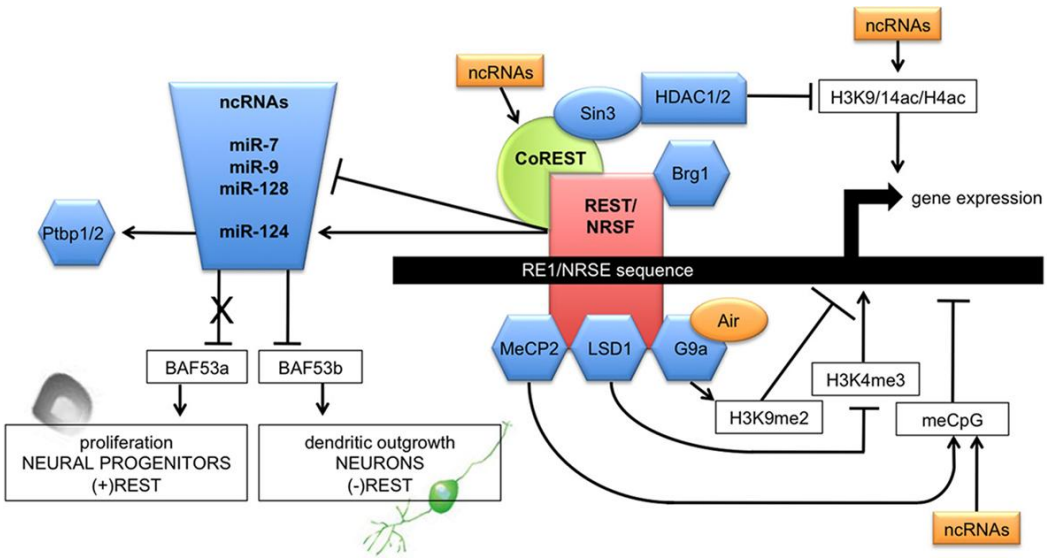


Figure 19 : Schéma illustrant les principales composantes de la régulation de la différenciation par le complexe REST/NRSF dans les réseaux de neurones (D'après (Rossbach, 2011)).
Ce schéma montre l'interaction entre les éléments de régulation de la différenciation neuronale et différents mécanismes épigénétiques. Ceci implique surtout un rôle de la méthylation, l'acétylation et les microARN dans la différenciation neuronale.

V.2. Régulations épigénétiques

L'expression des gènes du programme neurogénique est régulée par de nombreux processus épigénétiques. Cette régulation peut se faire au niveau de l'ADN (au niveau des îlots CpG de promoteurs) ou par modification des histones. Les réactions de méthylation ou d'acétylation au niveau des histones modifient l'accessibilité à l'ADN ; quant aux méthylations et acétylations de l'ADN, celles-ci vont inhiber la fixation de facteurs de transcription, empêchant la transcription.

Durant l'induction neurale et la mise en place des lignages cellulaires, plusieurs gènes de pluripotence sont méthylés et ainsi inhibés (Mohn et al., 2008). Ce mécanisme fait intervenir des protéines contenant un domaine de liaison de méthyle (MBD, *methyl-CpG-binding domain*) ou la MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein 2),* toutes les deux exprimées dans le cerveau et jouant un rôle dans le neurodéveloppement et la régulation de la plasticité (Fan and Hutnick, 2005). Parmi les facteurs jouant aussi un rôle dans la régulation épigénétique sont ceux appartenant à la famille des HDAC (Histones désacétylases). Les HDAC appartenant à la classe II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 et 10) sont impliquées dans la différenciation des cellules souches neurales (Ajamian et al., 2003). Plus particulièrement, HDAC7 inhibe la différenciation neuronale et forme un co-represseur des facteurs de transcription bHLH (*basic helix-loop-helix*) impliqués dans le programme neurogénique, tels que Hes1 et NeuroD (Siebzehnrubl et al., 2007), alors que HDAC 4 et 5 sont quant à elles impliquées dans la maturation neuronale et la neuroprotection (Majdzadeh et al., 2008).

La régulation épigénétique peut également se faire post-transcriptionnellement par l'action des microARN (miR), et nombre d'entre eux ont été décrits comme régulateurs épigénétiques du déroulement chronologique des différentes étapes du programme neurogénique (Krichevsky et al., 2006; Maller Schulman et al., 2008).

V.2.1. Les microARN : régulateurs épigénétiques post-transcriptionnels

Les ARN non codants constituent un moyen de régulation épigénétique de l'expression génique et de la détermination du devenir cellulaire. Parmi ceux-ci, les miRs participent à la régulation de la neurogenèse. Les miRs sont des ARN simple-brin de petite taille (22 à 24 nucléotides). Leur mécanisme d'action est basé sur la neutralisation des ARNm par complémentarité de séquence généralement avec la région 3' UTR de l'ARNm transcrit et la séquence « seed » du miR (présente à environ 2 à 8 pb de son extrémité 5'). Une telle exigence de petite complémentarité signifie qu'un seul miR peut inhiber des dizaines, voire des centaines de gènes cibles en aval (Bartel, 2009). Ils interviendraient dans la régulation d'au moins 1/3 du génome, ce qui les implique dans la régulation épigénétique de l'ensemble des grands processus biologiques, parmi lesquels prolifération, différenciation, apoptose, métabolisme… Les étapes de traitement final de la biosynthèse des miRs sont médiées par Dicer et Drosha (figure 20), les membres de la famille RNases III, qui clivent les précurseurs de miRs en des ARN matures qui seront ensuite chargés dans des complexes d'inhibition (Krol et al., 2010). Ils répriment ainsi la traduction et/ou favorise la dégradation des ARNm par déadénylation suite au recrutement du complexe d'inhibition RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Guo et al., 2010).

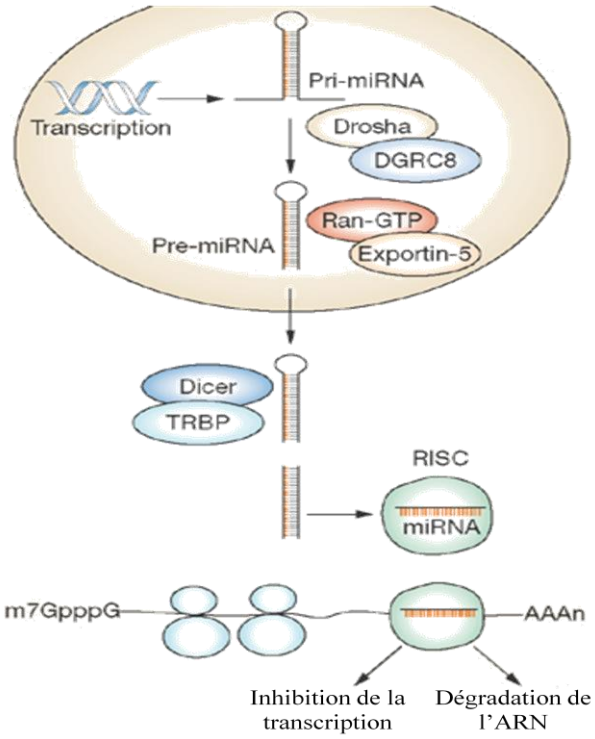


Figure 20 : Biosynthèse des microARN (d'après (Tili et al., 2008)).

V.2.2. Implications des miRs dans le développement du système nerveux central

Les miRs interviennent dans le bon déroulement du développement du SNC grâce à une expression spatio-temporelle finement régulée (Cochella and Hobert, 2012). L'expression de miRs spécifiques du cerveau est augmentée au cours du développement cérébral. Leur expression peut ensuite disparaître ou persister (cas de miR-124, indispensable au maintien de l'identité neurale), tandis que d'autres miRs ne sont exprimés que dans le cerveau adulte (miR-137) (Olde Loohuis et al., 2012).

MiR-9 et Let-7 sont impliqués dans les phases précoces de l'embryogenèse, régulant particulièrement la régionalisation et la spécialisation cellulaire (Krichevsky et al., 2006). Ainsi, miR-9 exprimé dès le stade neuroblastique, régule la prolifération des cellules souches embryonnaires et est indispensable à la mise en place et la maturation de certaines régions cérébrales (Cochella and Hobert, 2012). Par ailleurs, une surexpression de Let-7 est impliquée dans la répression de l'expression de *Mlin41/Trim71*, conduisant à des anomalies de fermeture du tube neural antérieur, des exencéphalies et une augmentation de la létalité embryonnaire (Maller Schulman et al., 2008).

MiR-124 est le microARN le plus abondant du système nerveux central embryonnaire et adulte (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2005). Il intervient au cours de la différenciation, sa présence étant nécessaire à l'acquisition d'un phénotype neuronal par les progéniteurs lors de l'induction de la différenciation. Son expression prématurée pourrait perturber la neurogenèse par dérégulation des gènes de la famille *sox* et de la voie *stat3* (Krichevsky et al., 2006).

D'autres miRs interviennent aussi dans la différenciation via la régulation du programme neurogénique. Ainsi, miR-23 favorise la différenciation cellulaire, tout comme miR-34 en inhibant la prolifération par répression des voies de signalisation Wnt/Beta-cathénine ainsi que la voie Notch et la signalisation de la protéine p53 via SIRT-1 (Aranha et al., 2011; de Antonellis et al., 2011; Jain et al., 2012; Kim et al., 2011). De plus, l'expression inappropriée de miR-34a aboutit à une diminution du ligand DLL1 du récepteur Notch et à une activation prématurée de la différenciation neuronale impliquée dans des défauts de fermeture du tube neural postérieur (Ichi et al., 2010). Enfin, certains miRs interviennent dans une phase de maturation plus tardive et dans la plasticité synaptique impliquée dans les phénomènes de mémorisation, tel miR-137 qui régule le développement dendritique et la synaptogenèse des cellules neuronales différenciées (Olde Loohuis et al., 2012; Willemsen et al., 2011).

V.2.3. Rôle des miRs dans les pathologies cérébrales

Outre l'implication des miRs dans le développement normal et pathologique, il est maintenant documenté que leurs dérégulations peuvent contribuer à la survenue de certains troubles neurologiques et de nombreuses pathologies cérébrales. Ainsi, dans un cerveau mature,

la surexpression anormale de certains miRs peut influencer les capacités cognitives d'un individu ; miR-34 est connu pour avoir un effet négatif sur l'apprentissage et la mémorisation dépendant de l'hippocampe par son action de répression sur SIRT-1, une importante désacétylase (Jain et al., 2012). D'autres microARN interviennent aussi dans la mémorisation à court et long terme par régulation de la plasticité synaptique, surtout dans les neurones hippocampiques (Tatro et al., 2013; Wang et al., 2013b; Wang et al., 2012a).

La survenue de certains troubles neurologiques ont été liés à des dérégulations des miRs, tels certains comportements bipolaires ou suicidaires, la schizophrénie, la dépression... (Banigan et al., 2013; Beveridge and Cairns, 2012; Dwivedi, 2011; Serafini et al., 2012).

Enfin, il a été récemment proposé que les microARN sont des régulateurs importants dans l'étude du vieillissement cérébral, notamment dans le cas de la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Junn and Mouradian, 2012) (Tableau 4).

Maladie	microARN diminué	microARN augmenté	Cible	Références
Maladie d'alzheimer	miR-29a/29b-1, miR-9	miR-107, miR-103, miR-23b	BACE1	Wang et al. 2011, Shioya et al. 2010, Nunez-Iglesias 2010, Nelson & Wang 2010, Hebert et al. 2008, Wang et al. 2008b
Maladie de Parkinson	miR-133b, miR-34b/34c		Pitx3	Minones-Moyano et al. 2011, Kim et al. 2007
Maladie de Huntington	miR-9/9*		REST/CoREST	Packer et al. 2008, Johnson et al. 2008
	miR-132	miR-29a, miR-330	p250GAP	
ALS	miR-206		HDAC4	Williams et al. 2009
Prion	miR-338-3p, miR-337-3p	miR-342-3p, miR-494, , miR-320, let-7b/7d	N/A	Montag et al. 2009, Saba et al. 2008

Tableau 4 : MicroARN exprimés de manière différentielle dans les maladies neurodégénératives (Adapté d'après (Junn and Mouradian, 2012)).

Au vu de la très grande diversité des gènes régulés par un microARN, la dérégulation d'un miR pourra être liée à plusieurs pathologies. A titre exemple, miR-124 étant le microARN le plus présent dans le cerveau, il a été associé à des problèmes dévéloppementaux, des troubles neurologiques, au déclin cognitif et aux maladies liées aux vieillissement (Fang et al., 2012; Gong et al., 2013; Kerek et al., 2013; Yoo et al., 2009; Zhao et al., 2013).

V.2.4. Interaction miRs / cycle des monocarbones

Les miRs peuvent provoquer des pathologies par action directe sur le cycle des folates et de la méthionine. Une augmentation de miR-24 aboutit à la répression de l'enzyme DHFR, nécessaire à la formation du THF. De même une augmentation de miR-34 conduit à la répression de l'enzyme MTHFR nécessaire à la formation du 5-MeTHF. On se retrouve alors dans une situation comparable à la carence en donneurs de méthyles, avec un blocage du cycle des folates et du cycle de la méthionine, aboutissant à un défaut de méthylation par diminution de la méthionine ainsi qu'une inhibition des ADN méthyltransférases (Dnmt) secondairement à l'augmentation de l'homocystéine (Shookhoff and Gallicano, 2010) (Figure 21).

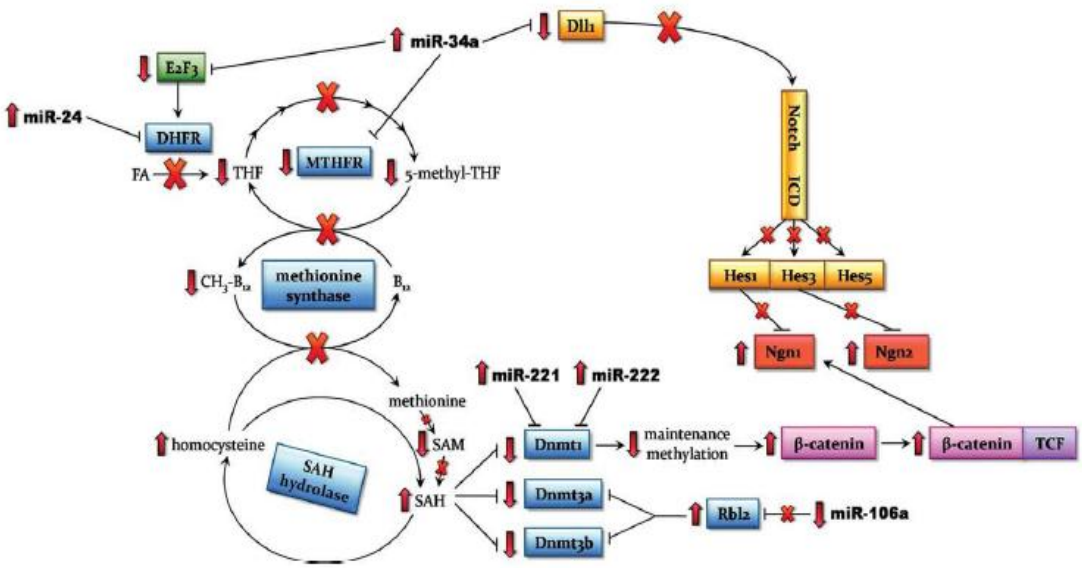


Figure 21 : Relation microARN, dérégulation du cycle des monocarbones et formation du système nerveux central (D'après (Shookhoff and Gallicano, 2010)).
Modèle proposé de survenue des défauts du tube neural en lien avec le métabolisme des monocarbones, méthylation, neurogenèse et dérégulation des microARN.

De plus, la régulation appropriée de la fonction neurologique nécessite un contrôle du régulateur épigénétique MeCP2 (*methyl CpG-binding protein 2*). Or, l'expression de miR-483-5P permet de restaurer un phénotype normal des extensions dendritiques des neurones surexprimant MeCP2 humaine (Han et al., 2013). L'expression des protéines de liaison au CpG méthylé (MeCP2, MBD1) réprime miR-184 et miR-137 qui à leur tour jouent sur l'expression des facteurs FgF-2 et Sox2 respectivement, perturbant la neurogenèse (Liu et al., 2010; Rash et al., 2011; Szulwach et al., 2010). Or, l'expression de ces deux protéines est fortement dépendante de la régulation du cycle des monocarbones, la SAM étant le donneur universel de méthyles, montrant ainsi une interaction entre méthylation, microARN et neurogenèse (Esfandiari et al., 2003; Ichi et al., 2010; Liang et al., 2012; Stone et al., 2011)

V.3. STAT3

Le gène *stat3* (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) est localisé sur le chromosome 17 et code une protéine de 86 KDa. Les protéines Stat font parties d'une famille de facteurs de transcription de 750 à 850 acides aminés dont sept membres ont été identifiés à l'heure actuelle : Stat 1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6. Stat3 possède trois domaines fonctionnels cruciaux à son fonctionnement. Le premier est le domaine *Src homology 2* (SH2) capable de lier les tyrosines phosphorylées et responsable ainsi de la dimérisation de Stat3 suite à sa phosphorylation sur les résidus Tyr 705, et permettant alors sa translocation dans le noyau. Le domaine de liaison à l'ADN permet l'interaction de Stat3 par ses arginines 414-417 avec les séquences consensus d'ADN de gènes cibles nucléaires. Le dernier domaine se situe au niveau de l'extrémité C-terminale, et il est nécessaire à l'activation transcriptionnelle de Stat3 (Reich, 2009) (**figure 22**).

Suite à sa fixation sur le promoteur de ses gènes cibles, Stat3 régule la prolifération cellulaire, l'entrée en phase S du cycle par activation de la transcription de la cycline D1, c-myc et de c-fos (Bromberg, 2002), la survie cellulaire (Bcl-xl et Bcl2), l'angiogenèse, la mobilité cellulaire et l'embryogenèse. Les différentes fonctions biologiques de Stat3 sont en partie issues du fait de son activation par un grand nombre de cytokines, facteurs de croissance, et oncogènes.

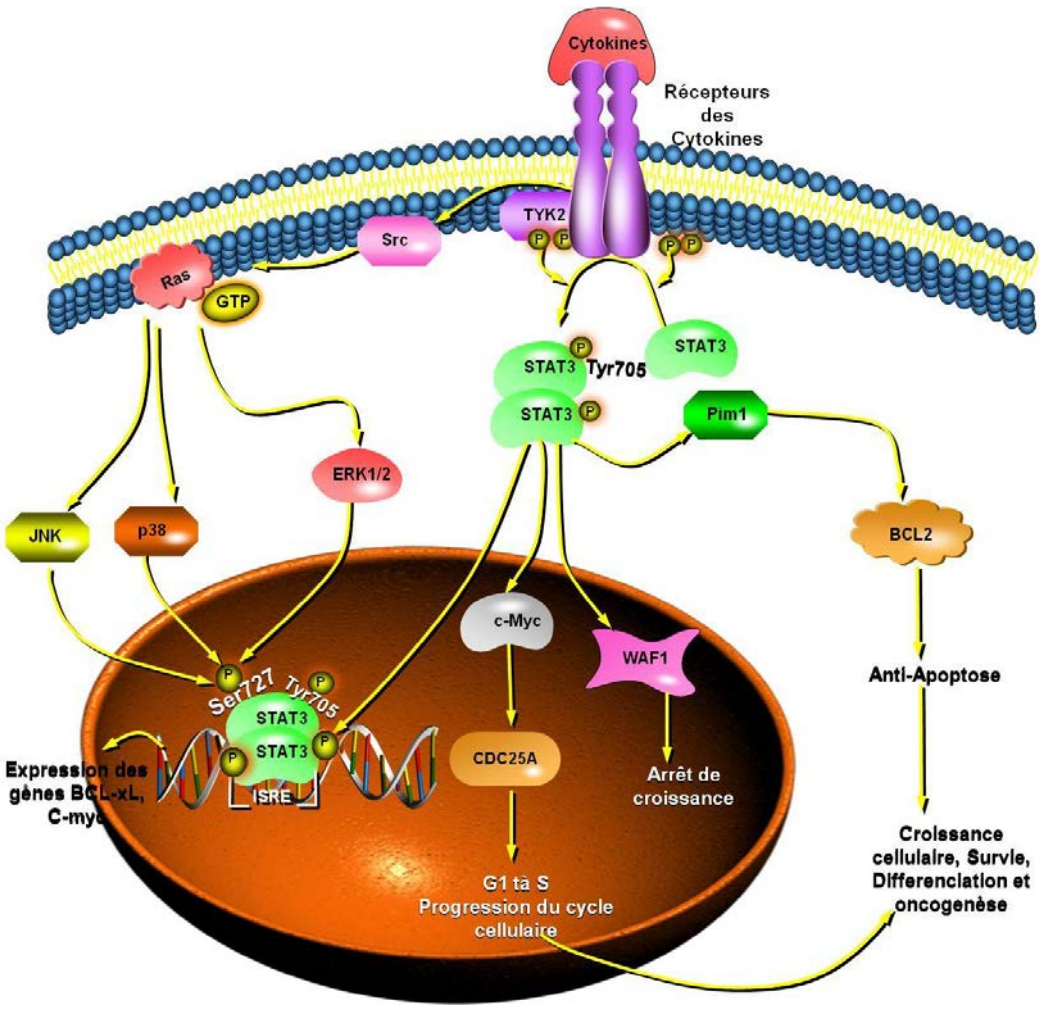


Figure 22 : Voie de signalisation Stat3. (Disponible sur www.sabiosciences.com, modifiée)

V.3.1. Phosphorylation de Stat3 et activité transcriptionnelle

L'activation classique de Stat3 s'effectue suite à la liaison des cytokines aux récepteurs cellulaires de surface, notamment les cytokines de la famille de l'Interleukine 6 (IL-6), sur son récepteur membranaire gp130, et la stimulation de *Janus Tyrosine Kinases* (JAK). Ainsi, on parle souvent de la voie « JAK-STAT » (Mihara et al., 2012; Murray, 2007). Les kinases JAK phosphorylent la protéine gp130 pour permettre le recrutement de Stat3 au niveau du récepteur. Stat3 est alors phosphorylé à son tour par les kinases JAK au niveau de la tyrosine 705, ce qui induit la dimérisation de Stat3 et sa translocation dans le noyau. Une seconde phosphorylation par les Pkcδ sur les résidus Ser727 permettra la régulation de l'activité transcriptionnelle (Jain et al., 1999).

D'autres cytokines et facteurs de croissance sont aussi impliqués, et leur liaison sur leur récepteurs respectifs permet la phosphorylation de Stat3 directement grâce à leur propre activité tyrosine kinase ou de manière indirecte par l'intermédiaire de kinases cytoplasmiques comme la tyrosine kinase Src entraînant la phosphorylation de Stat3 sur le résidu tyrosine 705 (Turkson et

al., 1998; Yu et al., 2009a). Le recrutement des activateurs transcriptionnel comme Src va à son tour entraîner l'engagement des acétyltransférases CBP ou p300, ainsi que les complexes de remodelage de la chromatine tel que les complexes BRG/BRM, ce qui a pour effet de stabiliser le dimère et la liaison de Stat3 à l'ADN. Diverses voies de signalisation interviendront à ce stade et vont permettre la phosphorylation de Stat3 sur le résidu sérine 727 et ainsi l'augmentation de l'activité transcriptionnelle. Cette phosphorylation peut être induite par les kinases p38 ou JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) ou suite à l'activation de la voie Erk1/2 (Decker and Kovarik, 2000; Lin et al., 2009). Dans le cerveau, la kinase cdk5 pourrait aussi intervenir dans la phosphorylation de la Ser727, alors que la proteine mTor semble être impliquée dans la phosphorylation de Stat3 dans les neuroblastomes suite à une activation au CNTF (Yokogami et al., 2000).

Récemment, des études ont montré que Stat3 non-phosphorylé pourrait aussi affecter l'expression génique dans le noyau ; un mécanisme proposé implique sa liaison au facteur nucléaire (NF-κB), pouvant entraîner son transport nucléaire (Timofeeva et al., 2012; Vogt et al., 2011; Wakahara et al., 2012).

V.3.2. Régulation microARN-dépendante de Stat3

Un sujet émergent est la régulation de *stat3* par l'expression des microARN. Différents micro-ARN ont été impliqués dans la régulation de *stat3* dans le contexte de divers cancers (Bockhorn et al., 2013; Kohanbash and Okada, 2012; Yang et al., 2013). De plus, miR-124-a et miR-106a interviendraient dans la neurogenèse ou dans la survenue de certaines neuropathologies via des modifications de l'expression de *stat3* (Krichevsky et al., 2006; Zhang et al., 2013). Par ailleurs, alors que miR-124 intervient dans la régulation de la neurogenèse, son expression réduit aussi l'expression de *stat3* dans les cellules souches mésenchymateuses, cellules T du système immunitaire (Cai et al., 2012; Wei et al., 2013).

V.3.3. Rôle physiologique de Stat3

V.3.3.a. Implication de Stat3 dans l'embryogenèse

L'inactivation de Stat3 par invalidation de son expression dans un modèle murin induit la mort embryonnaire avant la gastrulation, avec une létalité de 100% chez les souris hétérozygotes pour l'invalidation (Takeda et al., 1997). Les embryons se développent jusqu'à l'âge embryonnaire de 6 jours (E6), avec une dégénérescence rapide entre les stades embryonnaires E6,5 et E7,5.

La sécrétion du LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), activateur de Stat3, au cours du premier tiers de la gestation induit la prolifération et l'invasion du tissu utérin maternel par des cellules de l'embryon appelées trophoblastes (Poehlmann et al., 2005; Weber et al., 2012). La migration des

trophoblastes est indispensable à la formation du placenta nécessaire pour les échanges entre l'embryon et le tissu maternel. Des études récentes ont aussi associé la régulation négative de la voie Stat3 avec le risque accru d'avortement (Mulla et al., 2010; Wang et al., 2012b). Stat3 est ainsi essentiel pour l'implantatoin et le développement précoce des embryons, et son expression continue à augmenter jusqu'après la naissance (Deverman and Patterson, 2009).

V.3.3.b. Stat3 dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire

Stat3 est un régulateur de la prolifération cellulaire et de l'autorenouvèlement des cellules souches et progénitrices. Ainsi, ce facteur de transcription régule la voie Oct4/Nanog pour maintenir les cellules à l'état pluripotent (Do et al., 2013; Hawkins et al., 2012). De plus, le remodelage de la matrice cellulaire maintient les cellules souches embryonnaires en état d'autorenouvèlement par activation de Stat3 (Przybyla et al., 2013). Ceci pourra aussi faire intervenir des mécanismes de régulation épigénétique, sachant que l'inhibition de Stat3 conduit à l'augmentation de l'expression des histones désacétylases (HDACs) et en même temps facilite la déméthylation de marqueurs de pluripotence (*Oct4, Nanog*) mais aussi la méthylation *de novo* par augmentation ds Dnmt et MeCP2, jouant un rôle clé dans la reprogrammation des cellules souches embryonnaires (Tang et al., 2012).

Stat3 régule différentes phases du cycle cellulaire selon le gène cible concerné. Ainsi, quand Stat3 se fixe sur les promoteurs de c-myc et de c-fos, il permet le passage des cellules quiescentes vers la phase G1 du cycle cellulaire (Kiuchi et al., 1999). Le passage de la phase G1 en phase S est également régulé par activation Stat3-dépendante des gènes de la cycline D et la cycline E/Cdk2 (Barre et al., 2005; Leslie et al., 2006). Par ailleurs, ce facteur de transcription provoque l'arrêt du cycle cellulaire par liaison sur le promoteur du gène p21. Stat3 régule ainsi la voie p21/p53 et l'arrêt du cycle cellulaire par blocage du passage G2/M (Bienvenu et al., 2005; Hawthorne et al., 2009; Huang et al., 2012).

V.3.3.c. Implication de Stat3 dans l'apoptose et la survie cellulaire

La voie Stat3 régule la survie cellulaire en activant la transcription des gènes anti-apoptotiques tel Bcl-xL et Mcl1, inhibant alors l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax. Elle agit aussi en augmentant l'expression de la Survivine, membre de la famille des IAP (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) et qui inhibe l'activation des caspases (Catlett-Falcone et al., 1999; Gritsko et al., 2006). Stat3 active Akt (Park et al., 2005), et Bcl-2 (Choi et al., 2009), protéines également impliquées dans la survie cellulaire, et ceci *via* la phosphorylation de Src et Erk1/Erk2 respectivement. Enfin, comme pour la régulation du cycle cellulaire, l'implication de la voie Stat3 dans la régulation de l'apoptose peut passer par des mécanismes de régulation épigénétique, impliquant notamment les HDACs (Jung et al., 2013).

V.3.3.d. Implication de Stat3 dans la neuroprotection et le vieillissement cérébral

Le facteur de transcription Stat3 est connu pour jouer un rôle dans la prolifération, la survie, la croissance et la différenciation des cellules neuronales (Cheng et al., 2011; Murase et al., 2012; Yoon et al., 2012). De plus, il régule la survie et la régénération neuronale suite aux lésions ischémiques et traumatiques du cerveau en augmentant l'expression des gènes cibles impliqués dans la neuroprotection, tels ceux appartenant à la famille des Bcl (Bcl-xL et Bcl-2), et ceux qui régulent la neurorégénération (GAP-43) et le neurodéveloppement (GFAP) (Dziennis and Alkayed, 2008). L'inhibition de Stat3 a aussi été associée à un retard du développement de la myéline et de la maturation des oligodendrocytes via l'activation de la voie du TGF-β. De plus, Stat3 est impliqué dans le vieillissement cérébral, et des résultats ont montré que l'inactivation ou la surexpression de la voie de signalisation JAK/STAT3 joue un rôle essentiel dans les déficit cognitifs et la perte de mémoire observée dans des modèles animaux de vieillissement cérébral, lui valant d'être proposé comme marqueur dans la maladie d'Alzheimer (Chiba et al., 2009; Park et al., 2013; Wan et al., 2010).

Objectifs

Un des thèmes majeurs du laboratoire est l'étude des facteurs nutritionnels influençant le métabolisme des monocarbones sur le développement cérébral et la survenue de pathologies neurologiques. Les travaux réalisés montrent que les altérations du métabolisme des monocarbones associées à une carence en donneurs de méthyles et impliquant l'homocystéine, répriment la neurogenèse et induisent des troubles de la différenciation cellulaire. Les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le déficit en folates et vitamine B12 et/ou l'homocystéine peut affecter le cerveau et sa plasticité sont encore peu connus.

De nombreuses études ont permis de documenter l'existence de liens entre une carence maternelle en donneurs de méthyles et certaines pathologies développementales. Depuis, une supplémentation systématique en folates pendant le premier trimestre de grossesse a été mise en place et contribue significativement à la diminution de la prévalence des troubles associés, en particulier de certaines malformations congénitales. Une carence en folates conduit à une perturbation du cycle de monocarbones et, de ce fait, à des défauts de synthèse et de méthylation de l'ADN, ce qui pourra avoir des répercussions sur l'expression d'un grand nombre de gènes.

Afin d'identifier des gènes candidats dont l'expression altérée est susceptible de contribuer à des anomalies du développement cérébral, nous avons choisi d'analyser les conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur un panel de gènes impliqués dans le développement neuronal. Pour ce faire, au vu du nombre important de voies moléculaires susceptibles d'interagir sur le développement cérébral, nous avons effectué un « screening » par qPCR en temps réel selon une approche « microarray » permettant l'analyse de 84 gènes d'intérêts (*Rat Neurogenesis and Neural Stem Cell PCR Array, RT² Profiler™ PCR Array,* SABiosciences, Qiagen SA, Courtaboeuf, France). Notre étude a porté sur deux modèles complémentaires, d'une part *in vivo* sur le cerveau de la progéniture des rates exposées à une carence nutritionnelle en donneurs de méthyles depuis la période péri-conceptionnelle (Blaise et al., 2007), et d'autre part *in vitro* sur des progéniteurs neuronaux issus de l'hippocampe de rat (lignée H19-7/IGIR) et carencés en folates (Akchiche et al., 2012).

Dans ces modèles expérimentaux, où la capacité de méthylation cellulaire est affectée, il nous a semblé opportun de prendre en considération les mécanismes de régulation épigénétique/épigénomique. A ce titre, les micro-ARNs occupent une place de premier plan dans ces processus de régulation, et leur implication dans l'orchestration des différentes étapes du

développement et de la maturation fonctionnelle du système nerveux central est aujourd'hui bien établie.

Au niveau cellulaire, les conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles impliquent des altérations de la neurogenèse, de la différenciation cellulaire, du transport vésiculaire et de la plasticité neuronale (Akchiche et al., 2012), processus dans lesquels interviennent les différentes composantes du cytosquelette qui vont ainsi coopérer de façon dynamique pour influencer le développement du tissu nerveux cérébral.

Enfin, une carence en donneurs de méthyles tels que folates et vitamine B12 conduit à une élévation de la concentration d'homocystéine. La formation subséquente d'homocystéine-thiolactone peut engendrer, par homocystéinylation, des modifications post-traductionnelles irréversibles affectant certaines protéines et qui pourraient être à l'origine d'effets néfastes durables.

Dans ce contexte, nos principaux objectifs étaient de:

- Caractériser les effets d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement embryonnaire du rat ;

- Identifier les voies de signalisation impliquées dans le développement cérébral et altérées par la carence en donneurs de méthyles. Evaluer la participation d'une régulation par les miRs ;

- Etudier l'impact d'une carence en folates et de l'élévation de l'Hcy associée sur les protéines du cytosquelette des progéniteurs neuronaux ;

- Evaluer et caractériser l'homocystéinylation de protéines neuronales, notamment les composants du cytosquelette, et son implication dans les altérations fonctionnelles.

Résultats

Première partie : Etude des effets d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement embryonnaire cérébral via altération du programme neurogénique

I. Publication # 1: Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124

***Running title*:** Stat3 and miR-124 in methyl donor deficiency

Cell Death & Disease (2013)

Racha Kerek[1,2#], Andréa Goeffroy[1,2#], Anaïs Bison[1,2], Nicolas Martin[1,2], Nassila Akchiche[1,2], Grégory Pourié[1,2], Déborah Helle[1,2], Jean-Louis Guéant[1,2,3], Carine Bossenmeyer-Pourié[1,2*] and Jean-Luc Daval[1,2*]

[1]Inserm U954, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54500, France; [2]Université de Lorraine, Faculté de Médecine de Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54500, France; [3]IRCCS, Oasi Maria S.S., Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina (EN), Italy.

[#]and*: Authors with equal contributions

Corresponding author: Jean-Luc DAVAL, PhD, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Phone: (33) 3 83 68 32 82 ; Fax : (33) 3 83 68 32 79 ; e-mail: jean-luc.daval@inserm.fr

I.1. Objectifs de l'étude

L'hypothèse de « programmation fœtale » de Barker suggère qu'un retard de croissance intra-utérin associé à un petit poids à la naissance pourra avoir de graves répercussions sur la santé de l'individu, avec prédiction de la survenue de certaines pathologies au cours de la vie. Parmi les facteurs nutritionnels susceptibles d'influencer le développement de l'embryon, les vitamines du groupe B telles que les folates (B9) ou la vitamine B12 sont nécessaires au développement cérébral, et leur déficience, relativement fréquente chez les femmes enceintes, a été associée à des retards de développement, tant chez l'homme (Molloy et al., 2008) que chez l'animal (Molina et al., 2008).

Les vitamines B9 et B12 participent à la régulation du métabolisme des monocarbones, lequel est essentiel pour la biosynthèse et la réparation de l'ADN et les réactions de méthylation et, par conséquent, joue un rôle clé dans les processus de régulation épigénétique et épigénomique. Ainsi, une carence en donneurs de méthyles comme les folates et la B12 pourra influencer l'expression de nombreux gènes. Dans les études expérimentales, cette carence a été associée à un déséquilibre de la balance prolifération/différenciation neuronale, avec une réduction de l'arborisation neuritique, et à l'apoptose (Akchiche et al., 2012; Battaglia-Hsu et al., 2009; Craciunescu et al., 2004). Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent les effets de la carence maternelle sur le développement embryonnaire, et plus particulièrement le développement cérébral, sont encore peu documentés. Ainsi, en raison de son importance dans le neurodéveloppement, en termes de prolifération, survie, différenciation et croissance (Cheng et al., 2011; Dziennis and Alkayed, 2008; Murase et al., 2012; Yoon et al., 2012), nous avons choisi d'analyser la voie de signalisation impliquant Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), d'autant que dans nos expériences préliminaires de « microarray » l'expression de ce facteur de transcription était significativement altérée en situation de carence vitaminique, à la fois *in vivo* et *in vitro*.

I.2. Manuscrit

OPEN

Citation: Cell Death and Disease (2013) 4, e755; doi:10.1038/cddis.2013.278
© 2013 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/13
www.nature.com/cddis

Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124

R Kerek[1,2,4], A Geoffroy[1,2,4], A Bison[1,2], N Martin[1,2], N Akchiche[1,2], G Pourié[1,2], D Helle[1,2], J-L Guéant[1,2,3], C Bossenmeyer-Pourié[1,2,5] and J-L Daval*[,1,2,5]

The methyl donors folate (vitamin B9) and vitamin B12 are centrepieces of the one-carbon metabolism that has a key role in transmethylation reactions, and thus in epigenetic and epigenomic regulations. Low dietary intakes of folate and vitamin B12 are frequent, especially in pregnant women and in the elderly, and deficiency constitutes a risk factor for various diseases, including neurological and developmental disorders. In this respect, both vitamins are essential for normal brain development, and have a role in neuroplasticity and in the maintenance of neuronal integrity. The consequences of a methyl donor deficiency (MDD) were studied both *in vivo* in rats exposed *in utero*, and *in vitro* in hippocampal progenitors (H19-7 cell line). Deficiency was associated with growth retardation at embryonic day 20 (E20) and postnatally with long-term brain defects in selective areas. mRNA and protein levels of the transcription factor Stat3 were found to be decreased in the brains of deprived fetuses and in differentiating progenitors (62 and 48% for total Stat3 protein, respectively), along with a strong reduction in its phosphorylation at both Tyr^{705} and Ser^{727} residues. Vitamin shortage also affected upstream kinases of Stat3 signaling pathway (phospho-Erk1/2, phospho-Src, phospho-JNK, and phospho-p38) as well as downstream target gene products (Bcl-2 and Bcl-xL), thus promoting apoptosis. Conversely, the expression of the Stat3 regulator miR-124 was upregulated in deficiency conditions ($\geq$65%), and its silencing by using siRNA partly restored Stat3 signaling in hippocampal neurons by increasing specifically the phosphorylation of Erk1/2 and Src kinases. Furthermore, miR-124 siRNA improved the phenotype of deprived cells, with enhanced neurite outgrowth. Taken together, our data suggest that downregulation of Stat3 signaling by miR-124 would be a key factor in the deleterious effects of MDD on brain development.

Cell Death and Disease (2013) **4,** e755; doi:10.1038/cddis.2013.278; published online 8 August 2013
Subject Category: Neuroscience

The link between diet during pregnancy and infant development has been largely documented, and was associated with long-term effects on health.[1–3] The prevalence of folate (vitamin B9) and/or cobalamin (vitamin B12) deficiency in pregnant women is relatively high, especially in some communities.[4,5] The one-carbon metabolism is essential for DNA biosynthesis and methylation reactions, and thus has a key role in epigenetic and epigenomic regulations.[6] The conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to tetrahydrofolate in the folate cycle provides the methyl group required to convert the sulphur-containing amino acid homocysteine to methionine. Vitamin B12 acts as a cofactor for methionine synthase, which catalyzes this reaction.[7] Methionine is the precursor of S-adenosylmethionine (SAM), the universal substrate of transmethylation reactions, which is then demethylated to form S-adenosylhomocysteine (SAH). Thereafter, homocysteine is generated from the hydrolysis of SAH. The shared metabolism between folate and vitamin B12 suggests that deficiencies in one vitamin may alter the metabolism of the other. Deficiency of either folate, vitamin B12 or both vitamins can lead to various adverse consequences, including elevated blood homocysteine, intrauterine growth retardation, congenital heart defects and Down's syndrome.[8,9] Importantly, folate and vitamin B12 are essential for normal brain development, and both reduced folate and vitamin B12 status are risk factors for developmental disorders such as neural tube defects that can originate at various times during gestation.[10] In addition, a large body of evidence has linked deficiencies in maternal folate and/or vitamin B12 with infant cognitive development.[8,9]

[1]Faculté de Médecine, Inserm U954, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [2]Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France and [3]IRCCS, Oasi Maria S.S., Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, Troina, Italy
*Corresponding author: J-L Daval, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54500, France. Tel: +33 3 83 68 32 82; Fax: +33 3 83 68 32 79; E-mail: jean-luc.daval@inserm.fr
[4]These authors countributed equally to this work.
[5]These authors countributed equally to this work.
Keywords: folate; vitamin B12; Stat3; miR-124; epigenetics; brain development
Abbreviations: Dapi, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; E, embryonic day; Erk, extracellular signal-regulated kinase; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP, mitogen-activated protein; MDD, methyl donor deficiency; PN, postnatal day; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-adenosylmethionine; siRNA, small interfering RNA; Stat3, signal transducer and activator of transcription 3; SVZ, subventricular zone; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
Received 19.4.13; revised 25.6.13; accepted 02.7.13; Edited by E Candi

In experimental studies, deficiency in methyl donors such as folate and B12 has been associated with imbalanced proliferation/differentiation of neuronal cells, endoplasmic reticulum stress and apoptosis.[11–15] In addition, hippocampus atrophy, rarefaction of microvasculature as well as cognitive impairments were reported in rodents.[12,16,17] Although homocysteine was shown to be embryotoxic, it did not appear to be directly responsible for developmental disorders,[18,19] and the mechanisms underlying the effect of maternal B vitamin status on neural tube and brain development remain poorly understood.

Embryofetal brain development is a very complex process, requiring the temporal expression of specific gene sets with a number of precisely orchestrated steps.[20] To determine how genetic regulation of factors related to neural development might account for brain defects associated with folate/vitamin B12 depletion, we used a microarray approach (Rat Neurogenesis and Neural Stem Cell PCR Array, RT^2 Profiler PCR Array, SABiosciences, Qiagen SA, Courtaboeuf, France) that profiled the expression of 84 genes related to neurogenesis and cell differentiation in hippocampal neuroprogenitors issued from the rat H19-7 hippocampal embryonic cell line and in the brain of rat pups subjected to early methyl donor deficiency (MDD) (unpublished observations). As signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) emerged as one gene highly downregulated upon vitamin B deficiency, we further investigated its participation in the consequences of MDD both *in vivo* on a validated rat model of maternal deficiency[12,17] and *in vitro* in hippocampal progenitors.[14]

Primarily associated with cytokine- and growth factor-related signals, Stat3 is activated through phosphorylation, and regulates the transcription of target genes that participate in a number of physiological responses.[21] Indeed, Stat3 has been repeatedly involved in fundamental biological processes, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis and survival,[22,23] and has been shown to be implicated in various developmental events, such as motor neuron pathfinding and guidance[24] and neurite outgrowth.[25] Here, we provide the first evidence that early MDD causes loss of Stat3 signaling related to overexpression of miR-124, with impairment of cerebral development.

Results

In vivo and *in vitro* earlier studies have demonstrated the efficiency of our experimental conditions in reducing methyl donor availability both in the rat progeny[12,26] and in H19-7 hippocampal cells.[14] Consistently, global DNA methylation was reduced in low methyl donor conditions in the two experimental models, that is, by 23.2% in the brain tissue from fetuses ($n=4$) and by 40.4% in cultured hippocampal cells at 13 h after induction of their differentiation ($n=4$).

Gestational MDD alters rat pup morphometric properties and brain characteristics. As shown by Figure 1, both body weight and body length were significantly reduced (-20.5% and -15%, respectively) during late gestation (embryonic day 20, E20) in rat fetuses from dams fed the deficient diet, suggesting the occurrence of intrauterine growth retardation. This was confirmed by the noticeable reduction in the femur length (-14%). Whereas brain weight was also affected (-14.6%), the thickness of selective brain layers such as the hippocampal CA1 pyramidal layer, the granular cell layer of the dentate gyrus and the neurogenic subventricular zone (SVZ) were more dramatically decreased (-40, -22 and -26%, respectively). Most interestingly, these brain areas remained atrophied as late as the age of 450 days, although rat pups had exclusively received a standard, non-deficient diet since their weaning (Figures 1e–h).

MDD decreases brain expression and phosphorylation of Stat3. When studied by quantitative RT-PCR analysis, mRNA levels of Stat3 were found to be significantly decreased in the brains of E20 fetuses subjected to MDD as compared with controls (-34%, Figure 2a). Consistently, western blot immunoactivities revealed a decreased expression of Stat3 total protein both in the midbrain (which includes hippocampus, thalamus, hypothalamus and striatum) and in the cerebral cortex, along with lowered amounts of the phosphorylated forms, that is, phospho-Stat3 Tyr^{705} and phospho-Stat3 Ser^{727} (Figure 2b). Quantitative changes in protein levels are provided in Supplementary information (Supplementary Figure 1). According to our western blot analyses, total amounts of Stat3 protein were reduced by 62% in the midbrain of deprived fetuses. As illustrated by Figure 2c for phospho-Stat3 Tyr^{705}, such observations were confirmed *in situ* by immunohistochemistry in the cerebral cortex, the SVZ and the CA1 layer of the hippocampus.

Similar findings were obtained in cultured hippocampal progenitor cells, with a decrease in mRNA levels (-54%) and protein expression at 6 and 13 h after the induction of differentiation in cells lacking folate (Figure 3 and Supplementary Figure 1). Amounts of total Stat3 protein were reduced by 48% at 13 h after induction of cell differentiation. In addition, immunocytochemical analyses by confocal microscopy revealed an obvious decrease in the presence of Stat3 in cell nuclei (Figure 3c).

MDD affects the expression of active key protein kinases. Stat3-signaling pathways require several kinases such as Erk1/2 MAP kinases, p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and Src, which are involved in Stat3 dimerization and activation.[27,28]

Following exposure to MDD, the expression patterns of the active, phosphorylated forms of the corresponding kinases were differentially affected (Figure 4). Expression levels of phopho-Erk1/2, phospho-Src and phospho-p38 were significantly decreased, whereas the expression of phospho-JNK was increased and that of phospho-Akt did not vary significantly. Importantly, the recorded profiles were similar in the fetal brain tissues and in differentiating H19-7 cells. Quantitative changes in protein amounts are provided in Supplementary information (Supplementary Figure 2).

Decreased Stat3 signaling is associated with elevation of apoptosis and concomitant altered expression of related proteins both *in vivo* and *in vitro*. Activation of Stat3 is known to positively influence the expression of anti-apoptotic and pro-survival proteins Bcl-2 and Bcl-xL.[29,30] We therefore investigated their expression levels as well as those of other key factors in apoptosis following MDD.

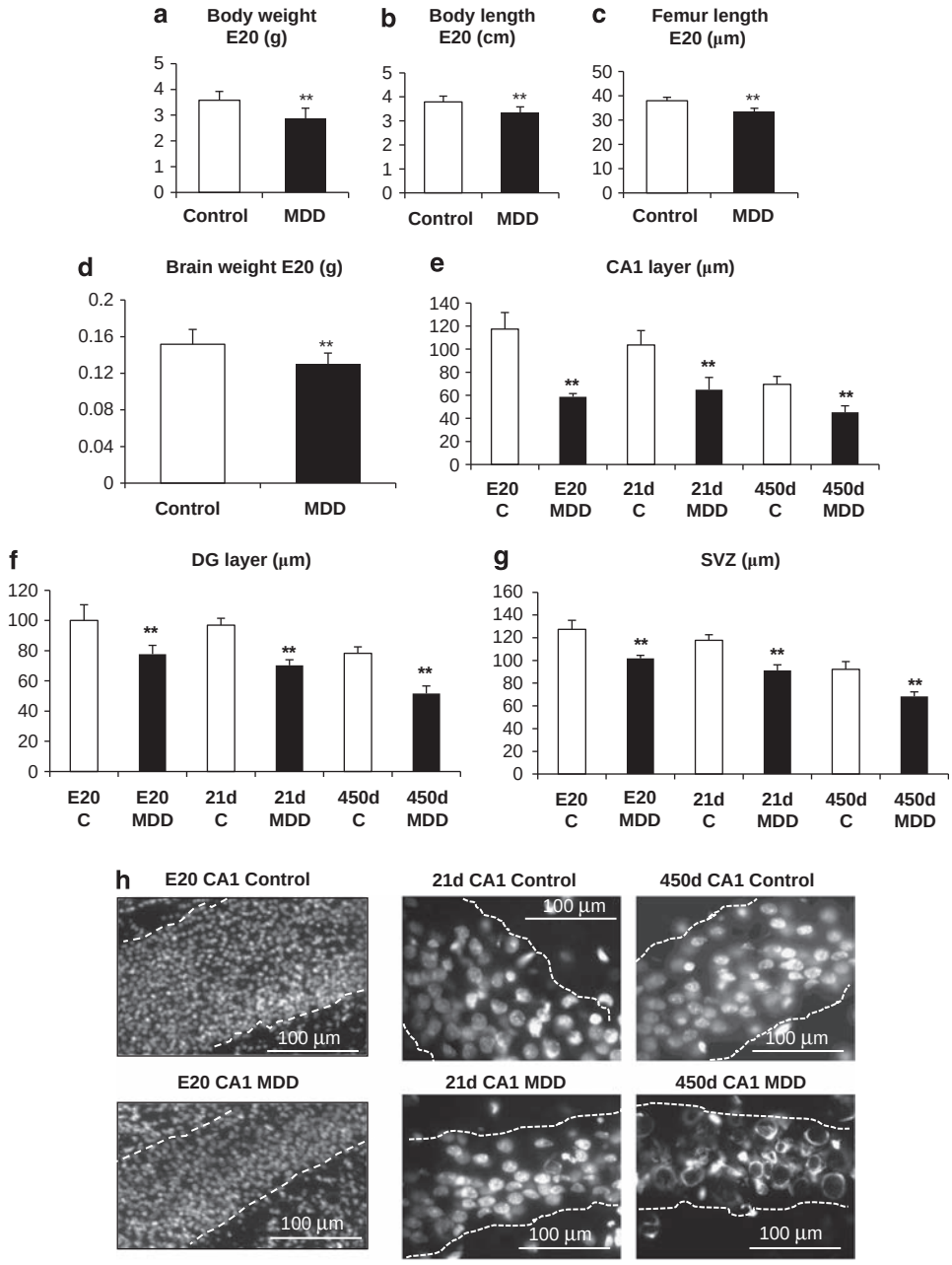


Figure 1 Effects of methyl donor deficiency on rat fetus morphometric properties. (**a–d**) General morphometric measurements in control and MDD fetuses at embryonic day (ED) 20, $33 \leq n \leq 37$. Data are reported as means ± S.D. Statistically significant differences between control and MDD rats: $^{**}P < 0.01$. (**e–g**) Kinetic measurements of thicknesses of hippocampal CA1 pyramidal cell layer, granular cell layer of the dentate gyrus (DG), and SVZ at E20, 21 days (**d**) and 450 days of age, $n \geq 17$ and $n \geq 23$ for controls (C) and MDD, respectively, $^{**}P < 0.01$. (**h**) Histological illustrations of the effects of methyl donor deficiency in the CA1 pyramidal layer at the various ages after counterstaining of cell nuclei by DAPI

As expected, amounts of Bcl-2 and Bcl-xL were significantly decreased in the brain of E20 fetuses subjected to the deficient diet, whereas the expression levels of pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase-3 were more elevated in both midbrain and cerebral cortex, cleaved caspase-9 being overexpressed in the midbrain only (Figure 5a). Quantitative changes in protein amounts are provided in Supplementary information (Supplementary Figure 2). Furthermore, the number of TUNEL-positive cells was dramatically increased in the hippocampus, the SVZ and the cerebral cortex of deficient fetuses (Figure 5c, Supplementary Figure 3). This was confirmed by the labeling of active caspase-3 and caspase-9 in fetal brains, as illustrated in the CA1 hippocampal region and in the SVZ, with the presence of a high number of dead cells within the lateral ventricle (Supplementary Figure 3).

Similar findings were obtained from differentiating hippocampal progenitors, the viability of which was more affected

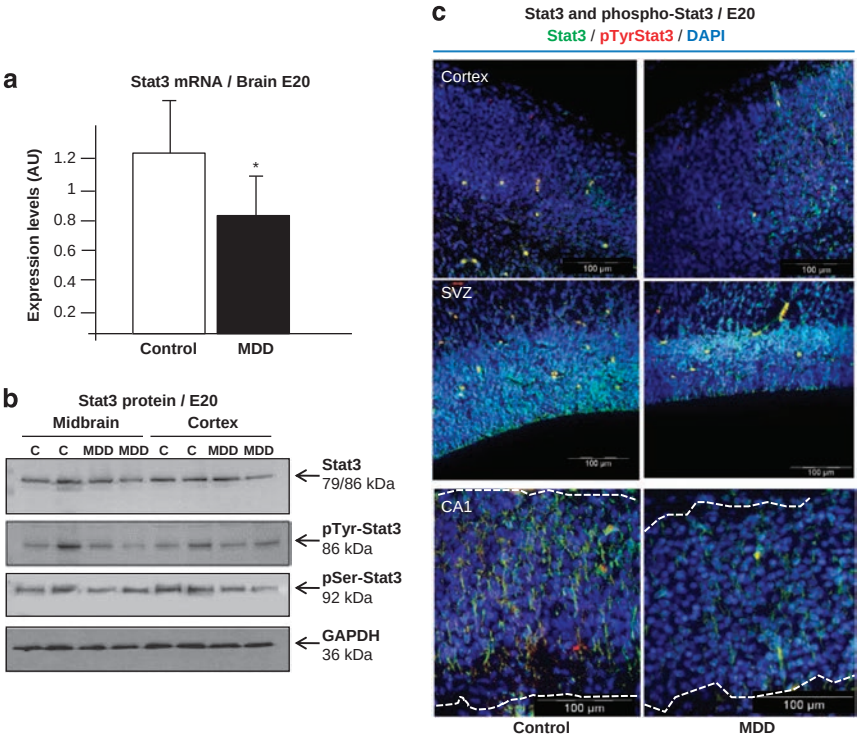


Figure 2 Effects of methyl donor deficiency on brain expression of Stat3 and phospho-Stat3 (Tyr^{705} and Ser^{727}) in rat fetuses at E20. (**a**) Total Stat3 mRNA levels measured by real-time quantitative RT-PCR. Data are reported in arbitrary units (AU) as means ± S.D. ($n = 5$), $^{*}P < 0.05$. (**b**) Western blot analyses of protein expression levels of Stat3, phospho-Stat3 Tyr^{705} and phospho-Stat3 Ser^{727} in the midbrain and the cerebral cortex from control (C) and MDD E20 fetuses. Similar profiles were obtained from five other experiments. (**c**) Immunohistochemical labeling of Stat3 and phospho-Stat3 Tyr^{705} in the cerebral cortex, SVZ and hippocampal CA1 layer from control and MDD E20 fetuses

by folate deficiency as compared with controls (Figure 5d). Consistently, the loss of mitochondrial membrane potential, as depicted by the Mitocapture procedure, was higher in folate-deficient progenitors, along with an increased percentage of Apostain-positive cells indicative of apoptosis-associated single-stranded DNA (Figures 5e,f). Increased apoptosis was confirmed by the TUNEL/Apoptag method, as illustrated in Figure 5b.

Decreased Stat3 signaling is associated with increased brain expression of miR-124. As miR-124 has been reported to regulate Stat3 signaling by affecting Stat3 phosphorylation[31] and by targeting the 3′-UTR of Stat3 gene so as to inhibit the expression of Stat3 protein,[32] we subsequently investigated the consequences of an MDD on the expression of miR-124 in the brain of rat pups and in H19-7 cells.

When studied using TaqMan RT-qPCR, miR-124a ncRNA expression patterns showed a significant increase (by two-fold) in the brains from E20 fetuses exposed to MDD as well as in B9-deficient H19-7 neuroprogenitors at 13 h after the induction of their differentiation (1.7-fold) (Figures 6a,b). This was confirmed by *in situ* hybridization both *in vivo* in various brain areas including the hippocampus, the SVZ (Figure 6c) and the cerebellum (not shown), and *in vitro* in differentiating cells (Figure 6d).

Silencing miR-124 improves Stat3 signaling and at least partly rescues cells exposed to folate deficiency. The use of non-targeting siRNA had no patent effect on the expression of Stat3 at 13 h after induction of differentiation of H19-7 cells. Conversely, miR-124a siRNA, which repeatedly inhibited the expression of miR-124 by 87% after quantification by TaqMan RT-qPCR, increased Stat3 and phospho-Stat3 levels, mainly in folate-deficient cells (Figure 7a). Consistently, silencing miR-124 obviously reduced the differences observed between control and deprived cells in the phosphorylation patterns of upstream Erk1/2 MAP and Src kinases, as well as in the expression of downstream targets of Stat3 (Bcl-2, Bcl-xL). Concomitantly, the amounts of Bax as well as active caspases 3 and 9 were found to be diminished in miR-124 siRNA-treated deprived cells, along with a significant decrease in TUNEL-positive cells (Figure 7c). Quantitative changes in protein amounts are provided in Supplementary information (Supplementary Figure 4). Silencing of miR-124 did not induce changes regarding the other kinases implicated in the Stat3 signaling pathway, that is, p38, JNK and Akt (data not shown).

The detrimental role of increased miR-124 in folate-deficient progenitors was further demonstrated by cell morphology of differentiating progenitors (Figure 7b). Indeed, folate deficiency was accompanied at 13 h of differentiation by a strong reduction in the number and length of neural

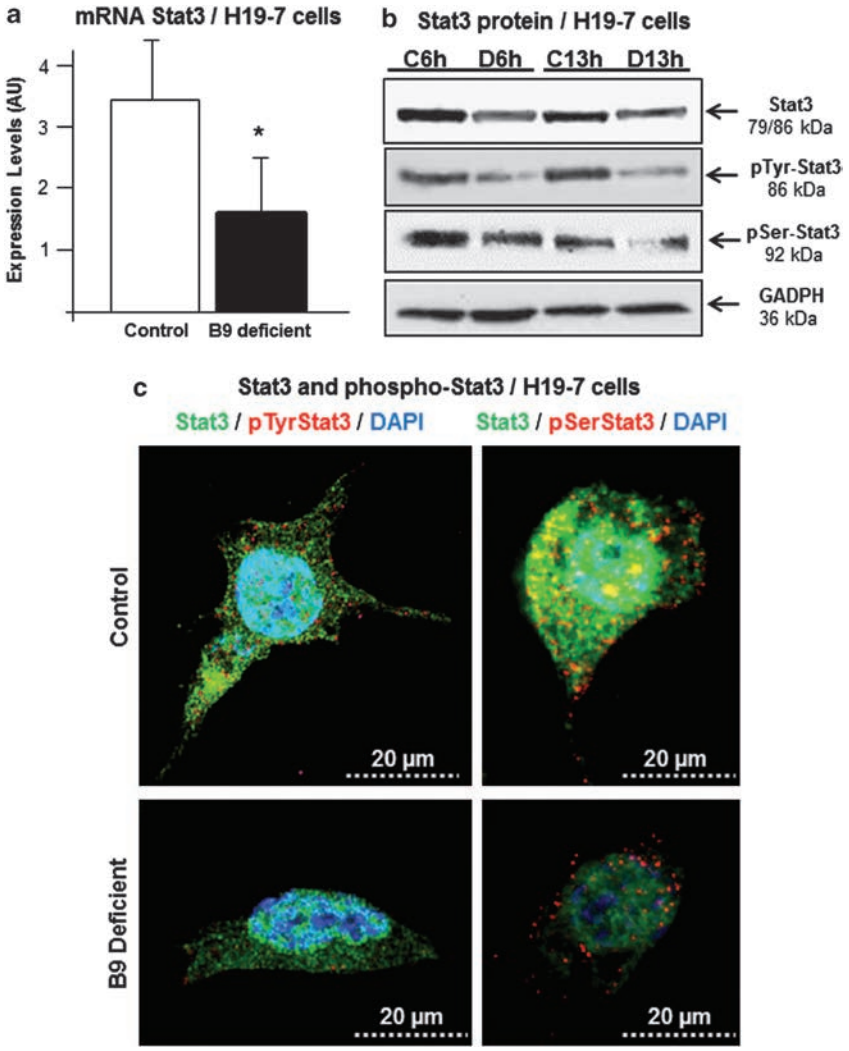


Figure 3 Effects of folate deficiency on the expression of Stat3 and phospho-Stat3 (Tyr^{705} and Ser^{727}) in H19-7 hippocampal progenitor cells. (**a**) Total Stat3 mRNA levels measured by real-time quantitative RT-PCR in control and B9-deficient cells at 13 h after induction of their differentiation. Data are reported in AUs as means ± S.D. ($n = 5$), $^{*}P < 0.05$. (**b**) Western blot analyses of protein expression levels of Stat3, phospho-Stat3 Tyr^{705} and phospho-Stat3 Ser^{727} in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 6 and 13 h after the induction of differentiation. Similar findings were obtained from five other experiments. (**c**) Immunocytochemical labeling of Stat3, phospho-Stat3 Tyr^{705} and phospho-Stat3 Ser^{727} in control and B9-deficient H19-7 cells at 13 h after induction of their differentiation

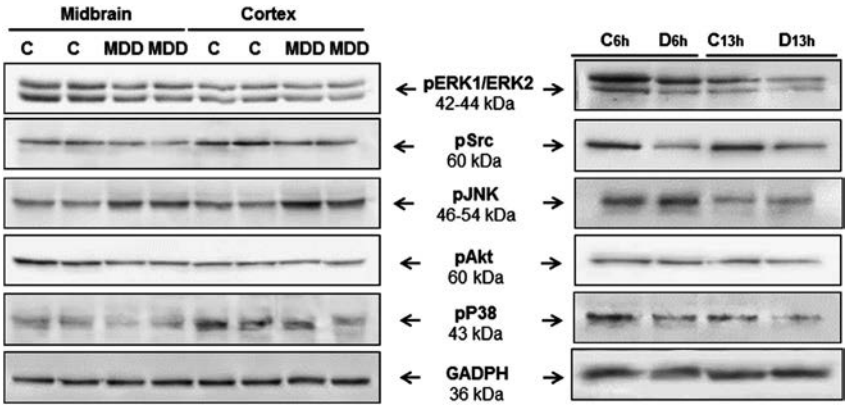


Figure 4 Western blot analyses of upstream phospho-kinases involved in Stat3 signaling pathways in the midbrain and cerebral cortex of control (C) and MDD E20 fetuses, and in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 6 and13 h after the induction of their differentiation. Similar profiles were obtained from five other experiments

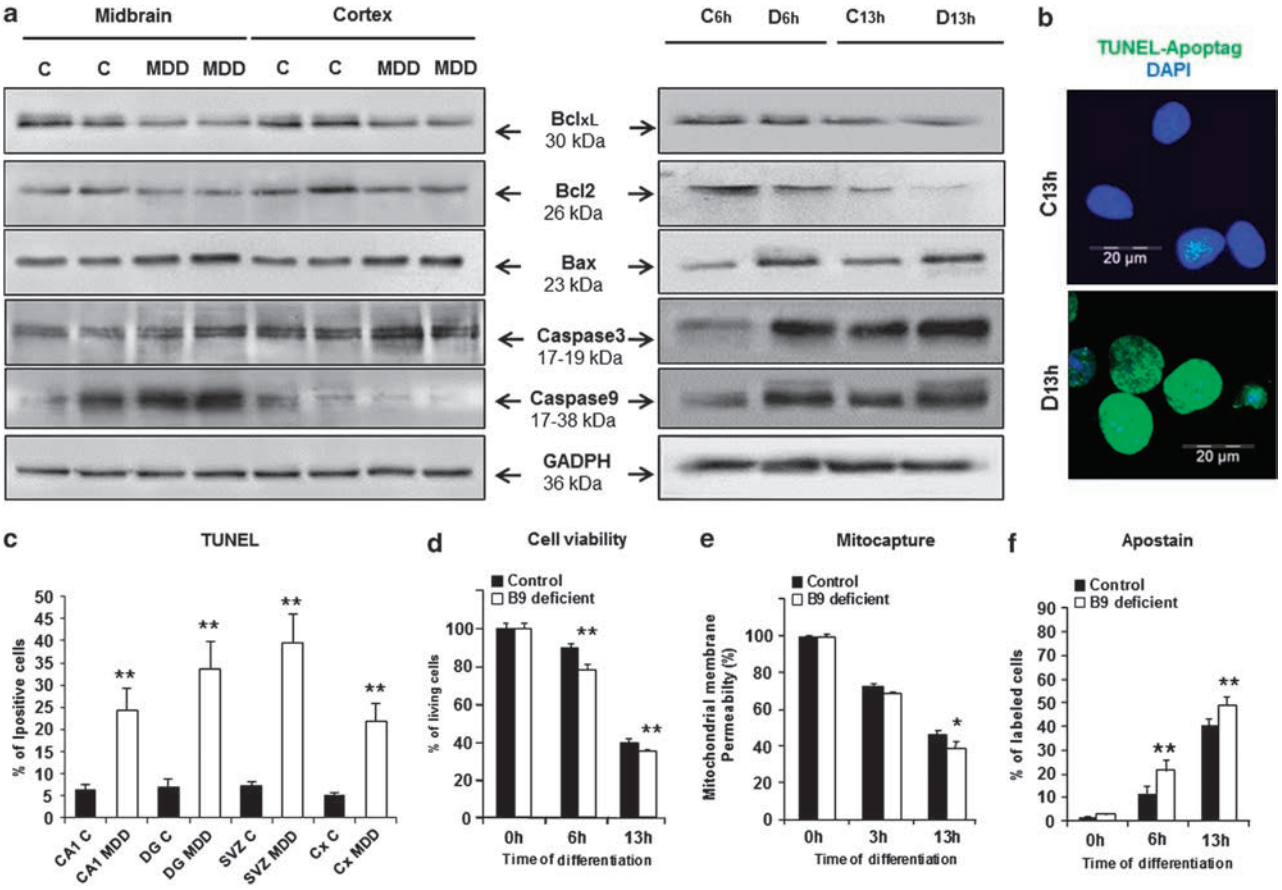


Figure 5 Effects of methyl donor deficiency on cell apoptosis and the key related proteins. (**a**) Western blot analyses of targets of Stat3 signaling (Bcl-xL and Bcl-2) and apoptosis-related proteins in the midbrain and cerebral cortex of control (C) and MDD E20 fetuses, and in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 6 and13 h after the induction of their differentiation. Similar profiles were obtained from five separate experiments. (**b**) Illustration of increased apoptosis depicted by the TUNEL assay in deficient (D) cells as compared with controls (C) at 13 h following the induction of differentiation. (**c**) *In situ* quantification of apoptosis in the CA1 layer of the hippocampus, the DG, the SVZ and the cerebral cortex (Cx) in control (C) and MDD E20 fetuses. (**d**) Temporal changes in H19-7 cell viability by using the CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega). (**e**) Changes in the mitochondrial membrane potential depicted using the MitoCapture detection kit (Calbiochem). (**f**) Percent of apoptotic cells reflected by Apostain immunostaining. All data are reported as means ± S.D. ($n=5$); $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

processes, as previously documented.[14] In the present study, the downregulation of miR-124 by siRNA led to a noticeable restoration of these processes. Although the treatment by miR-124 siRNA slightly affected cell characteristics in control progenitors, the number of neurites per cell was ~three-fold increased in folate-deficient cells treated by miR-124 siRNA as compared with those treated by non-targeting siRNA (Figures 7d, $P<0.01$).

Discussion

In the present study, we report for the first time that the downregulation of Stat3 signaling pathways targeted by increased miR-124 appears as a key factor in the deleterious effects of MDD on brain development. Our main conclusions are summarized in Figure 8.

The direct effects of MDD on the one-carbon metabolism and its various key factors in the animal model as well as the effects of folate deficiency in cultured H19-7 hippocampal progenitors have been extensively described in previous reports.[12,14,26] In particular, such treatments result in the accumulation of homocysteine, and in a decrease of the cellular index of methylation capacity corresponding to the SAM/SAH ratio. This is reflected in our study notably by a decrease in the amounts of methylated DNA in response to MDD in our two experimental models.

In the *in vivo* model, it appeared that the deficient regimen provided to dams during gestation led to reduced embryonic growth as compared with gestationally matched control fetuses at E20. These observations are in good accordance with other studies, in which it was shown that embryonic folate concentration limits growth and developmental progression,[19] whereas B12 deficiency affects body weight of the offspring.[33] In the present study, such a retardation includes deficiency-associated reduced brain weight. Decreased proliferation of neuroprogenitors and increased apoptosis have been reported in the brain of rodents under folate and vitamin B12 deficiency during gestation.[11,12] Importantly, atrophy of various brain layers including hippocampal cell layers and the SVZ—known as neurogenic zones in the adult brain—was

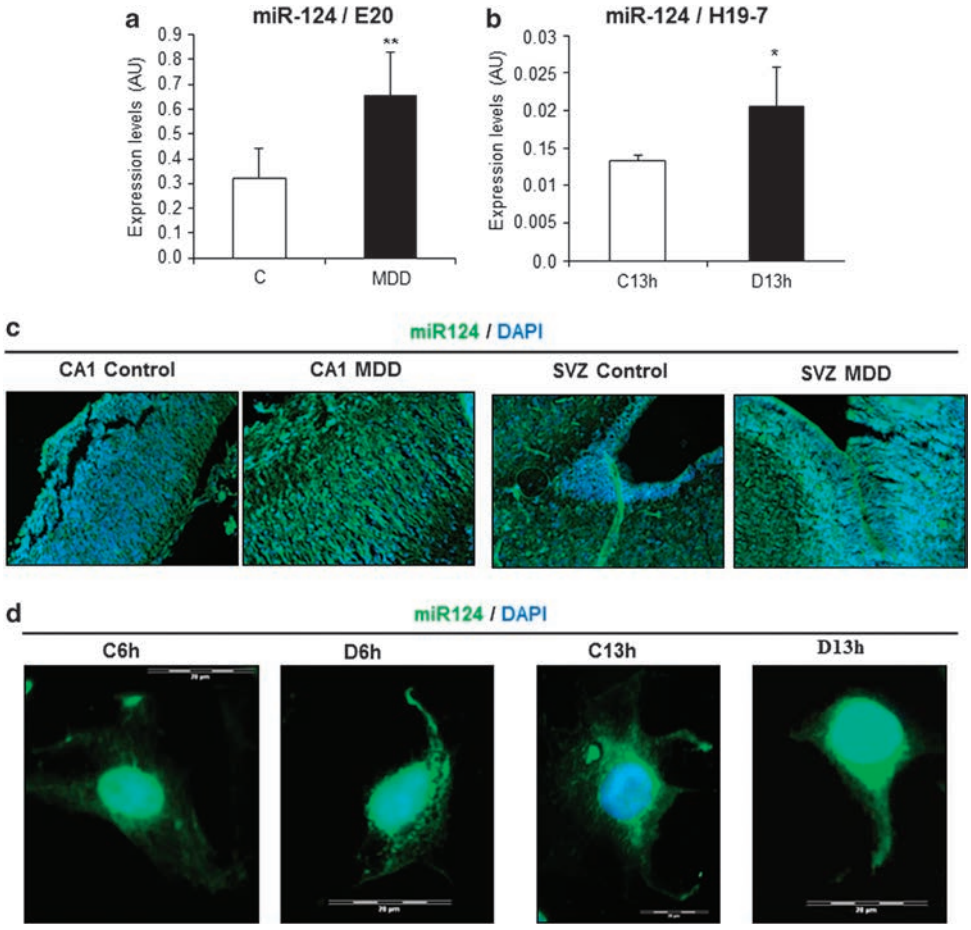


Figure 6 Effects of methyl donor deficiency on the expression of miR-124. (**a**) Expression levels of miR-124 in AU in the brains of control and deficient E20 fetuses. (**b**) Expression levels in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 13 h after the induction of their differentiation. All data are reported as means ± S.D. ($n = 9$ and $n = 7$ for E20 brain tissue and H19-7-cultured cells, respectively), $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. (**c**) Expression of miR-124 as depicted by *in situ* hybridization in the CA1 layer and SVZ from control and MDD E20 fetuses, and (**d**) in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 6 and13 h after the induction of their differentiation

depicted in deficient pups. If embryonic growth and brain weight at E20 were reduced in the same proportions (about 15%) following exposure to the deficiency, the effects on the cerebral cell layers are more pronounced, especially in the CA1 hippocampal region where pyramidal cell layer was reduced by 40%, reflecting a specific developmental vulnerability under MDD. In addition to decreased cell proliferation, as previously documented,[11,14] this may be related to increased apoptosis, as observed *in situ* by the TUNEL assay and caspase labeling, along with the presence of numerous dead cells in the lateral ventricle from deficient fetuses. Cell layer atrophy was still present in the brain of 450-day-old rats, suggesting persisting brain defects.

While folate deprivation markedly affects proliferation, differentiation and viability of hippocampal progenitors *in vitro*, cell polarity, vesicular transport and synaptic plasticity were shown to be dramatically altered, with poor neurite outgrowth.[14] The transcription factor Stat3 is known to strongly influence proliferation, survival, growth and differentiation of neuronal cells during brain development and in mature brain after injury.[23,34–36] In rodents, Stat3 mRNA and protein are expressed continually from E14 to 3 months. During postnatal development, Stat3 expression increases from postnatal day 3 (PN3) through PN21.[23] Stat3 acts on various target genes that participate in a variety of physiological processes, including apoptosis, survival and neurite outgrowth. It is activated by phosphorylation at two types of residues, that is, Tyr^{705} and Ser^{727}, allowing homo- and/or heterodimerization, translocation into the nucleus and subsequent binding to sequence-specific DNA motifs. In addition, phospho-Stat3 Ser^{727} has been recently reported to mediate nerve growth factor-induced neurite outgrowth by a transcription-independent mechanism.[37] Under MDD, the amounts of Stat3 mRNA, Stat3 and phospho-Stat3 proteins were dramatically decreased both *in vivo* in the fetal brain and *in vitro* in hippocampal progenitors, in which less protein amounts were observed in cell nuclei. Stat3 phosphorylation involves various important kinases, the activation of which being differentially affected by methyl donor deprivation. Growth factors such as epidermal growth factor and platelet-derived growth factor stimulate Stat tyrosine phosphorylation through their intrinsic receptor tyrosine kinase activity or by the non-receptor tyrosine kinases Src,[38] whereas serine phosphorylation occurs via MAP kinases and other serine

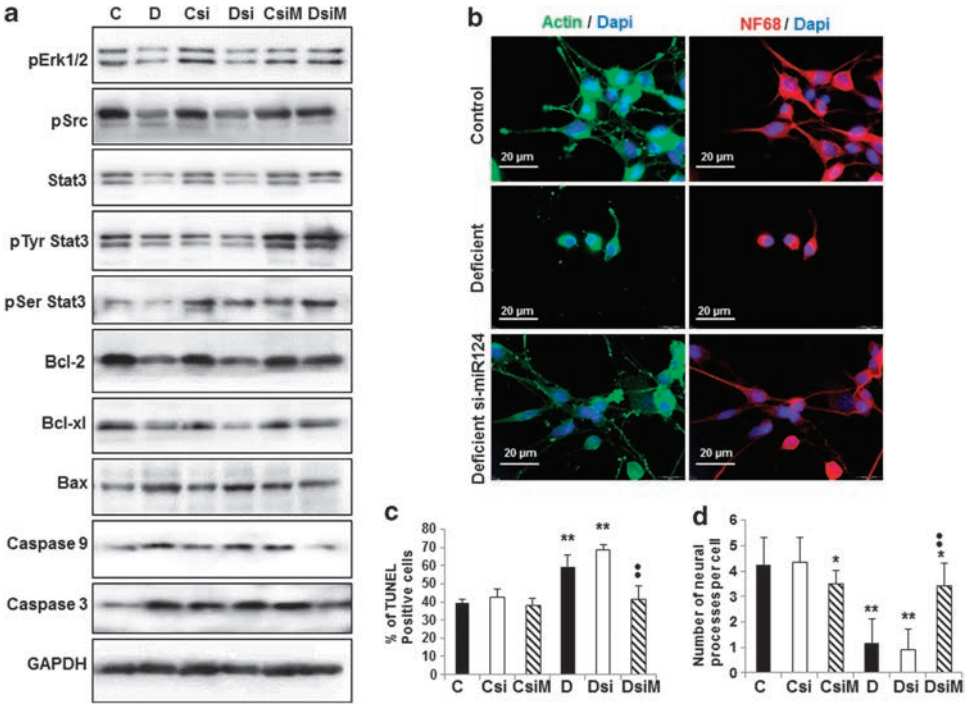


Figure 7 Effects of silencing miR-124 on differentiating H19-7 cells. (**a**) Effects of miR-124 siRNA on the expression levels of Stat3 and related proteins in control (C) and folate-deficient (D) cells at 13 h after induction of differentiation (si = non-targeting siRNA, siM = miR-124-targeted siRNA). Expression patterns are representative of three separate series of western blots. (**b**) Influence of miR-124 siRNA on cell morphology at 13 h after the induction of differentiation. (**c**) Percentage of apoptotic cells as depicted by the TUNEL assay. (**d**) Number of cell processes per cell. For (**c**) and (**d**): statistically significant difference with the respective control: $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$; statistically significant difference between Dsi and DsiM: $^{\bullet\bullet}P<0.01$ ($n=4$)

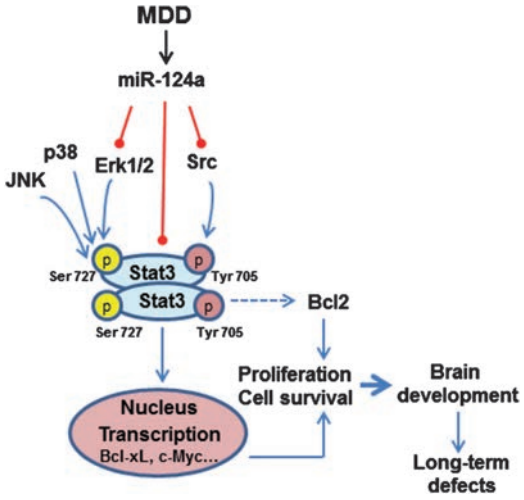


Figure 8 Summary of major events involved in the consequences of MDD in the rat brain. Please note that we provide the first evidence of a negative regulation by miR-124 on Src activity that accounts for phosphorylation of Stat3 at Tyr^{705} residue

kinases such as the serine-threonine kinase Akt.[28] In our models, phospho-Erk1/2, phospho-Src and phospho-p38 were repressed in conditions of MDD, suggesting their potential role in the pathophysiological consequences observed. Whereas Akt pathway did not appear to be involved, the expression of phospho-JNK was increased, an observation consistent with the potential negative regulation of Stat3 by JNK.[39]

MicroRNAs constitute an extensive class of small noncoding RNAs that control post-transcriptional gene expression. In this respect, Stat3 has been identified as a target of miR-124, the most abundant microRNA in the mammalian brain. The recent identification of a central role for miR-124 in neurogenesis[40] and synaptic plasticity[41] integrates this microRNA into the full repertoire of neuronal events, particularly at both the developmental and functional aspects. miR-124 regulates Stat3 either by inhibiting its phosphorylation at Tyr^{705} residue by an unknown mechanism[31] or, as demonstrated more recently, by targeting the 3′-UTR of *Stat3* gene so as to repress the expression of Stat3 protein.[32] The expression levels of miR-124a were found to be obviously increased in brains of fetuses as well as in differentiating hippocampal neurons after exposure to MDD, suggesting a significant role for miR-124 on Stat3 signaling in response to folate and B12 deprivation. This conclusion was strengthened by our additional experiments using siRNA transfection. Indeed, silencing miR-124a by almost 90% in H19-7 progenitors appeared to restore Stat3-signaling pathway in folate-deficient cells by increasing specifically the phosphorylation of Erk1/2 and Src kinases. As mentioned above, Erk1/2 phosphorylates Stat3 at Ser^{727}residue, whereas Src phosphorylates Stat3 at Tyr^{705} residue, the phosphorylation at both residues being necessary for Stat3 activation and

subsequent dimerization. miR-124 was recently identified as a negative regulator of Erk MAP kinases,[42] and we provide herein the first evidence of a negative regulation of Src activity by miR-124.

Strikingly, whereas the treatment by miR-124a siRNA slightly reduced the number of neurites in control cells, it greatly improved cell morphology in deficient progenitors.

Although the precise mechanisms by which B vitamin status may influence miR-124 expression remain to be fully elucidated, the existence of a link between folate and miRs has been previously documented. Folate supplementation would exert beneficial effects on ethanol-induced teratogenesis in the fetal mouse brain in part by downregulating miR-10a,[43] whereas the expression of various miRs in the developing brain of a neural tube defect-prone mutant mouse model (*Splotch*$^{-/-}$) was reversed by maternal folic acid supplementation.[44] Finally, Marsit *et al.*[45] showed that folate deficiency causes a pronounced increase in the expression profiles of several miRs in cultured human lymphoblastoid cells. Reduced folate/vitamin B12 status leads to reduced availability of SAM, which is required for cellular methylation reactions. It has been documented that miRs are regulated by epigenetic events,[46] and methylation-mediated silencing of the miR-124 genes has been recently demonstrated.[47] Therefore, altered miR-124 expression may be related to the low methyl donor pool, along with reduced DNA methylation, as observed in our models, and finally resulting in changes in Stat3 expression.

In conclusion, we showed that MDD was associated with an increased miR-124 expression that affected Stat3 signaling at two different levels; first at the expression level by targeting Stat3 mRNA, and second by targeting its activation through the inhibition of Erk1/2 and Src kinases, without effects of miR-124 on other kinases involved in Stat3 signaling. The brain is very vulnerable during development, and impaired Stat3 signaling may lead to reduced cell proliferation and increased apoptosis that may account for a definitive atrophy of specific cerebral layers, as observed in vitamin B-deficient rats.

Materials and Methods

Animals and tissue collection. *In vivo* experiments were conducted in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals on a validated animal model of MDD,[12,17] and was approved by the local University Research Ethics Board. One month before mating, adult female Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) were fed either a standard diet ($n=6$) (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or a methyl donor-deficient (MDD) low-choline diet lacking folate and vitamin B12 ($n=6$) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). As gestation progressed, fetuses were collected at E20 from four MDD and four control dams. The fetuses were weighed and evaluated morphologically with the aid of a BX51WI microscope (Olympus, Rungis, France) coupled to an Olympus camera (U-CMAD3). The brains were removed, weighed and conserved for histopathological evaluations. For biochemical analyses, the brains were rapidly harvested and dissected in three parts (cortex, midbrain and cerebellum) before freezing in liquid nitrogen and stored at $-80\,^{\circ}$C. Otherwise, the assigned diet was provided to the dams until weaning of the offspring (postnatal day 21). At this time, rat pups were randomly chosen in the different litters (five controls and five MDD), whereas the remaining pups were kept under standard conditions until 450 days of age. In all cases, rats were euthanized by excess isoflurane, and their brains rapidly harvested, frozen in methylbutane at $-30\,^{\circ}$C and stored at $-80\,^{\circ}$C for subsequent immunohistochemistry performed on cryostat-generated 12-μm sagittal brain sections mounted onto glass slides.

Cell cultures. H19-7/IGF-IR cell line (ATCC no. CRL-2526) was conditionally immortalized from embryonic day 17 rat hippocampi with a temperature-sensitive simian virus 40 (SV40) large tumor antigen.[48] Cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per well in 24-well plates (Falcon, Dutscher, Brumath, France) precoated with poly-L-lysine in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, 50 U/ml streptomycin, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate, as previously described.[14,49] For homogeneity, the same lot of serum was used throughout all experiments. Cells were allowed to proliferate at the temperature of 33 °C in 95% air/5% CO_2. Selection was maintained with 200 μg/ml G418. As standard DMEM does not contain vitamin B12, MDD was induced by using DMEM lacking vitamin B9 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After 24 h, cells were washed and shifted to the non-permissive temperature (39 °C) for induction of their differentiation in high-glucose-DMEM (with or without B9) containing 1% fetal calf serum, N_2 supplement (Invitrogen) and 0.11 mg/ml sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mg/ml transferrin, 20 nM progesterone, 0.1 mM putrescine and 30 nM sodium selenite.

Cell viability was assessed by the measurement of intracellular ATP using the CellTiter-Glo luminescent viability assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), and mitochondrial membrane permeability was evaluated by the MitoCapture assay kit (Calbiochem, VWR International, SAS, Fontenay-sous-Bois, France) using a fluorescent cationic dye, as described by Akchiche *et al.*[49]

DNA methylation. Global DNA methylation was quantified in brain tissues at E20 as well as in cultured hippocampal cells at 13 h after the induction of differentiation by using the Methylamp Global DNA Methylation Quantification Kit (Epigentek, Euromedex, Mundolsheim, France), as previously described.[50] According to the manufacturer's instructions, the methylated fraction of DNA can be recognized by a 5-methylcytosine antibody and quantified through an ELISA-like reaction. The amount of methylated DNA is proportional to the OD intensity.

Histopathological analyses. For basic histopathological investigations, brain sections were stained with thionin or the DNA fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for the measurement of thickness of specific brain layers.

The presence of apoptosis was selectively depicted by the Apostain method[51] using monoclonal antibody to single-strand DNA (F7-26 from calf thymus ssDNA, AbCys SA, Paris, France) after DNA denaturation by heating in the presence of formamide, as described by Blaise *et al.*[12] and Akchiche *et al.*[14] for tissue sections and cultured cells, respectively. Apoptosis was additionally monitored by using the ApopTag Plus Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International, Millipore, Guyancourt, France) based on the TUNEL assay and which labels apoptotic cells by modifying genomic DNA utilizing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT).

For skeletal analysis, the procedure adapted from Wallin *et al.*[52] involves complete skinning of fresh eviscerated rat embryos following a 24 -h-immersion in 95% ethanol. Skeletons were stained for 48 h with 1% Alcian blue dye, diluted in an ethanol/acetic acid mix, specific for cartilage staining. Skeletons were then macerated in 2% KOH until bones are visible, and stained for 24 h with 0.12% Alizarin red dye diluted in KOH, specific for bone staining. Specimen were finally cleared and hardened in glycerol/ethanol baths and stored in 87% glycerol. Femur length was measured by means of the Cell software (Olympus).

Immunohistochemistry. Cells cultured on poly-L-lysine-precoated glass coverslips were washed, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), as reported by Akchiche *et al.*[14] Nonspecific binding sites were blocked in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin (BSA) and incubation was performed overnight with an antibody against one of the following proteins: Stat3 (rabbit monoclonal, 1/200, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), phospho-Stat3 Tyr^{705} (mouse monoclonal, 1/100, Cell Signaling Technology), phospho-Stat3 Ser^{727} (mouse monoclonal, 1/100, Enzo life sciences, Villeurbanne, France), actin (goat polyclonal, 1/200, Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), NF68 (rabbit polyclonal, 1/300, US Biological, Euromedex, Souffelweyersheim, France). After a washing step, immunoreactivity was assessed by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1 h at 25 °C (1/1000, Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France). Control experiments were conducted by omitting the primary antibody. Immunofluorescence visualization, image acquisition ($\times$ 20 and

× 60 magnification) and unbiased cell counts in randomly selected fields were performed with a BX51WI microscope (Olympus) coupled to an Olympus camera (U-CMAD3) or a confocal microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne Cedex, France), and analyzed using Cell software. Labeled cells were calculated as a percent of total cells after Dapi counterstaining.

Western blotting. Western blot analyses were performed using standard procedure with chemiluminescence using ECL system (Amersham Biosciences, Orsay, France), as previously detailed.[49] Antibodies against the following proteins were used: Stat3 (rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-Stat3 Tyr^{705} (mouse monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-Stat3 Ser^{727} (mouse monoclonal, 1/250, Enzo life sciences), Bcl-2 (goat polyclonal, 1/1000, Santa Cruz Biotechnology), Bcl-xL (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Bax (rabbit polyclonal, 1/1000, Santa Cruz Biotechnology), cleaved caspase-3, Asp^{175} (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), cleaved caspase-9, Asp^{353} (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Src (rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), phospho-Src Family Tyr^{416} (rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), p44/42 MAP kinase (Erk1/2, rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), phospho-p44/42 MAP kinase Thr^{202}/Tyr^{204} (rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), Akt (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-Akt Ser^{473} (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-p38 MAP kinase Thr^{180}/Tyr^{182} (rabbit monoclonal, 1/500, Cell Signaling Technology) and phospho-SAPK/JNK Thr^{183}/Tyr^{185} (rabbit monoclonal, 1/500, Cell Signaling Technology).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, mouse monoclonal, 1/1000, Abcam, Paris, France) was used as an internal standard. Polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 1 h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1/5000, Molecular Probes). Quantity One software, associated with the VersaDoc imaging system (Model 1000, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), was used to quantify signals.

RNA extraction. Total RNA was extracted from H19-7 cells (10^2–10^7 cells) and from 0.5 mg of embryonic midbrain tissues using the mirVana miRNA Isolation kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. miRNA is isolated using a two-step procedure. In the first step, samples are disrupted in a denaturing lysis buffer, and then subjected to acid-phenol/chloroform extraction. The second step consists of purification over glass-fiber filter that immobilizes the RNA that was later eluted using RNase-free water. According to the manufacturer's instructions, no enrichment procedure is needed while isolating miRNA for expression profiling using miRNA arrays. The concentration and purity of RNA were determined at 260/280 nm by using a nanodrop spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific, Gometz le Châtel, France).

Quantitative real-time RT-PCR. Total RNA was purified using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen). PCR was performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and the LightCycler 480 instrument (Roche Applied Science, Manheim, Germany). Specific amplifications were performed using as primers: Stat3 forward 5′-GAAGAGTGCCTTCGTGGT-3′, reverse 5′-AGCAACCT GACTTTTGTGG-3′. Quantification was performed with RNA polymerase II (Pol II) as an internal standard with the following primers: forward 5′-GCATTAACAT CAGGAACAATAAAGGC-3′ and reverse 5′-GATCTCTCTAAAGTTGACCT CATTGG-3′. Real-time PCR was carried out using the DNA-binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products. Temperature cycling was 15 min at 95 °C followed by 50 cycles consisting of 94 °C for 10 s, 56 °C for 15 s and 72 °C for 15 s. Results were expressed as arbitrary units by calculating the ratio of crossing points of amplification curves stat3 mRNAs and internal standard by using the RelQuant software (Roche Diagnostics).

Analysis of miR-124 expression

TaqMan RT-qPCR: Two-step real-time PCR was used to analyze the expression of miR-124. In the first step, total RNA was reverse transcribed using miRNA-specific RT primers (rno-miR-124 and U6SnoRNA) and a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). miRNA expression was analyzed using Taqman microRNA assays (Applied Biosystems), according to the instructions of the manufacturer. The RT reaction was performed in 15 μl volume, containing 1 μg RNA sample, 3 μl primer and master mix adjusted to 15 μl/reaction. Products of RT reaction (1.33 μl) were used in a real-time PCR reaction, which also included 10 μl of the TaqMan Universal Master Mix II, and 1 μl TaqMan miRNA assay containing the sequence-specific primers of either the target miRNA (5′-GGCATTCACCGCGTGCCTTA-3′) or the U6SnoRNA (5′-CAC-GAATTTGCGTGTCATCCTT-3′) used as an endogenous control for normalization. Real-time PCR was carried out on a Step One Plus LightCycler (Roche Applied Science). Incubations were performed in a 96-well plate at 95 °C for 10 min for enzyme activation, followed by 40 cycles of PCR: denaturation (95 °C for 15 s), and annealing/extending (60 °C for 2 min). Data analysis was performed with the software provided by the manufacturer (Step One Plus).

In situ *hybridization*: The *in situ* detection of miR-124 was performed on paraffin-embedded sections from normal and methyl donor-deficient brain tissues by locked nucleic acid (LNA)-oligo *in situ* hybridization, as previously described by Kloosterman *et al.*[53] Briefly, the slides were deparaffinized in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol and treated with proteinase-k for nucleic acid release. Slides were then re-dehydrated and prehybridized in hybridization buffer with 0.5 nm specific probe (LNA-modified and digoxygenin (DIG)-labeled oligonucleotide, Exiqon, Copenhagen, Denmark) complementary to miR-124. Sections were then washed in saline sodium citrate buffer, followed by blocking in Denhardt solution 1 × in a humidified chamber. Slides were then incubated with anti-DIG antibody (1/500, Roche Applied Science) for 1 h at room temperature, washed in PBS-T and then immunoreactivity was assessed in the presence of a matching secondary antibody conjugated to AlexaFluor (1/2000, Molecular probes) for 1 h at room temperature. Positive controls (snoRNA U6B, Exiqon) were used for each hybridization experiment.

Small interfering RNA (siRNA) and cell transfection. MiR-124 expression in hippocampal cell cultures was silenced using small interfering RNA (siRNA). The siRNA oligonucleotide duplexes were purchased from Ambion (Applied Biosystems) for targeting the rat miR-124 (has-miR-124-3p) in H19-7 cells. The siRNA sequence is (sense strand-indicated): 5′-UAAGGCACGCGGU GAAUGCC-3′, and mirVana miRNA Inhibitor Negative Control no. 1 was used as control for evaluation of the effect of the experimental miRNA inhibition. siRNA duplexes (25 nM final concentration for the first transfection then 10 nM for the second day re-transfection) were transfected with lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Three days post transfection, cells were harvested for RNA or protein extraction.

Statistical analysis. Data were analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA, USA). They were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. P-value <0.05 was considered to indicate significance.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We are indebted to the 'Région Lorraine' for support. RK, AG and AB are recipients of a fellowship from the french Ministry for Higher Education and Research.

1. Oliver MH, Jaquiery AL, Bloomfield FH, Harding JE. The effects of maternal nutrition around the time of conception on the health of the offspring. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; **64**: 397–410.
2. McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; **102**: 82–89.
3. Attig L, Gabory A, Junien C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc Nutr Soc* 2010; **69**: 221–231.
4. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Guéant RM, Feillet F, Villaume C *et al.* High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677 C –> T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 619–624.
5. McLean E, de Benoist B, Allen LH. Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S38–S51.
6. Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab* 2013; **24**: 279–289.

7. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; **157**(Suppl 2): S40–S44.
8. Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S101–S111.
9. Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S126–S131.
10. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993; **86**: 703–708.
11. Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* 2004; **134**: 162–166.
12. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL *et al.* Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 2007; **170**: 667–679.
13. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE *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* 2009; **106**: 21930–21935.
14. Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Kerek R, Martin N, Pourié G, Koziel V *et al.* Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J* 2012; **26**: 3980–3992.
15. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL *et al.* Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e553.
16. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 12474–12479.
17. Daval JL, Blaise S, Guéant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: E1.
18. Greene ND, Dunlevy LE, Copp AJ. Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. *Anat Embryol (Berl)* 2003; **206**: 185–191.
19. Burren KA, Savery D, Massa V, Kok RM, Scott JM, Blom HJ *et al.* Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 3675–3685.
20. Greene ND, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn* 2009; **29**: 303–311.
21. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; **109**: 1143–1148.
22. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **13**: 211–217.
23. Dziennis S, Alkayed NJ. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 2008; **19**: 341–361.
24. Conway G. STAT3-dependent pathfinding and control of axonal branching and target selection. *Dev Biol* 2006; **296**: 119–136.
25. He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA *et al.* The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem* 2005; **280**: 33426–33434.
26. Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourié C *et al.* Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol* 2009; **216**: 231–238.
27. Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2545–2552.
28. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000; **19**: 2628–2637.
29. Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 2002; **21**: 8404–8413.
30. Choi H J, Lee J H, Park SY, Cho JH, Han JS. STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells. *Exp Mol Med* 2009; **41**: 94–101.
31. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 2006; **24**: 857–864.
32. Cai B, Li J, Wang J, Luo X, Ai J, Liu Y *et al.* microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. *Stem Cells* 2012; **30**: 1746–1755.
33. Molina V, Medici M, Taranto MP, Font de Valdez G. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr* 2008; **62**: 162–168.
34. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron* 2009; **64**: 61–78.
35. Cheng X, Jin G, Zhang X, Tian M, Zou L. Stage-dependent STAT3 activation is involved in the differentiation of rat hippocampus neural stem cells. *Neurosci Lett* 2011; **493**: 18–23.
36. Murase S, Kim E, Lin L, Hoffman DA, McKay RD. Loss of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling during elevated activity causes vulnerability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2012; **32**: 15511–15520.
37. Zhou L, Too HP. Mitochondrial localized STAT3 is involved in NGF induced neurite outgrowth. *PLoS One* 2011; **6**: e21680.
38. Zorina Y, Iyengar R, Bromberg KD. Cannabinoid 1 receptor and interleukin-6 receptor together induce integration of protein kinase and transcription factor signaling to trigger neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2010; **285**: 1358–1370.
39. Lim CP, Cao X. Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31055–31061.
40. Åkerblom M, Sachdeva R, Barde I, Verp S, Gentner B, Trono D *et al.* MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *J Neurosci* 2012; **32**: 8879–8889.
41. Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveettil SV, Russo JJ *et al.* Characterization of small RNAs in aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 2009; **63**: 803–817.
42. Yamane K, Jinnin M, Etoh T, Kobayashi Y, Shimozono N, Fukushima S *et al.* Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J Mol Med (Berl)* 2013; **91**: 69–81.
43. Wang LL, Zhang Z, Li Q, Yang R, Pei X, Xu Y *et al.* Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Hum Reprod* 2009; **24**: 562–579.
44. Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen YW, Boshnjaku V *et al.* Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* 2010; **285**: 36922–36932.
45. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res* 2006; **66**: 10843–10848.
46. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011; **278**: 1598–1609.
47. Wang P, Chen L, Zhang J, Chen H, Fan J, Wang K *et al.* Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* 2013; e-pub ahead of print 21 January 2013; doi:10.1038/onc.2012.598.
48. Eves EM, Tucker MS, Roback JD, Downen M, Rosne MR, Wainer BH. Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4373–4377.
49. Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Pourié G, Koziel V, Nédélec E, Guéant JL *et al.* Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus* 2010; **20**: 949–961.
50. Wang Bx Yin BL, He B, Chen C, Zhao M, Zhang Wx *et al.* Overexpression of DNA damage-induced 45 α gene contributes to esophageal squamous cell cancer by promoter hypomethylation. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; **31**: 11.
51. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 2001; **49**: 369–378.
52. Wallin J, Wilting J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, Balling R. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 1994; **120**: 1109–1121.
53. Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 2006; **3**: 27–29.

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group*****. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

I.3. Synthèse de la publication

Les effets d'une carence péri-conceptionnelle et gestationnelle en donneurs de méthyles sur le métabolisme des monocarbones et ses principaux acteurs ont été étudiés en détails au laboratoire et largement décrits (Blaise et al., 2009; Blaise et al., 2007). En plus de l'accumulation de l'homocystéine, toxique et pro-oxydante, la carence s'accompagne d'une diminution du ratio SAM/SAH, index de capacité de méthylation cellulaire. En accord avec ces résultats précédents, nous avons mesuré dans notre étude une diminution de la méthylation golable de l'ADN, qui était en moyenne de 23,5% dans les cerveaux embryonnaires des animaux carencés au stade de 20 jours (E20) et de 40,4% dans le modèle cellulaire de progéniteurs neuronaux.

Un tel régime alimentaire carencé chez les mères est associé à un retard de croissance intra-utérin comme en témoigne la diminution du poids et de la taille des embryons. Ce retard du développement embryonnaire se manifeste au niveau cérébral, où elle est proportionnellement plus prononcée, avec une diminution du poids des cerveaux des embryons carencés comparés aux embryons issus des mères témoins. De plus, différentes régions cérébrales sont atrophiées, avec une réduction de l'épaisseur de certaines zones : couche CA1 de l'hippocampe, gyrus denté, zone subventriculaire). Cette atrophie persiste tout au long de la vie, étant donné qu'elle est retrouvée jusqu'au vieillissement (à l'âge de 450 jours). De manière générale, cette atrophie suggère une diminution de la prolifération cellulaire et/ou une augmentation de l'apoptose.

Dans nos deux modèles, animal et cellulaire, la carence en donneurs de méthyles conduit à une diminution de l'expression de Stat3 et des différents effecteurs de la voie de signalisation. L'activation de la voie Stat3 par phosphorylation des résidus Tyr^{705} et Ser^{727} est perturbée consécutivement à un défaut d'apport en vitamines B. Ceci reflète un effet de la carence sur les différentes kinases permettant la phosphorylation de la protéine Stat3. L'expression des protéines phosphorylées (donc activées) phospho-Erk 1/2, phospho-Src et phospho-p38 est réprimée, celle de phospho-JNK, qui régulerait négativement Stat3 (Lim and Cao, 1999) est augmentée, alors que la carence semble ne pas avoir d'effet sur la voie Akt. Cette perturbation de la phosphorylation empêche la translocation du facteur de transcription dans le noyau, entraînant une diminution de l'expression des gènes cibles régulés par la voie Stat3. Parmi les cibles, nous nous sommes intéressés particulièrement à celles impliquées dans la survie et l'apoptose. Les résultats montrent une augmentation des protéines pro-apoptotiques : Bax, caspase3 et caspase9 clivées (c'est-à-dire actives), associée à une diminution des protéines anti-apoptotiques : Bcl-2 et surtout Bcl-xL, cible directe de la voie Stat3. Ce déséquilibre s'accompagne d'une diminution drastique de la survie cellulaire. En effet, on observe une augmentation du clivage

endonucléolytique de l'ADN, caractéristique de la mort cellulaire par apoptose, que ce soit dans les cerveaux ou les progéniteurs carencés comparés aux témoins.

Dans le cadre d'une carence en donneurs de méthyles, la régulation épigénétique s'avère un des mécanismes essentiels qui pourraient expliquer certains effets néfastes. Les microARN sont des régulateurs épigénétiques post-transcriptionnels. Ils se lient sur une séquence du gène cible qui leur est complémentaire, provoquant sa dégradation ou inhibant sa traduction. Dans la littérature, Stat3 a été identifié comme cible de miR-124 (Krichevsky et al., 2006), microARN le plus abondant dans le système nerveux central embryonnaire et adulte (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2005). Dans notre étude, l'expression de miR-124 augmente significativement en situation de carence dans les cerveaux et les neurones hippocampiques, pouvant ainsi expliquer la diminution de Stat3. En effet, la transfection des cellules par siRNA dirigé contre miR-124 inhibe l'expression du microARN (de près de 90%) et compense en partie l'effet de la carence par restauration de l'expression de Stat3 et de sa phosphorylation. Par ailleurs, l'inhibition de miR-124 augmente spécifiquement la phosphorylation des kinases Erk 1/2 et Src. Enfin, l'évaluation du phénotype des cellules transfectées montre une amélioration notable de la différenciation neuronale, avec une restauration partielle de la croissance neuritique qui était perturbée suite à la privation en folates, une observation en accord avec le rôle de Stat3 sur la croissance des neurites (He et al., 2005).

I.4. Conclusions

En conclusion, notre étude montre un effet de la carence en donneurs de méthyles sur la voie de signalisation Stat3, une des cibles de miR-124 qui a été récemment rapporté comme étant régulé par méthylation (Wang et al., 2013a). Ce processus fait intervenir un effet direct sur deux des kinases responsables de la phosphorylation de Stat3, p-Erk1/2 et p-Src. Ceci est en accord avec le fait que Erk 1/2 a été récemment identifié comme une cible de miR-124 (Yamane et al., 2013), tandis que nous apportons la première démonstration de la régulation négative de Src par miR-124. La perturbation de cette voie de survie pourrait expliquer en partie la perte de la différenciation neuronale et le retard du développement embryonnaire et cérébral dans le cadre d'un régime maternel déficient en vitamine B12 et folates.

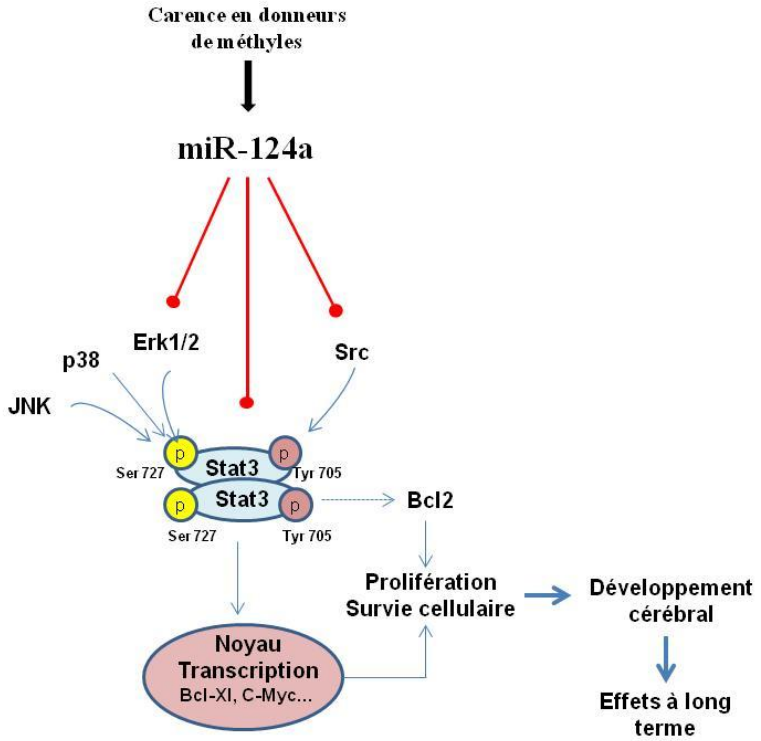


Figure 23 : Schéma récapitulatif des différentes interactions susceptibles d'expliquer les conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la régulation de la voie Stat3 via miR-124 et leur impact sur le développement cérébral.

Ces résultats nous ont conduits à caractériser le développement cérébral embryonnaire dans notre modèle de carence précoce en donneurs de méthyles, et nous avons analysé la prévalence des signes évocateurs d'anomalie de fermeture du tube neural.

II. Perspectives de travail

II.1. Anomalies de fermeture du tube neural postérieur

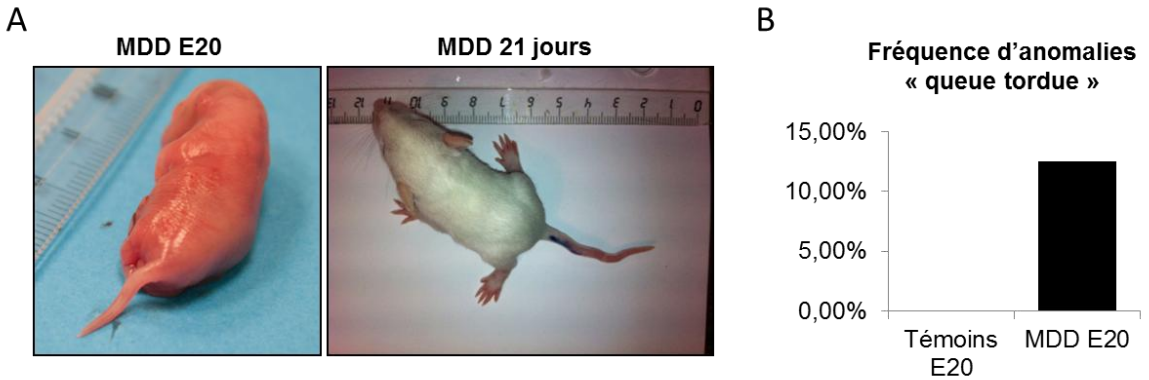


Figure 24 : Anomalies de fermeture du tube neural postérieur.
(A) Visualisation du retard de fermeture du tube neural postérieur chez les animaux carencés associé au phénotype « queue tordue », évocateur de spina-bifida. (B) Fréquence de présence de queues tordues chez les E20 témoins et carencés en donneurs de méthyles (MDD pour *methyl donor deficiency*), n=60 (Témoins) et n= 73 (Carencés).

La carence en donneurs de méthyles est ainsi associée à des caractéristiques de perturbations développementales, notamment des signes de retard de fermeture du tube neural postérieur. Une étude récente avait rapporté un lien entre les perturbations d'expression de Hes1/Mash1, en relation avec des défauts de développement du tube neural postérieur, et des mécanismes épigénétiques folate-dépendants (Ichi et al., 2010). L'expression transcriptionnelle du gène Hes1 implique la liaison de Dll1 (*delta-like 1*) à son récepteur Notch. La voie Notch est impliquée dans le maintien du renouvellement des cellules souches neurales et interagit avec de nombreux acteurs influençant la balance prolifération/différenciation (Nagao et al., 2007).
Ainsi, ces observations nous ont conduits à étudier les conséquences de la carence en donneurs de méthyles sur la voie Notch et ses effecteurs. Les profils d'expression des protéines ont été analysés par Western Blot sur les progéniteurs neuronaux *in vitro* et les résultats obtenus sont montrés sur la figure 25.

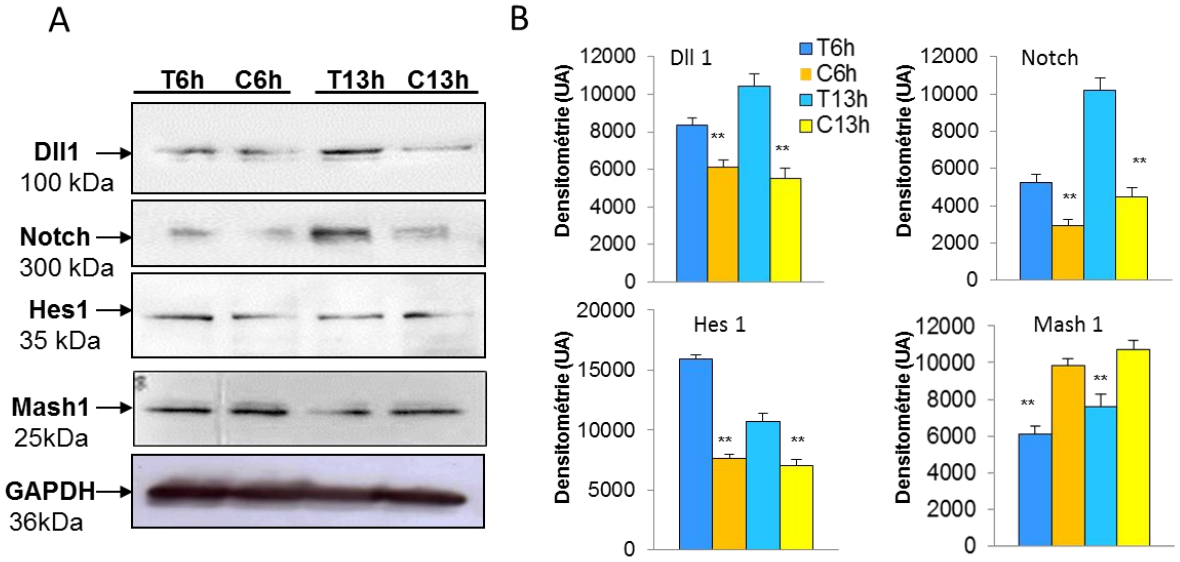


Figure 25 : Effets de la carence sur la voie de signalisation Notch.
(A) Expression en Western Blot des protéines Dll1, Notch1, Hes1, Mash1 et GAPDH dans les cellules H19-7 témoins (T) et carencées (C) à 6h et 13h de différenciation. (B) Densitométries des WB normalisés à la GAPDH, dans les cellules H19-7 témoins (T) et carencées (C) à 6h et 13h de différenciation. **p<0,01, ANOVA.

Ces résultats montrent l'inactivation de la voie Notch dans les conditions de carence en donneurs de méthyles. La diminution de l'expression protéique de Notch1 et son ligand Dll1 produit à son tour une diminution de l'expression de Hes1, aboutissant à une expression prématurée de Mash1 et une induction inappropriée de la différenciation des progéniteurs via l'expression de gènes proneuraux. Ce déséquilibre entre prolifération et différenciation pourrait expliquer les anomalies au niveau intracérébral avec la diminution des épaisseurs des couches de différentes régions.

II. 2. Anomalies de fermeture du tube neural antérieur

Dans notre modèle animal, nous avons également constaté la survenue d'autres anomalies cérébrales chez les embryons carencés en donneurs de méthyles. Ainsi, nous avons observé une plus grande fréquence d'ouverture de la suture médiane du cervelet et des hémisphères cérébraux chez les embryons carencés de 20 jours par rapport aux témoins (Figure 26, différence significative à p=0.0015, test du Chi²), qui évoque une anomalie du développement cérébral ou un retard de fermeture du tube neural antérieur (Copp et al., 2003).

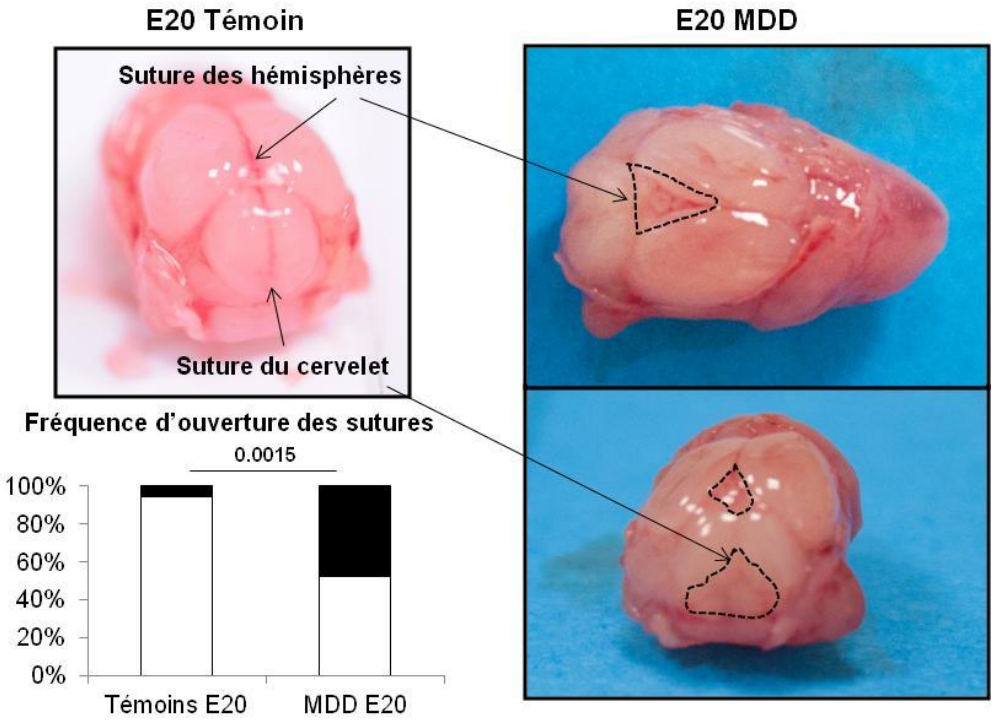


Figure 26 : Anomalies de fermeture du tube neural antérieur.
Visualisation du retard de fermeture du tube neural antérieur au niveau de la suture du cervelet et des hémisphères cérébraux chez les animaux carencés : la ligne de suture est visible mais n'est pas complète dans sa partie postérieure (zone en pointillé). Fréquence de présence des sutures fermées et ouvertes chez les E20 témoins et carencés (MDD).

Du point de vue mécanistique, Mlin41/Trim71 est indispensable au développement cérébral et son expression est nécessaire à l'initiation et à la fermeture du tube neural antérieur au niveau de la jonction entre le mésencéphale et le rhombencéphale (Maller Schulman et al., 2008). Nos résultats montrent une diminution significative de l'expression de la protéine Trim71 dans les deux modèles de carence (figure 27).

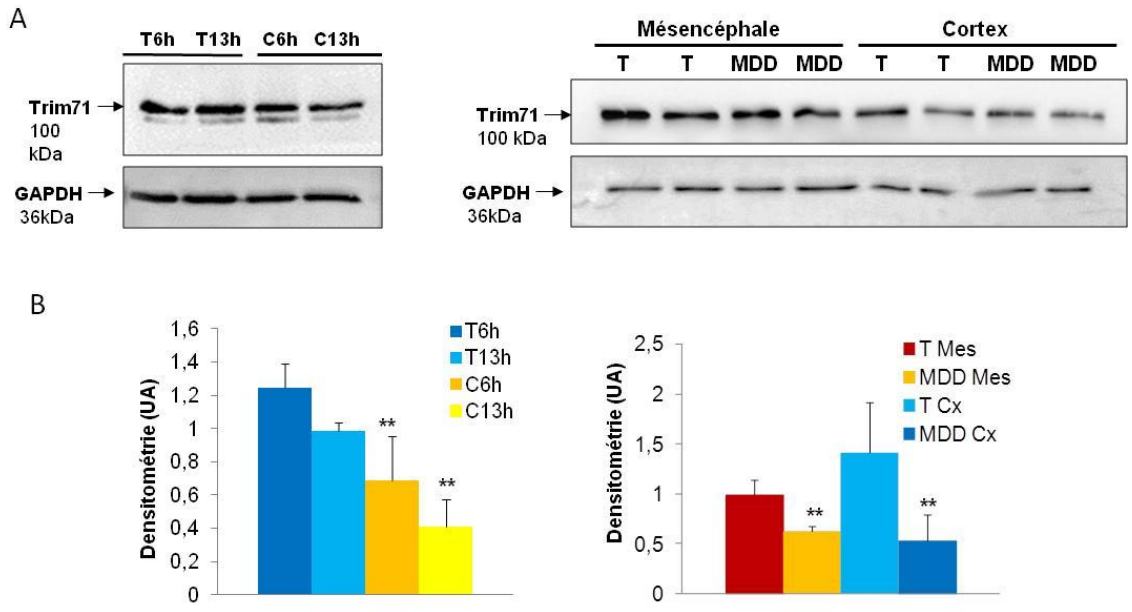


Figure 27: Effet de la carence sur l'expression de la protéine Mlin41/Trim71.
(A) Expression de la protéine Trim71 et de la GAPDH en WB dans les cellules témoins (T) et carencées (C) à 6h et 13h de différenciation et dans les mésencéphales et cortex d'embryons E20 témoins (T) et carencés (MDD). **(B)** Densitométries des WB de Trim71 normalisées à la GAPDH, dans les cellules H19-7 témoins (T) et carencées (C) et dans les mésencéphales et cortex des E20 témoins (T) et carencés (MDD). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ANOVA.

Notre travail montre la survenue d'anomalies visibles au niveau morphologique, suite à la carence en donneurs de méthyles. Bien que certains gènes et voies de signalisation qui pourraient contribuer à la survenue de ces anomalies ont été identifiés, les mécanismes mis en jeu ne sont pas complètement définis. Comme pour la voie Stat3, ceux-ci pourront impliquer d'autres régulateurs épigénétiques de la famille des microARN. En effet, les études bibliographiques montrent que l'expression des facteurs de transcription bHLH (Hes1, Mash1…), qui font partie des gènes régulant le programme neurogénique, est régulée par des mécanismes épigénétiques, notamment au niveau post-transcriptionnel par l'intervention de différents miRs, parmi lesquels miR-34 (Shookhoff and Gallicano, 2010). De la même manière, Let-7a est impliqué spécifiquement dans les défauts de fermeture du tube neural .Ce microARN réprime la protéine Mlin41/Trim71 nécessaire à la fermeture du tube neural antérieur (Maller Schulman et al., 2008). Ainsi, pour la suite de ces travaux, nous étudierons les protéines effectrices des différentes voies modifiées par la carence ainsi que les mécanismes épigénétiques en amont qui sont susceptibles d'induire leur dérégulation en réponse à la carence.

Deuxième partie : Etude des effets d'une carence en donneurs de méthyles sur la plasticité synaptique et le vieillissement cérébral: Homocystéinylation des protéines neuronales

I. Publication # 2: Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells

Running Title: Altered neuroprogenitor fate by folate deficit

The FASEB Journal (2012)

Nassila Akchiche[1,2], Carine Bossenmeyer- Pourié*[1,2] Racha Kerek[1,2], Nicolas Martin[1,2], Grégory Pourié[1,2], Violette Koziel[1,2], Déborah Helle[1,2], Jean-Marc Alberto[1,2], Sandrine Ortiou[1,2], Jean-Michel Camadro[4], Thibaut Léger[4], Jean-Louis Guéant[1,2,3], Jean-Luc Daval*[1,2]

[1]Inserm U954, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [2]Nancy Université, Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [3]IRCCS, Oasi Maria S.S., Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina (EN), Italy; [4]Institut Jacques Monod, CNRS-Université Paris Diderot, 75205 Paris, France. *authors with equal contribution

Corresponding author: Jean-Luc DAVAL, PhD, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Phone: (33) 3 83 68 32 82 ; Fax : (33) 3 83 68 32 79 ; e-mail: jean-luc.daval@inserm.fr

I.1. Objectifs de l'étude

Les études de santé publique et expérimentales ont identifié l'implication du métabolisme des micronutriments dans le développement cérébral. Plus particulièrement, les folates (vitamine B9) constituent un micronutriment essentiel au niveau du cerveau, dont la carence peut conduire à une atrophie de l'hippocampe associée à des déficits cognitifs et à la perturbation de l'homéostasie neuronale (Blaise et al., 2007; Daval et al., 2009; Ellison et al., 2004; van der Put et al., 2001). Il a également été montré que la déficience en folates inhibe la prolifération des cellules neuronales à la fois in vivo et in vitro, avec des neurones nouvellement générés plus sensibles aux dommages oxydatifs et à l'apoptose (Kruman et al., 2002; Kruman et al., 2005; Zhang et al., 2008b). L'homocystéine s'accumule lors d'une carence en folates et peut alors promouvoir le stress oxydant (Perna et al., 2003; Ronco et al., 2005). Outre les effets neurotoxiques de l'homocystéine dans les cellules via les processus d'excitotoxicité, de stress cellulaire et du réticulum endoplasmique, la déficience en folates affecte le rapport SAM/SAH qui correspond à l'index de méthylation, influençant directement la synthèse de petites molécules méthylées ainsi que les régulations épigénétiques en lien avec la méthylation de l'ADN et des histones. Ainsi, la déficience en folates pourrait exercer ses effets néfastes par plusieurs mécanismes impliquant notamment des processus de méthylation. Pour notre part, nous avons choisi d'étudier les effets d'une déficience en folates sur la prolifération, la différenciation, la survie et la plasticité synaptique de progéniteurs neuronaux (lignée H19-7). L'étude s'est principalement focalisée sur l'investigation des mécanismes moléculaires impliqués ainsi que sur l'altération fonctionnelle des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire et la neuroplasticité.

I.2. Manuscrit

The FASEB Journal article fj.12-205757. Published online June 19, 2012.

Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells

Nassila Akchiche,[*,†] Carine Bossenmeyer-Pourié,[*,†,1] Racha Kerek,[*,†] Nicolas Martin,[*,†] Grégory Pourié,[*,†] Violette Koziel,[*,†] Déborah Helle,[*,†] Jean-Marc Alberto,[*,†] Sandrine Ortiou,[*,†] Jean-Michel Camadro,[§] Thibaut Léger,[§] Jean-Louis Guéant,[*,†,‡] and Jean-Luc Daval[*,†,1,2]

[*]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U954, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [†]Nutrition-Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux (NGERE), Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [‡]Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Oasi Maria S.S., Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, Troina, Italy; and [§]Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)–Université Paris Diderot, Paris, France

ABSTRACT **Despite the key role in neuronal development of a deficit in the methyl donor folate, little is known on the underlying mechanisms. We therefore studied the consequences of folate deficiency on proliferation, differentiation, and plasticity of the rat H19-7 hippocampal cell line. Folate deficit reduced proliferation (17%) and sensitized cells to differentiation-associated apoptosis (+16%). Decreased production (−58%) of *S*-adenosylmethionine (the universal substrate for transmethylation reactions) and increased expression of histone deacetylases (HDAC4,6,7) would lead to epigenomic changes that may impair the differentiation process. Cell polarity, vesicular transport, and synaptic plasticity were dramatically affected, with poor neurite outgrowth (−57%). Cell treatment by an HDAC inhibitor (SAHA) led to a noticeable improvement of cell polarity and morphology, with longer processes. Increased homocysteine levels (+55%) consecutive to folate shortage produced homocysteinylation, evidenced by coimmunoprecipitations and mass spectrometry, and aggregation of motor proteins dynein and kinesin, along with functional alterations, as reflected by reduced interactions with partner proteins. Prominent homocysteinylation of key neuronal proteins and subsequent aggregation certainly constitute major adverse effects of folate deficiency, affecting normal development with possible long-lasting consequences.—Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Kerek, R., Martin, N., Pourié, G., Koziel, V., Helle, D., Alberto, J.-M., Ortiou, S., Camadro, J.-M., Léger, T., Guéant, J.-L., Daval, J.-L. Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J.* 26, 000–000 (2012). www.fasebj.org**

Key Words: homocysteine · apoptosis · histone deacetylases · motor proteins · aggregation

Brain development is highly sensitive to nutritional conditions. A large body of evidence supports the hypothesis that maternal malnutrition can affect the fetal brain and predispose the offspring to a wide range of pathologies (1, 2). The micronutrient folate (vitamin B_9) is essential for brain development and neuronal homeostasis (3, 4), and folate deficiency is one of the commonest vitamin deficiencies worldwide, especially in pregnant women. In the methionine cycle of the 1-carbon metabolism, the metabolic product of folate, 5-methyltetrahydrofolate, provides a methyl group to convert homocysteine to methionine by the vitamin B_{12}-dependent methionine synthase (5). A deficiency in folate, vitamin B_{12}, or both produces an elevation of homocysteine and a decrease of the *S*-adenosylmethio-

Abbreviations: 5-aza, 5-aza-cytidine; CBS, cystathionine β-synthase; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; HDAC, histone deacetylase; Map2, microtubule-associated protein 2; MS, mass spectrometry; MTHFR, methylene-tetrahydrofolate reductase; MTR, methionine synthase; PLA, proximity ligation assay; PP2Ac, catalytic protein phosphatase 2A; PSD-95, postsynaptic density-95 kDa; SAH, *S*-adenosylhomocysteine; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid; SAM, *S*-adenosylmethionine; SV40, simian virus 40; VGluT2, vesicular glutamate transporter 2

[1] These authors contributed equally to this work.

[2] Correspondence: Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. E-mail: jean-luc.daval@inserm.fr

doi: 10.1096/fj.12-205757

This article includes supplemental data. Please visit *http://www.fasebj.org* to obtain this information.

nine/*S*-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio, known as the methylation index (6–8). This was associated with hippocampus atrophy, rarefaction of microvasculature, neuronal and glial apoptosis, and imbalanced proliferation and differentiation of neuronal cells, as well as cognitive impairments in rodents (6, 7, 9, 10). Notably, folate deficiency was linked to various developmental pathologies, including neural tube defects (3, 11). It was shown to inhibit the proliferation of neuronal cells both *in vitro* and *in vivo*, while newly generated neurons were more prone to oxidative damage and apoptosis (12–14). Independently of folate deprivation, exposure to high concentrations of homocysteine exerts neurotoxic effects through mechanisms that include reticulum stress and oxidative stress, as well as excitotoxicity, leading to neurological disabilities (15–18). Since SAM is the universal substrate of transmethylation reactions, reduction of the SAM/SAH ratio directly influences the synthesis of small methylated molecules and the epigenomic mechanisms related with DNA and histone methylations. Beyond this, most of the known cellular effects triggered by folate deficiency cannot provide a satisfactory mechanistic explanation for the contrasted results of interventional trials (19–21), and cellular and molecular events that definitely precipitate neuronal defects need to be better understood. Thus the present study aimed to investigate the consequences of folate deficiency on the fate of hippocampal neurons by using the rat H19-7 embryonic cell line (22, 23), with a special focus on the molecular mechanisms underlying proliferation and differentiation, survival, and the alteration of functional proteins involved in synaptic trafficking and plasticity.

MATERIALS AND METHODS

Cultures

The H19-7/IGF-IR cell line (ATCC CRL-2526; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was conditionally immortalized from embryonic day 17 rat hippocampi with a temperature-sensitive simian virus 40 (SV40) large-tumor antigen (22). H19-7 cells were seeded at a density of 3×10^5 cells/well in 24-well plates (Falcon; Dutscher, Brumath, France) precoated with poly-L-lysine in high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin, 50 U/ml streptomycin, 2 mM glutamine, and 1 mM sodium pyruvate, as described previously (23). For homogeneity, the same lot of serum was used throughout all experiments. Cells were allowed to proliferate at the temperature of 33°C in 95% air/5% CO_2. Selection was maintained with 200 μg/ml G418. Folate deficiency was induced by using DMEM lacking vitamin B_9 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After 24 h, cells were washed and shifted to the nonpermissive temperature (39°C) for induction of their differentiation in high-glucose-DMEM (with or without vitamin B_9) containing 1% fetal calf serum, N2 supplement (Invitrogen), and 0.11 mg/ml sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mg/ml transferrin, 20 nM progesterone, 0.1 mM putrescine, and 30 nM sodium selenite.

For coculture experiments, hippocampal primary cultured neurons were prepared from embryonic day 19 Wistar rat fetuses (Charles River, l'Arbresle, France), as previously reported (23). The day preceding coculture, H19-7 cells kept at 33°C in their proliferation medium were incubated for 24 h with 20 μM bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cells were then dissociated in the presence of 0.05% trypsin (Invitrogen) and seeded on primary cultured neurons at 5×10^4 cells/well. Cocultures were maintained at 37°C for 48 h in the medium used for H19-7 differentiation, with or without folate.

When used, 5-aza-cytidine (5-aza; a DNA methyltransferase inhibitor; Sigma-Aldrich) or suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; a histone deacetylase inhibitor; Aton Pharma, Madison, NJ, USA) were added to the differentiation medium and kept until 13 h of differentiation. In some experiments, to mimic endogenous homocysteine accumulation, cells were treated with 100 μM homocysteine thiolactone (Sigma-Aldrich) at the time of induction of differentiation.

One-carbon metabolism

At 13 h after induction of differentiation, cultured cells were harvested and lysed at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich), and proteins were quantified according to Bradford (24). Concentrations of folate and vitamin B_{12} were monitored by radioisotope dilution assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) according to Chery *et al.* (25). Homocysteine concentrations were measured by fluorescent polarization immunoassay (IMX System; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA; ref. 26).

Methionine synthase (MTR) and cystathionine β-synthase (CBS) activities were monitored on samples corresponding to 400 μg of total proteins, as described by Blaise *et al.* (27). Methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity was measured as reported by Kutzbach and Stokstad (28). The concentrations of SAM and SAH were measured in cell extracts by high-performance liquid chromatography and by using a range of standards, as described by Blaise *et al.* (27).

Cell viability and migration

Cell viability was assessed by the measurement of intracellular ATP using the CellTiter-Glo luminescent viability assay (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), as reported by Akchiche *et al.* (23). Mitochondrial membrane permeability was evaluated by the MitoCapture assay kit (Calbiochem; VWR International, S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France), as described by Akchiche *et al.* (23). The assay is based on the disruption of the mitochondrial inner-membrane electrochemical potential using a fluorescent cationic dye.

The presence of apoptosis was assessed in cells previously fixed in 4% paraformaldehyde by the Apostain method, using monoclonal antibody to single-strand DNA (F7-26 from calf thymus ssDNA; AbCys SA, Paris, France) after DNA denaturation by heating at 56°C for 30 min in the presence of 50% formamide, as originally reported by Frankfurt and Krishan (29). Cells were incubated for 30 min at 37°C with Apostain F7-26 antibody (1:10; AbCys). They were then rinsed and incubated with AlexaFluor-conjugated anti-mouse IgM (1:750; Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France), and cell nuclei were counterstained by the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.5 μg/ml, Sigma-Aldrich).

For the monitoring of cell migration, cells were plated at a density of 5×10^5 cells/well in 6-well plates and were allowed to proliferate at the permissive temperature. After 24 h, a scratch was produced in the middle of the well, and half of the cells were removed with a rubber policeman (30). Cells were then observed and photographed every day, and the average distance of migration was monitored by using Cell Analysis software (Olympus, Rungis, France).

Immunohistochemistry

Cells cultured on poly-L-lysine-precoated glass coverslips were washed, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), as reported by Akchiche *et al.* (23). Nonspecific binding sites were blocked in PBS containing 1% BSA, and incubation was performed overnight with an antibody against one of the following proteins: NeuroD (goat polyclonal, 1:300; Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), NeuN (mouse monoclonal, 1:100; Chemicon International; Millipore, Guyancourt, France), vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2; mouse monoclonal, 1:200; Chemicon International), synapsin I (rabbit polyclonal, 1:100; Calbiochem), synapsin II (rabbit polyclonal, 1:100; Abcam, Paris, France), postsynaptic density-95 kDa (PSD-95; rabbit polyclonal, 1:200; Abcam), synaptotagmin I (lumenal domain, clone 604.2, mouse monoclonal, 1:50; Synaptic Systems, Göttingen, Germany), kinesin, heavy chain, aa 420-445, clone H2 (mouse monoclonal, 1:200; Millipore), dynein 74 kDa intermediate chains (mouse monoclonal, 1:200; Millipore), Map2 (rabbit polyclonal, 1;200; Millipore), α-tubulin (rabbit polyclonal, 1:200; Millipore), acetylated α-tubulin (mouse monoclonal, 1:200; Abcam), β-tubulin (mouse monoclonal, 1;200; Abcam), and homocysteine (rabbit polyclonal, 1:200; Millipore).

After a washing step, immunoreactivity was assessed by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1 h at 25°C (1:1000; Molecular Probes). Control experiments were conducted by omitting the primary antibody. Immunofluorescence visualization, image acquisition (×20 and ×60 magnification), and unbiased cell counts in randomly selected fields were performed with a BX51WI microscope (Olympus) coupled to an Olympus camera (U-CMAD3) and analyzed by Cell Analysis software (Olympus). Labeled cells were calculated as a percentage of total cells after DAPI counterstaining.

Western blotting

Western blot analyses were performed using standard procedure with chemiluminescence using the ECL system (Amersham Biosciences, Orsay, France), as previously detailed (23). Antibodies against the following proteins were used: MTR (goat polyclonal, 1:500, Abcam), MTHFR (mouse monoclonal, 1:3000; Interchim, Montluçon, France), total catalytic protein phosphatase 2A (PP2Ac; mouse monoclonal, 1:1000; Cell Signaling Technology, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France), cyclin E (rabbit polyclonal, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology), Cdk-2 (goat polyclonal, 1:3000; Santa Cruz Biotechnology), cleaved caspase-3, Asp175 (rabbit polyclonal, 1:2000; Cell Signaling Technology), cleaved caspase-9, Asp353 (rabbit polyclonal, 1:2000; Cell Signaling Technology), histone deacetylase 4 (HDAC4, mouse monoclonal, 1:500; Abcam), HDAC6 (rabbit monoclonal, 1:500; Novus Biologicals; Interchim), HDAC7 (rabbit monoclonal, 1:500; Cell Signaling Technology), NeuroD (goat polyclonal, 1:500; Santa Cruz Biotechnology), kinesin (1:1000), dynein (1:1000), Map2 (1:1000), α-tubulin (1:1000), acetylated α-tubulin (1:1000), β-tubulin (1:1000), and homocysteine (1:750). GAPDH (mouse monoclonal, 1:1000; Abcam) was used as an internal standard. Polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 1 h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1:5000; Molecular Probes). Quantity One software, associated with the VersaDoc imaging system (Model 1000; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), was used to quantify signals.

Protein interactions

To assess homocysteine interaction with proteins, coimmunoprecipitation experiments were performed by means of a Pierce coimmunoprecipitation commercial kit (Thermo Scientific Pierce; Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). This optimized method enables isolation of native protein complexes from a lysate by directly immobilizing purified antibodies onto an agarose support and was shown to prevent antibody interference (31). Dynein coimmunoprecipitation was analyzed by mass spectrometry (MS). Tryptic peptides were obtained from immunoprecipitated proteins as described by Ren *et al.* (32) and separated using a nanochromatography system (Easy nLC, Proxeon, Odense, Denmark) connected online to a LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher). Separation conditions were as in Ren *et al.* (32). MS spectra were acquired on the Orbitrap analyzer at resolution mode $r = 30{,}000$. After each MS spectrum, an automatic selection of the 20 most intense precursor ions was activated with 15-s dynamic exclusion delay to acquire MS/MS spectra on the LTQ Velos analyzer, using CID fragmentation mode at 35% relative resonant activation energy for 40 ms. Spectra were analyzed using Mascot 2.3.2 (Matrix Science, Boston, MA, USA). A search was performed against a nonredundant database of rodent protein sequences from Swiss-Prot (http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html) to which corresponding random decoy entries were added. Mascot was run in MS/MS Ion search mode with the following parameter settings: no fixed modification, variable modifications (homocysteinylation on lysine and homocysteinylation on cysteine), precursor mass tolerance 10 ppm, fragment ions mass tolerance 0.6 Da, 2 missed cleavages, and trypsin as digestion enzyme. Additional filtering was applied after protein and peptide identification for further analysis, using the following criteria: for single and multiple peptide hit proteins, each Mascot ion score ≥30. Such criteria allowed a false-positive rate <1% for each injection, based on numbering of identified decoy entries.

In addition, the proximity ligation assay (PLA; Duolink *in situ* PLA reagents; Olink Bioscience; Eurogentec, Angers, France) was used to depict and quantify protein interactions *in situ*. A pair of oligonucleotide labeled secondary antibodies (PLA probes) generates a signal only when the two probes have bound in proximity. The signal from each detected pair is visualized as an individual fluorescent dot. The PLA signals can be counted and assigned to a specific subcellular location based on microscopy images (Olympus BX51WI microscope with BlobFinder freeware; Centre for Image Analysis, Uppsala University, Uppsala, Sweden).

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was purified using the RNeasy lipid tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR was performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and the LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Manheim, Germany). Specific amplifications were performed using as primers: synapsin I forward 5′-GAGGCCCTCCACAACCAG-3′, reverse 5′-CTGCTGTGGGACTTGGTAGG-3′ (expected product size 147 bp); and synapsin II forward 5′-CATGGGTGTTTGCTCAGATG-3′, reverse 5′-TCTCTCGGTGATTGGGGTAG-3′ (expected product sizes 147 bp and 96 bp, respectively). Quantification was performed with ribosomal protein S29 (RPS29) as an internal standard with the following primers: forward 5′-ATGGGTCACCAGCAGCTCTA-3′ and reverse 5′-CATGTTCAGCCCGTATTTGC-3′ (expected product size 114 bp). Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products. Temperature cycling for both synapsins was 15 min at 95°C

followed by 50 cycles consisting of 94°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s. Temperature cycling for RPS29 run was 15 min at 95°C followed by 50 cycles of 94°C for 10 s, 55°C for 20 s, and 72°C for 15 s. Results were expressed as arbitrary units by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of synapsin I or synapsin II mRNAs and internal standard by using the RelQuant software (Roche Diagnostics).

Statistical analysis

Data were analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkeley, CA, USA). They were compared by using 1-way ANOVA with Fisher's test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Folate deficiency affects the 1-carbon metabolism in hippocampal cells and is associated with elevated homocysteine

To validate the experimental model, concentrations of folate, vitamin B_{12}, and homocysteine were measured in both control and folate-deficient cells. As expected, concentrations of vitamin B_9 were considerably reduced in deficient cells (**Fig. 1**), despite the presence of B_9 in fetal calf serum (30.0±6.4 nM, finally corresponding to 0.25±0.01 nM in the culture medium). In parallel, the level of vitamin B_{12} was slightly elevated in neurons at 13 h of differentiation, and homocysteine amounts were increased by >2-fold. Homocysteine can be either remethylated to methionine by MTR with the participation of MTHFR or metabolized by CBS through the transsulfuration pathway, but CBS activity was not detected in H19-7 cells, in contrast to liver HepG2 cells. In vitamin B_9-deficient cells, SAM concentration and MTHFR activity were significantly lower, while MTR activity was maintained. According to Western blot analyses, the expression of the 2 enzymes was reduced, but changes were not statistically significant at 13 h (Fig. 1*J*, *K*). Finally, the methylation index reflected by the SAM/SAH ratio dropped in folate-deficient neurons (Fig. 1*I*).

Folate deficiency inhibits proliferation and migration of hippocampal cells and makes them more sensitive to differentiation-associated apoptosis

The effects of folate deprivation were investigated independently on progenitor proliferation, migration, and differentiation processes.

At the permissive temperature of 33°C, the rate of proliferation in folate-deficient cells was reduced by 17% starting from the third day of culture (**Fig. 2*A***). Concomitantly, the capacity of migration was reduced by 50% and then remained lower than controls (Fig. 2*B*). Following induction of differentiation, cell viability gradually decreased under control conditions (Fig. 2*C*), and the percentage of Apostain-positive cells, indicative of apoptosis-associated single-strand DNA, increased with time (Fig. 2*D*). A progressive disruption of mitochondrial membrane potential was recorded in cells after induction of differentiation (Fig. 2*E*). Folate

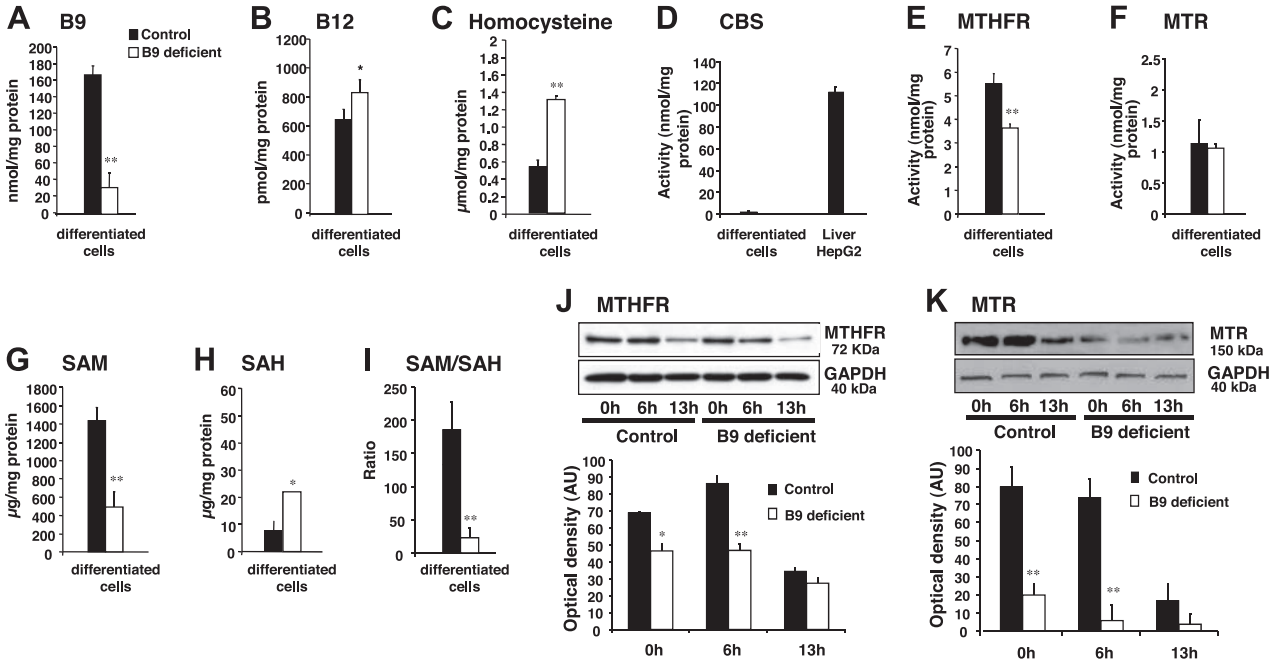


Figure 1. Folate deficiency-associated changes in main determinants of the 1-carbon metabolism in H19-7 cells. *A–I*) Determinants of homocysteine concentration 13 h after induction of differentiation: vitamin B_9, (*A*), vitamin B_{12}, (*B*), homocysteine (*C*), CBS (*D*), MTHFR (*E*), MTR (*F*), SAM (*G*), SAH (*H*), and SAM/SAH (*I*). *J, K*) Western blot analysis of the 2 key enzymes related to homocysteine remethylation, MTHFR (*J*) and MTR (*K*), after induction of differentiation in control and folate-deficient cells. Data, normalized to GAPDH, are reported as means ± SD. AU, arbitrary unit. All values were obtained from 3 separate experiments and by using ≥3 different wells for each. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control.

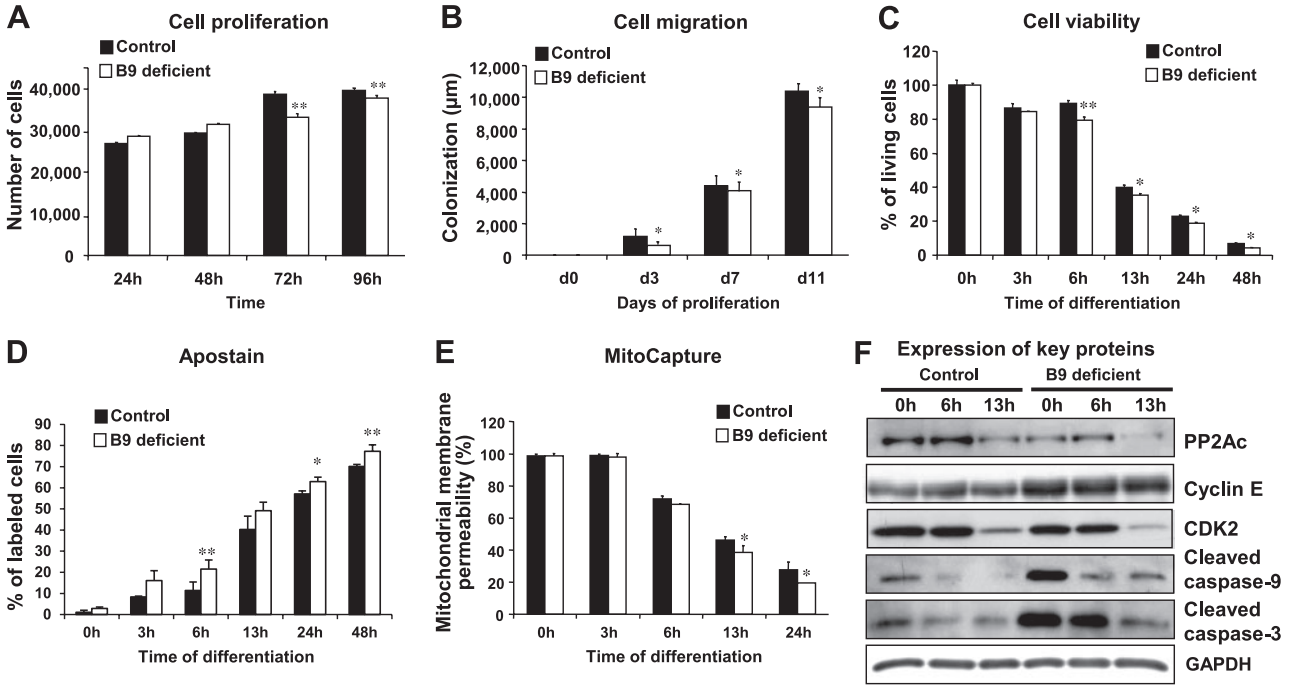


Figure 2. Effects of folate deficiency on proliferation, migration, and differentiation-associated death of hippocampal cells. *A*) Temporal changes in cell proliferation reflected by the number of cells. *B*) Temporal changes in cell migration reflected by the colonization by progenitors of the part of the well where cells were previously removed, as described in Materials and Methods. Average distance of migration was assessed by using Cell Analysis software (Olympus). *C*) Temporal changes in cell viability by using the CellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega). Other methods, *i.e.*, MTT and trypan blue, gave similar results (not shown). *D*) Percentage of apoptotic cells reflected by Apostain immunostaining. *E*) Changes in the mitochondrial membrane potential depicted by the MitoCapture detection kit (Calbiochem). *F*) Temporal evolution of the expression of various key proteins assessed by Western blot after induction of differentiation in control and folate-deficient cells. Corresponding quantifications by densitometric analyses are provided in Supplemental Fig. S1. All values were obtained from 3 separate experiments and by using ≥3 different wells for each protein. Data are reported as means ± SD. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control.

deficiency significantly augmented cell apoptosis. The loss of mitochondrial membrane potential was higher in folate-deficient progenitors at 13 and 24 h of differentiation, when a significant increase in the number of Apostain-positive cells was observed. Also, the expression of active caspase-9 and caspase-3 was highly stimulated in folate-deficient cells (Fig. 2*F*).

PP2Ac expression was high when differentiation was induced and then decreased 13 h later (Fig. 2*F*). PP2Ac was dramatically repressed in deficient cells. Differentiation of progenitors in control conditions was associated with a steady expression of cyclin E and a concomitant decreased expression of cdk2 in neurons at 13 h of differentiation. Folate deficiency enhanced cyclin E expression in the first hours of differentiation without changes in cdk2 levels. Conversely, cdk2 expression was repressed at 13 h in deficient cells, suggesting an arrest of the cell cycle, while cyclin E levels remained high. Quantitative changes in protein amounts are provided in Supplemental Fig. S1.

Folate deficiency alters differentiation of hippocampal cells

As compared with control conditions, folate deficit did not modify the expression pattern of NeuroD (immature neurons) but slightly increased the proportion of NeuN-positive cells (mature neurons) at 24 h (**Fig. 3*A***). Analysis of cell morphology revealed that folate deficiency was associated with a lesser characteristic neuronal (stellate) morphology, and impaired differentiation was further suggested by a significant reduction of cell processes (Fig. 3*A*). Further phenotypic characterization of cells showed that differentiated neurons were glutamatergic both in control and in deficiency conditions, as shown by the expression of VGluT2, but the presence of VGluT2 in folate-deficient cells was dramatically reduced in neurites (see **Fig. 7** for illustration). Whereas NeuroD expression was more elevated in deficient cells at 13 h postdifferentiation, its localization was strikingly restricted to the perinuclear area (Figs. 3*B*, *C* and Supplemental Fig. S2).

Folate deficiency alters microtubule-related proteins

Amounts of microtubule proteins β-tubulin, α-tubulin, and particularly acetylated α-tubulin, which are normally ideally suited as tracks to deliver vesicles and organelles to distal cellular regions, as well as amounts of microtubule-associated protein 2 (Map2), were significantly reduced in vitamin B_9-deficient cells at 13 h (Fig. 3*D* and Supplemental Fig. S2). Interestingly, folate deficiency was associated with reduced levels of the mature components Map2A/B, along with higher levels

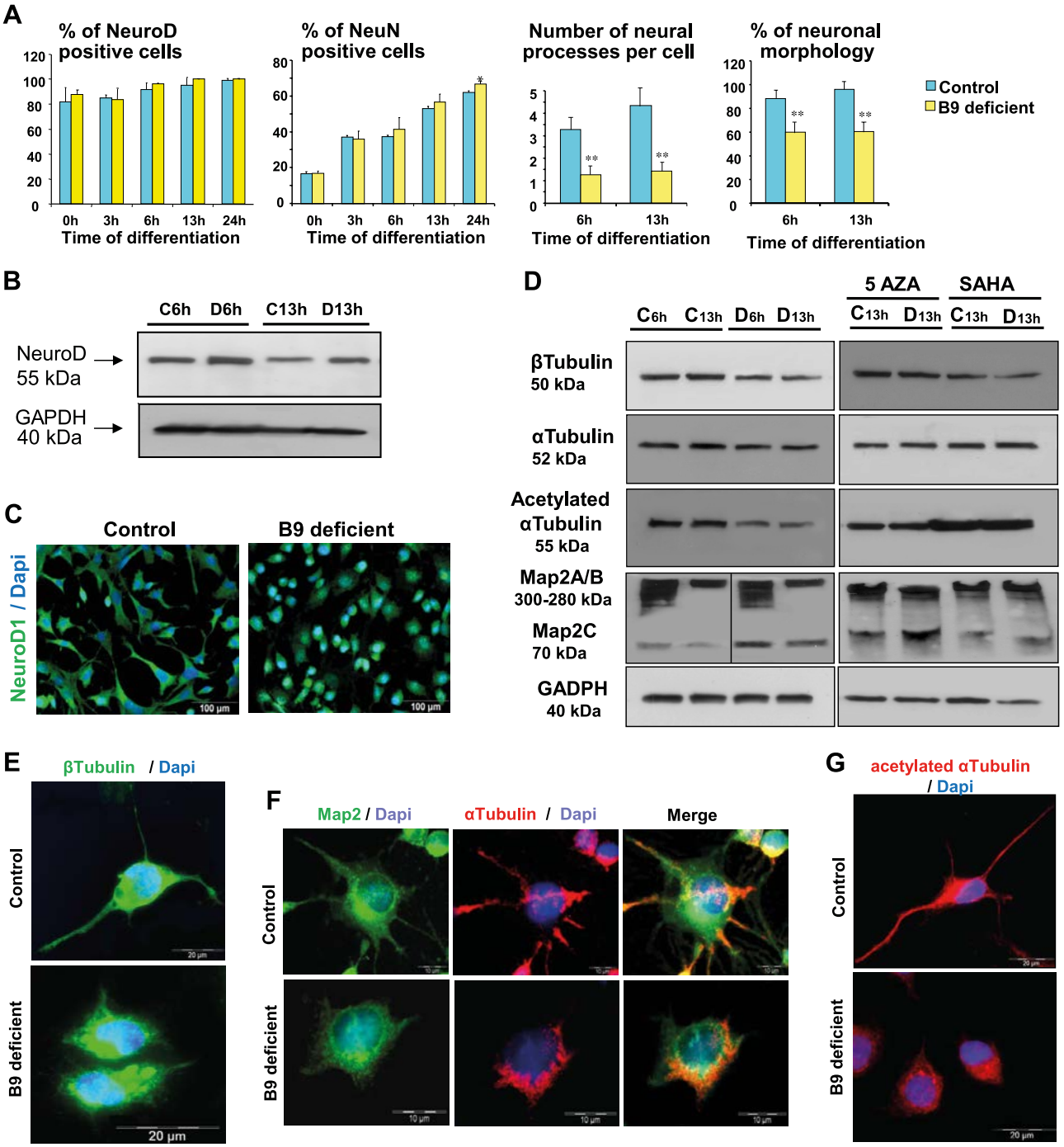


Figure 3. Phenotypic characterization of control and folate-deficient cells and effects of folate deficiency on microtubule-associated components. *A*) Temporal profiles of the expression patterns of neuronal markers NeuroD and NeuN and specific neuronal characteristics at 6 and 13 h after induction of differentiation. Cell counts were obtained by a blind operator from 3 independent experiments, with each assay comprising a minimum of 10 visual fields at ×60 view. Data are reported as means ± SD. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control. *B*) Western blot analysis of NeuroD in control and folate-deficient cells at 6 and 13 h after induction of differentiation. Corresponding densitometric analyses are provided in Supplemental Fig. S2. *C*) Immunostaining of NeuroD at 13 h after induction of differentiation. Cell nuclei were counterstained by DAPI. *D*) Left panel: expression of proteins assessed by Western blot in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6 and 13 h after induction of differentiation. Right panel: effect of treatment by 5-aza (2 μM) or SAHA (2.5 μM) at 13 h. Corresponding densitometric analyses are provided in Supplemental Fig. S2. *E–G*) Immunohistological analyses of proteins related to microtubules: β-tubulin (*E*), Map2 and α-tubulin (*F*), and acetylated α-tubulin (*G*). Note the lack of polarization in vitamin B_9-deficient cells (bottom panels).

of the immature isoform Map2C. Immunohistochemical analyses showed a disorganization of the cytoskeleton in vitamin B_9-deficient cells, with abnormal filopodias, a lack of cell polarity that requires acetylated α-tubulin, and a perinuclear distribution of most proteins (Fig. 3*E–G*). Whereas cell treatments by the inhib-

itor of DNA methyltransferase (5-aza) or by the HDAC inhibitor (SAHA) had no effect on the expression of β-tubulin, SAHA significantly increased α-tubulin total levels and particularly acetylated α-tubulin levels in deficient cells (Fig. 3*D* and Supplemental Fig. S2). SAHA had little effect on Map2, while the treatment by 5-aza raised the levels of Map2C both in control and folate-deficient cells.

Folate deficiency induces overexpression of histone deacetylases, repressors of neuronal differentiation

In our model, folate deficiency was associated with an increased expression of several HDACs, namely HDAC4, HDAC6, and HDAC7 (**Fig. 4*C, D***). Notably, cell treatment by the HDAC inhibitor SAHA led to a slight but noticeable improvement of deficient cell polarity and morphology, with longer processes containing α-tubulin (Fig. 4*E*). This was confirmed by quantifications (+48%; Fig. 4*A*, *B*) when compared with culture conditions in the absence of SAHA (Fig. 3*A*).

Folate deficiency affects motor proteins, with homocysteinylation and subsequent aggregation

The motor proteins kinesin and dynein also appeared to be highly affected by folate deprivation (**Figs. 5** and **6**). Their global expression was lower than in controls, and their presence in neurites was reduced. It is noteworthy that kinesin was detected at 124 kDa in differentiated control cells but was present at 75 kDa in all deficient cells as well as in proliferating controls, possibly suggesting the existence of a nonmature isoform (Fig. 5*B*). While cell treatment by 5-aza had no patent effect on the expression of motor proteins in deficient cells, SAHA increased levels of dynein.

Because motor proteins were found to strikingly colocalize with homocysteine, along with the appearance of obvious cellular aggregates (Figs. 5*C* and 6*C*), we tested the hypothesis of protein homocysteinylation by coimmunoprecipitation experiments, *in situ* PLA, and MS.

Due to the importance of the specificity of the anti-homocysteine antibody used in our experiments, it is worth mentioning that, according to the manufacturer, the immunogen corresponds to homocysteine-glutaraldehyde-BSA, and this Chemicon rabbit polyclonal antibody binds specifically to the sulfur-containing amino acid, including free homocysteine. Cross-reactivities were determined by the manufacturer using an ELISA test by competition experiments with homocysteine-glutaraldehyde-BSA, cysteine-glutaraldehyde-BSA, and homocysteic acid-glutaraldehyde-BSA. According to the Millipore website, cross-reactivity ratios were found to be 1, 1:450, 1:>100,000, respectively.

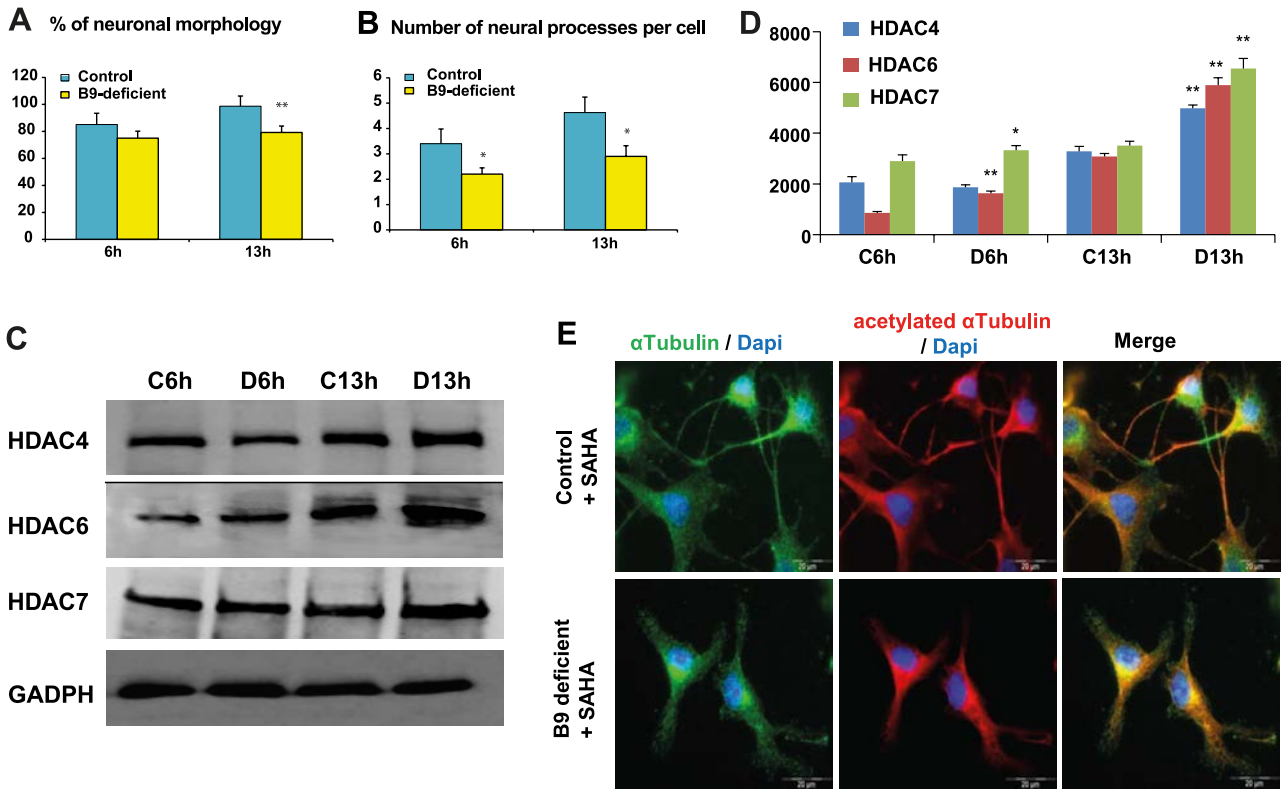


Figure 4. Consequences of folate deficiency on HDAC expression and effects of an HDAC inhibitor. *A*, *B*) Effects of SAHA on percentage of neuronal morphology (*A*) and number of neuronal processes per cell (*B*) at 6 and 13 h after induction of differentiation. Cell counts were performed as described in Fig. 3*A*. *C*, *D*) Western blot analyses of HDAC4, HDAC6, and HDAC7 in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6 and 13 h after induction of differentiation (*C*), and corresponding densitometric analyses (*D*). *E*) Effects of SAHA on the distribution of α-tubulins at 13 h after induction of differentiation of control and vitamin B_9-deficient cells. All experiments were performed at least in triplicate, leading to similar results. Data are reported as means ± SD. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control.

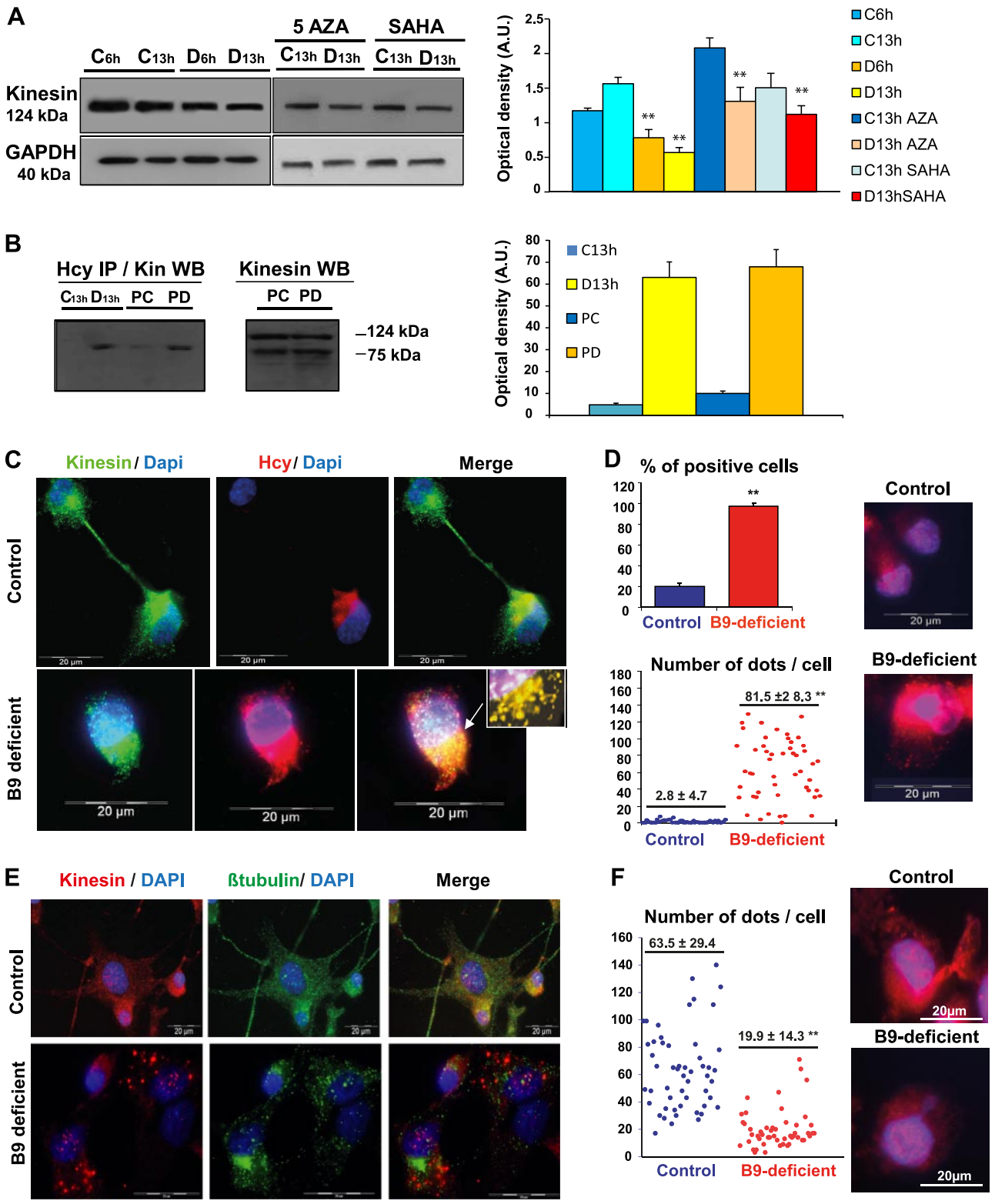


Figure 5. Effects of folate deficiency on kinesin. *A*) Left panel: expression of kinesin assessed by Western blot in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6 and 13 h after induction of differentiation (left blots) and effects of treatments by 5-aza or SAHA at 13 h (right blots). Right panel: corresponding densitometric analyses. *B*) Left panel: kinesin homocysteinylation in proliferating (P) and 13 h-differentiated (13 h) control (C) and deficient (D) cells, as shown by homocysteine precipitation followed by kinesin immunodetection (Hcy IP/Kin WB). Right panel: corresponding densitometric analyses. *C*) Immunohistological evidence of cell colocalization of homocysteine with kinesin and occurrence of cell aggregates. *D*) *In situ* interaction between homocysteine and kinesin monitored by the Duolink assay in control and vitamin B_9-deficient cells at 13 h of differentiation. *E*) Immunohistological colocalization of kinesin and its partner protein β-tubulin in control and vitamin B_9-deficient cells. *F*) *In situ* interaction between kinesin and β-tubulin monitored by the Duolink assay in control and vitamin B_9-deficient cells. All experiments were performed at least in triplicate. Data are reported as means ± SD (n=3). $^{**}P < 0.01$ *vs.* control.

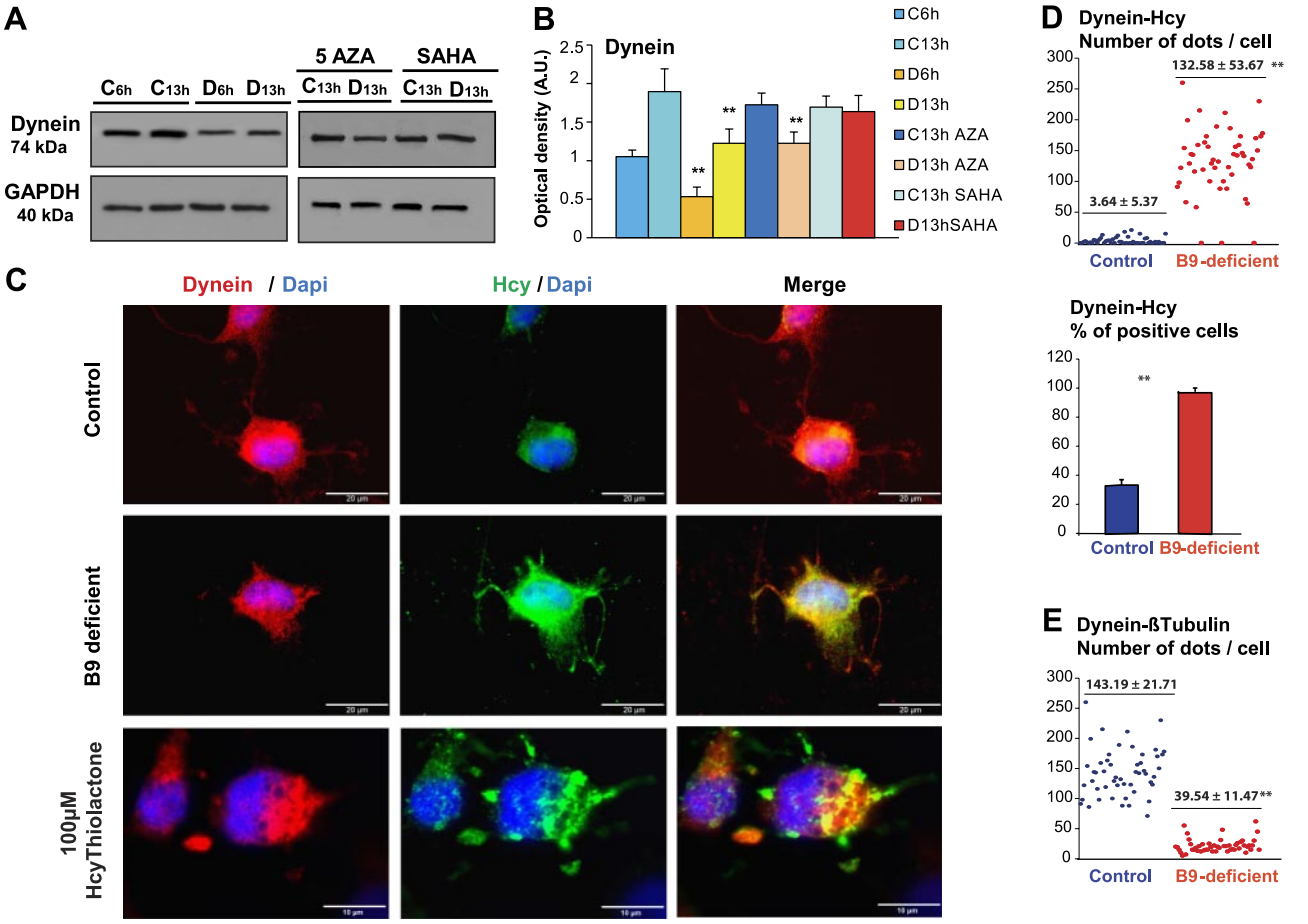


Figure 6. Effects of folate deficiency on dynein. *A*) Left panel: expression of dynein assessed by Western blot in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6 and 13 h after induction of differentiation. Right panel: effects of treatments by 5-aza or SAHA at 13 h. *B*) Densitometric analyses of data from panel *A*. *C*) Immunohistological evidence of cell colocalization of homocysteine with dynein and occurrence of cell aggregates. Homocysteine thiolactone was used as a control to mimic homocysteine accumulation. *D*) *In situ* interaction between homocysteine and dynein monitored by the Duolink assay in control and vitamin B_9-deficient 13 h-differentiated cells. *E*) *In situ* interaction between dynein and its partner protein β-tubulin monitored by the Duolink assay in control and vitamin B_9-deficient cells. All experiments were performed at least in triplicate. Data are reported as means ± SD (n=3). $^{**}P < 0.01$ *vs.* control.

A prominent interaction of homocysteine with kinesin was demonstrated either by homocysteine precipitation followed by kinesin immunodetection (Fig. 5*B*) or by kinesin precipitation followed by homocysteine detection (not shown). This was further confirmed by the Duolink *in situ* PLA that showed a significant increase of fluorescent signals in deficient cells compared to controls (Fig. 5*D*). Since the procedure is based on a stoichiometric reaction, each dot corresponds to a close interaction between kinesin and homocysteine. Furthermore, the functional adverse effects associated with increased kinesin homocysteinylation in folate-deficient cells were reflected by reduced interaction of kinesin with its physiological partner protein, β-tubulin (Fig. 5*E*, *F*).

Markedly increased homocysteinylation of dynein was also shown to occur in vitamin B_9-deficient cells, with associated protein aggregation and reduced interaction with dynein's partner protein, β-tubulin (Fig. 6*C*–*E*). Similar observations could be made when homocysteine thiolactone was used as a control (Fig. 6*C*). In MS studies, dynein was found among immunoprecipitated proteins when using an immobilized antihomocysteine antibody. We analyzed in detail the modifications carried by this protein in vitamin B_9-deficient cells. As shown in **Table 1**, sequence alignments identified the lysine residue K1218 as being *N*-homocysteinylated. In addition, the lysine residue K2800 was found to be acetylated in the microtubule-binding domain of dynein (33). As expected, nonmodified peptides were also present in the protein digests.

TABLE 1. *Mass spectrometry analysis of dynein modifications*

Sequence	Protein accesion	Alignment	Modifications
LAQkEELR	GI62530230	1216–1222	K4 (acetyl)
ILkVmKK	GI62530230	2797–2804	K3 (*N*-Hom), M5 (oxidation)

Dynein axonemal heavy chain (*Rattus norvegicus*), 3965 aa.

Folate deficiency impairs vesicular transport and synaptic functions

Functional capacities of differentiated hippocampal neurons were found to be altered, as reflected by the labeling of the lumenal part of synaptotagmin I, a Ca^{2+}-binding protein enriched in synaptic vesicles and known to be essential for synaptic vesicle exocytosis and endocytosis in neurons (34) and also by the expression and clustering of the scaffold protein PSD-95 normally present at the postsynaptic side of excitatory synapses and that plays a key role in the regulation of glutamate receptor targeting and trafficking (ref. 35 and Fig. 7*A*). Analysis of PSD-95 clusters using BlobFinder freeware revealed that their average number per cell fell significantly, from 29.7 ± 5.6 in controls (n=25) to 9.6 ± 2.7 in vitamin B_9-deficient cells (n=24; Fig. 7*F*).

Among cargo molecules transported by motor proteins, synapsin I and synapsin II, which are key actors of synapse function and plasticity, were affected by folate deficiency. Whereas deficiency was associated with reduced amounts of synapsin I mRNA after 13 h of differentiation (Fig. 7*B*), both synapsins exhibited an ectopic localization. Indeed, they were located in the vicinity of nuclei in vitamin B_9-deficient cells, while in control conditions, synapsin I was largely present in axons and dendrites, and synapsin II in axons (Fig. 7*C*).

Folate deficiency prevents differentiated H19-7cells from integrating into a preexisting network of primary cultured neurons

In our coculture conditions, control differentiated H19-7 neurons were able to survive for several days after seeding and to develop a significant number of connections with primary cultured neurons (Fig. 7*D*), as previously reported (23). In contrast, fewer folate-deficient H19-7 cells could integrate into the network of primary cultured neurons (9 *vs.* 42% at 48 h; Fig. 7*E*). Moreover, folate deficiency was associated with a dramatically reduced capacity to develop cell connections.

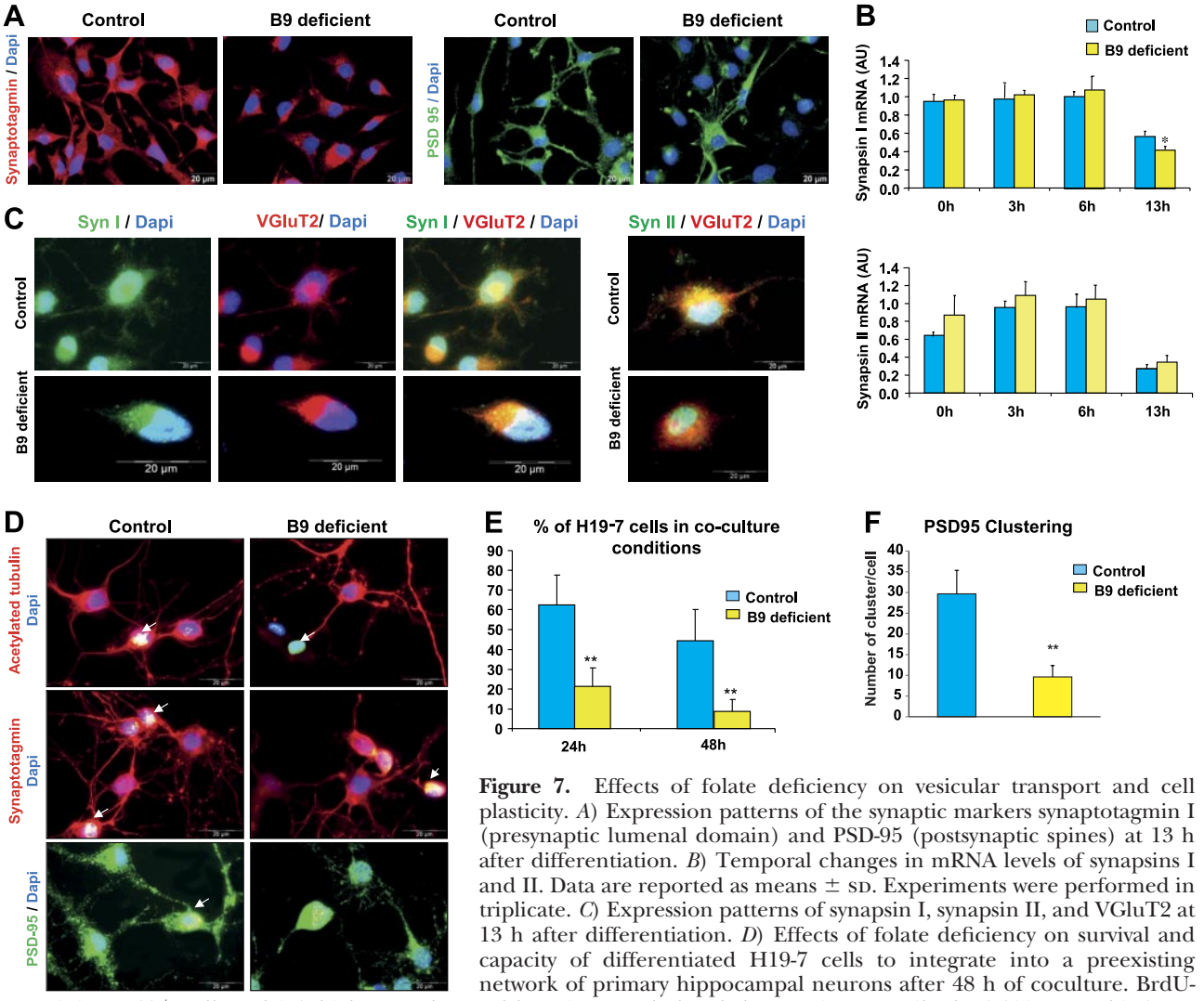


Figure 7. Effects of folate deficiency on vesicular transport and cell plasticity. *A*) Expression patterns of the synaptic markers synaptotagmin I (presynaptic lumenal domain) and PSD-95 (postsynaptic spines) at 13 h after differentiation. *B*) Temporal changes in mRNA levels of synapsins I and II. Data are reported as means ± SD. Experiments were performed in triplicate. *C*) Expression patterns of synapsin I, synapsin II, and VGluT2 at 13 h after differentiation. *D*) Effects of folate deficiency on survival and capacity of differentiated H19-7 cells to integrate into a preexisting network of primary hippocampal neurons after 48 h of coculture. BrdU-containing H19-7 cell nuclei (which were detected by using a polyclonal sheep primary antibody, 1:100, Interchim) are identified among primary cultured neurons by arrows. *E*) Presence of H19-7 cells in cocultures. *F*) Quantification of PSD-95 clustering by using BlobFinder freeware in control and vitamin B_9-deficient cells at 13 h after differentiation (n=5). All experiments were performed at least in triplicate. Data are reported as means ± SD. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs.* control.

DISCUSSION

Our study showed that folate deprivation can markedly affect hippocampal cell proliferation, migration, differentiation, survival, vesicular transport, and synaptic plasticity. This occurs through signaling alterations, impaired expression of proteins involved in elongation and stabilization of axons and dendrites, defect of cell polarity and trafficking, and dramatic homocysteinylation of some key proteins necessary for synapse formation, function, and plasticity.

The rat H19-7 embryonic cell line that has been conditionally immortalized with a temperature-sensitive SV40 large T antigen, and not derived from transformed cells, can yield an exclusively neuronal population by reflecting the *in vivo* process and thus constitutes a useful model of hippocampal progenitors for studying neuronal development (22, 36). Deleterious effects of folate deprivation involve various mechanisms. According to our observations, they are tentatively summarized in **Fig. 8**. Impaired remethylation of homocysteine and its subsequent accumulation were reported to sensitize hippocampal neurons to excitotoxicity and oxidative stress and to promote apoptosis (12, 15). In our study, folate deficiency sensitized H19-7 cells to differentiation-associated cell death through the activation of the mitochondrial apoptosis pathway. In response to DNA damage, PP2A, a major cellular phosphatase involved in apoptosis regulation (37), has been shown to be activated by methylation of its catalytic subunit. In folate deficiency conditions, PP2Ac expression decreased after induction of differentiation. PP2A was shown to regulate the activities of G1 cyclin-dependent kinases (38) and, in the present study, repression of PP2A in folate-deficient H19-7 cells, along with cyclin E overexpression, could participate to the sensitization of progenitors to differentiation-associated death.

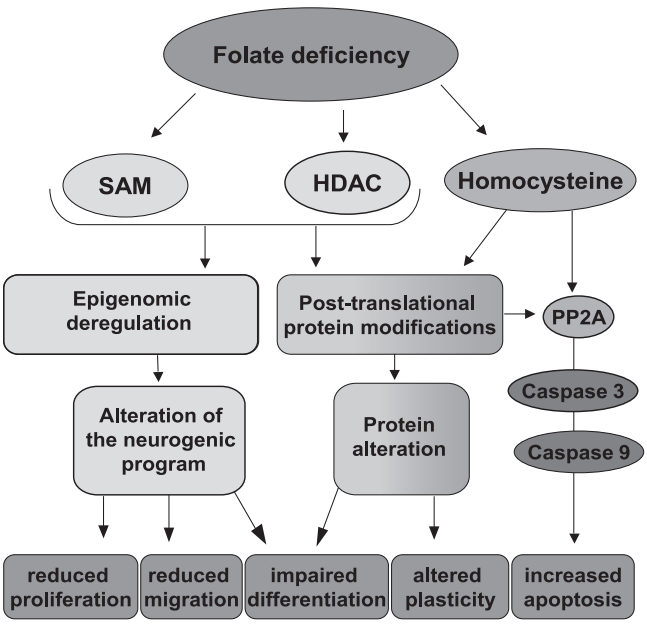


Figure 8. Suggested sequential events governing the fate of folate-deficient neuronal cells.

As expected, folate deficiency increased homocysteine amounts and decreased SAM availability as well as the SAM/SAH ratio. Alterations in transmethylation reactions are critical for epigenomic modifications and for the synthesis of many substrates. Differentiation of functional neurons requires the regulated expression of specific gene sets with a number of precisely orchestrated steps. Epigenetic/epigenomic modifications of both DNA and histones are emerging as fundamental mechanisms by which neurons adapt their transcriptional response to developmental and environmental cues (39). We showed that folate deficiency increased the expression of the epigenomic regulators HDACs. HDACs have been shown to regulate many important biological processes, including cell proliferation, differentiation, and development, by forming complexes with various transcription factors and transcriptional coregulators (40). In this respect, it has been documented that pharmacological inactivation of HDACs promotes neuronal differentiation (41). Consistently, in our model, the use of SAHA, a nonselective HDAC inhibitor, appeared to improve cell differentiation, as illustrated by neuronal morphology and number of neurites per cell (Fig. 4). Although HDACs are known to repress transcription factors such as NeuroD, neurogenin 1 (Ngn 1), and Math 1, we observed an up-regulation of NeuroD under folate deficiency conditions 13 h after induction of differentiation. This may reflect alteration of the differentiation process, with high levels of the marker of neuronal immaturity remaining at this stage.

Folate and SAM were reported to modulate synaptic activity of cortical neurons *in vitro* (42). Folate deficiency markedly affected synaptic activity and plasticity. Dendritic spines are the primary recipients of excitatory inputs in the brain, and maturation of functional postsynaptic compartments involves specialized machinery for clusters in dendrites which then will form part of functional synapses (43). Clustering of PSD-95 would be directly linked to neuronal activity and synaptic integrity in hippocampal neurons (44), and its level was significantly reduced in folate-deficient cells. Altered expression was also shown for the lumenal domain of synaptotagmin I, which has been shown to label recycling synapses (45). Alterations of plasticity were further supported by our data obtained in coculture conditions. Indeed, we have previously shown that when they were cocultured with primary hippocampal neurons, a significant number of differentiated H19-7 cells were able to survive, to integrate into the preexisting neuronal network, and to develop cell-cell communication (23). Such properties were severely reduced under folate deficiency. Although folate-free medium may influence the properties of both the H19-7 cells and the primary cells, the latter are less sensitive since they were already fully differentiated when they were exposed to folate deprivation. Nevertheless, their plasticity may be affected.

One of the most salient features in the present study was the demonstration of dramatic alterations of some cytoskeleton-related components, in line with a strongly increased homocysteinylation of proteins such as motor

proteins, and subsequent aggregation. This should be directly related with homocysteine accumulation, since the addition of homocysteine thiolactone to the culture medium led to similar observations. Homocysteine thiolactone is a metabolite of homocysteine reacting with amine groups to form N-homocysteinylated proteins that contribute significantly to homocysteine cytotoxicity (46). Differentiation of neurons involves marked reorganization of the cytoskeleton (47), and microtubule assembly, organization, and dynamics are critical for neuronal development and axon and dendrite specification, as well as for cell polarity (48). Also, synaptic cargo trafficking is essential for synapse formation, function, and plasticity (49). All these components were markedly affected in vitamin B_9-deficient hippocampal cells, along with altered expression and distribution of synapsins and VGluT2. Reduced expression of the cytoskeleton-related proteins could not be attributed to changes in methylation/acetylation of their promoters, since 5-aza and SAHA gave rise to similar protein expressions in control and deficient cells. As expected, SAHA increased levels of acetylated α-tubulin in deficient cells and thus improved cell polarity and neurite outgrowth, likely through the inhibition of HDAC6. Indeed, unlike other histone deacetylases with chromatin remodeling activity, HDAC6 is known to catalyze deacetylation of cytoplasmic substrates, including α-tubulin, which plays a key role in cell polarity (50). In good agreement with our observations, low folate was related to failure of post-translational methylation of the cytoskeleton, required for proper neural tissue differentiation (51).

N-homocysteinylation was described for plasma proteins in healthy individuals (52) and in patients with hyperhomocysteinemia, who display double the level of homocysteinylated proteins (53). More recently, homocysteinylation of nonplasmatic proteins was reported, with affected functional properties of fibrillin-1 and tropoelastin (54). Under folate deficiency, we showed for the first time homocysteinylation of neuronal proteins, as confirmed by several technical procedures, along with subsequent aggregation. Whereas kinesin and dynein baseline homocysteinylation could be depicted in hippocampal cells under control conditions, it was dramatically increased under folate deprivation, leading to impaired functions, as reflected by reduced interactions with partner proteins. Aggregation associated with homocysteinylation has been recently documented for several non-neuronal proteins, including blood proteins (55) and intrinsically unstructured proteins, such as caseins (56). Whether other neuronal proteins are homocysteinylated and aggregate under folate deficiency is currently under investigation.

In summary, folate deficiency impairs hippocampal cell differentiation, vesicular transport, plasticity, and synaptic functions through alterations of major cytoskeleton-associated proteins. Decreased production of SAM and increased HDAC expression would lead to epigenomic changes contributing to impair the differentiation program. Furthermore, the prominent homocysteinylation of some neuronal proteins and their associated aggregation certainly constitute major adverse effects in response to folate deficiency, affecting normal development with possible long-lasting consequences. FJ

The study was supported by a grant from the French National Agency for Research [Agence Nationale de la Recherche (ANR) Nutrivigène]. N.A. is indebted to the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Région Lorraine for financial support.

REFERENCES

1. Oliver, M. H., Jaquiery, A. L., Bloomfield, F. H., and Harding, J. E. (2007) The effects of maternal nutrition around the time of conception on the health of the offspring. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **64,** 397–410
2. McMillen, I. C., MacLaughlin, S. M., Muhlhausler, B. S., Gentili, S., Duffield, J. L., and Morrison, J. L. (2008) Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **102,** 82–89
3. Van der Put, N. M., van Straaten, H. W., Trijbels, F. J., and Blom, H. J. (2001) Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **226,** 243–270
4. Ellinson, M., Thomas, J., and Patterson, A. (2004) A critical evaluation of the relationship between serum vitamin B, folate and total homocysteine with cognitive impairment in the elderly. *J. Hum. Nutr. Diet* **17,** 371–383
5. Finkelstein, J. D. (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur. J. Pediatr.* **157**(Suppl. 2), S40–S44
6. Blaise, S. A., Nédélec, E., Schroeder, H., Alberto, J. M., Bossenmeyer-Pourié, C., Guéant, J. L., and Daval, J. L. (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am. J. Pathol.* **170,** 667–679
7. Battaglia-Hsu, S. F., Akchiche, N., Noel, N., Alberto, J. M., Jeannesson, E., Orozco-Barrios, C. E., Martinez-Fong, D., Daval, J. L., and Guéant, J. L. (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 21930–21935
8. Coppedè, F. (2010) One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: focus on epigenetics. *Curr. Genomics* **11,** 246–260
9. Troen, A. M., Shea-Budgell, M., Shukitt-Hale, B., Smith, D. E., Selhub, J., and Rosenberg, I. H. (2008) B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 12474–12479
10. Daval, J. L., Blaise, S., and Guéant, J. L. (2009) Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** E1
11. Pitkin, R. M. (2007) Folate and neural tube defects. *Am. J. Clin. Nutr.* **85,** 285S–288S
12. Kruman, I. I., Kumaravel, T. S., Lohani, A., Pedersen, W. A., Cutler, R. G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M., and Mattson, M. P. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **22,** 1752–1762
13. Kruman, I. I., Mouton, P. R., Emokpae, R., Jr., Cutler, R. G., and Mattson, M. P. (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* **16,** 1055–1059
14. Zhang, X., Liu, H., Cong, G., Tian, Z., Ren, D., Wilson, J. X., and Huang, G. (2008) Effects of folate on notch signaling and cell proliferation in neural stem cells of neonatal rats in vitro. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **54,** 353–356
15. Kruman, I. I., Culmsee, C., Chan, S. L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L., and Mattson, M. P. (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J. Neurosci.* **20,** 6920–6926
16. Mattson, M. P., and Shea, T. B. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* **26,** 137–146

17. Obeid, R., and Herrmann, W. (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett.* **580,** 2994–3005
18. Obeid, R., McCaddon, A., and Herrmann, W. (2007) The role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45,** 1590–1606
19. Balk, E. M., Raman, G., Tatsioni, A., Chung, M., Lau, J., and Rosenberg, I. H. (2007) Vitamin B6, B12 and folic acid supplementation and cognitive function: a systematic review of randomized trials. *Arch. Intern. Med.* **167,** 21–30
20. Durga, J., van Boxtel, M. P., Schouten, E. G., Kok, F. J., Jolles, J., Katan, M. B., and Verhoef, P. (2007) Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet* **369,** 208–216
21. Wald, D. S., Kasturiratne, A., and Simmonds, M. (2010) Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive decline: meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Med.* **123,** 522–527
22. Eves, E. M., Tucker, M. S., Roback, J. D., Downen, M., Rosner, M. R., and Wainer, B. H. (1992) Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89,** 4373–4377
23. Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Pourié, G., Koziel, V., Nédélec, E., Guéant, J. L., and Daval, J. L. (2010) Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus* **20,** 949–961
24. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254
25. Chery, C., Barbe, F., Lequere, C., Abdelmouttaleb, I., Gérard, P., Barbarino, P., Boutroy, J.L., and J.L. Guéant, J.L. (2002) Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin. Chem. Lab. Med.* **40,** 1105–1108
26. Amouzou, E. K., Chabi, N. W., Adjalla, C. E., Rodriguez-Guéant, R. M., Feillet, F., Villaume, C., Sanni, A., and Guéant, J. L. (2004) High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C–>T mutation of the gene encoding methylenetetrhydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am. J. Clin. Nutr.* **79,** 619–624
27. Blaise, S., Alberto, J. M., Nédélec, E., Ayav, A., Pourié, G., Bronowicki, J. P., Guéant, J. L., and Daval, J. L. (2005) Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr. Res.* **57,** 777–782
28. Kutzbach, C., and Stokstad, E. L. (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim. Biophys. Acta* **250,** 459–477
29. Frankfurt, O. S., and Krishan, A. (2001) Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J. Histochem. Cytochem.* **49,** 369–378
30. Liang, C. C., Park, A. Y., and Guan, J. L. (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2,** 329–333
31. Howell, J. M., Winstone, T. L., Coorssen, J. R., and Turner, R. J. (2006) An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins. *Proteomics* **6,** 2050–2069
32. Ren, D., Pipes, G. D., Liu, D., Shih, L. Y., Nichols, A. C., Treuheit, M. J., Brems, D. N., and Bondarenko, P. V. (2009) An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. *Anal. Biochem.* **392,** 12–21
33. Mocz, G., and Gibbons, I. R. (2001) Model for the motor component of dynein heavy chain based on homology to the AAA family of oligomeric ATPases. *Structure* **9,** 93–103
34. Sudhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **27,** 509–547
35. Petralia, R. S., Sans, N., Wang, Y. X., and Wenthold, R. J. (2005) Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* **29,** 436–452
36. Eves, E. M., Boise, L. H., Thompson, C. B., Wagner, A. J., Hay, N., and Rosner, M. R. (1996) Apoptosis induced by differentiation or serum deprivation in an immortalized central nervous system neuronal cell line. *J. Neurochem.* **67,** 1908–1920
37. Andrabi, S., Gjoerup, O. V., Kean, J. A., Roberts, T. M., and Schaffhausen, B. (2007) Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 19011–19016
38. Yan, Y., and Mumby, M. C. (1999) Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **274,** 31917–31924
39. Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2010) Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat. Rev. Neurosci.* **11,** 377–388
40. Haberland, M., Montgomery, R. L., and Olson, E. N. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10,** 32–42
41. Yu, I. T., Park, J. Y., Kim, S. H., Lee, J. S., Kim, Y. S., and Son, H. (2009) Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. *Neuropharmacology* **56,** 473–480
42. Serra, E. (2008) Duloxetine and pregabalin: safe and effective for the long-term treatment of fibromyalgia? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **4,** 594–595
43. Bourne, J. N., and Harris, K. M. (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **31,** 47–67
44. Farias, G. G., Alfaro, I. E., Cerpa, W., Grabowski, C. P., Godoy, J. A., Bonansco, C., and Inestrosa, N. C. (2009) Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **284,** 15857–15866
45. Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M., and De Camilli, P. (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the lumenal domain of synaptotagmin. *J. Neurosci.* **15,** 4328–4342
46. Sibrian-Vazquez, M., Escobedo, J. O., Lim, S., Samoei, G. K., and Strongin, R. M. (2010) Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 551–554
47. Mattson, M. P. (1999) Establishment and plasticity of neuronal polarity. *J. Neurosci. Res.* **57,** 577–589
48. Conde, C., and Caceres, A. (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* **10,** 319–332
49. Schlager, M. A., and Hoogenraad, C. C. (2009) Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol. Brain* **2,** 25
50. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., and Yao, T. P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417,** 455–458
51. Bjorklund, N. K., and Gordon, R. (2006) A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *Int. J. Dev. Biol.* **50,** 135–141
52. Jakubowski, H., Boers, G. H., and Strauss, K. A. (2008) Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylated protein levels in humans. *FASEB J.* **22,** 4071–4076
53. Perna, A. F., Satta, E., Acanfora, F., Lombardi, C., Ingrosso, D., and De Santo, N. G. (2006) Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **69,** 869–876
54. Hubmacher, D., Cirulis, J. T., Miao, M., Keeley, F. W., and Reinhardt, D. P. (2010) Fuctional consequences of homocysteinylation of the elastic fiber proteins fibrilin-1 and tropoelastin. *J. Biol. Chem.* **285,** 1188–1198
55. Paoli, P., Sbrana, F., Tiribilli, B., Caselli, A., Pantera, B., Cirri, P., De Donatis, A., Formigli, L., Nosi, D., Manao, G., Camici, G., and Ramponi, G. (2010) Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *J. Mol. Biol.* **400,** 889–907
56. Stroylova, Y. Y., Zimny, J., Yousefi, R., Chobert, J. M., Jakubowski, H., Muronetz, V. I., and Haertlé, T. (2011) Aggregation and structural changes of α(S1)-, β- and κ-caseins induced by homocysteinylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1814,** 1234–1245

Received for publication March 12, 2012.
Accepted for publication June 5, 2012.

I.3. Synthèse de la publication

La lignée H19-7 est un modèle cellulaire de progéniteurs neuronaux hippocampiques issus du cerveau de rat et immortalisés par transfection thermosensible avec le virus SV40. Les cellules prolifèrent à la température de 33°C et l'induction de la différenciation se fait par incubation à 39°C. Vingt-quatre heures avant induction de la différenciation des cellules progénitrices, une privation en folates a été réalisée par utilisation de milieux de culture dépourvus en vitamine B9. Ce traitement s'est traduit par une chute de la concentration intracellulaire en folates, accompagnée d'une augmentation de l'homocystéine et d'une forte diminution du rapport SAM/SAH. Cette observation fait suite aux perturbations observées au niveau de l'expression des enzymes du métabolisme des monocarbones (MTHFR et MTR), ceci d'autant que l'augmentation de la teneur en homocystéine se trouve amplifiée par l'absence d'activité CBS (catabolisme de l'homocystéine par la voie de transsulfuration) dans les progéniteurs.

Les effets de la carence en B9 sont notables avant la différenciation, avec non seulement une prolifération réduite, mais également un ralentissement de la capacité migratoire des cellules. Suite à l'induction de la différenciation, la survie est moindre dans les cellules carencées, avec une perte du potentiel de membrane mitochondrial. La carence apparaît sensibiliser les neurones à la mort cellulaire avec amplification de l'apoptose, comme en témoigne l'augmentation de l'activation des caspases 9 et 3. Un marquage immunocytochimiques par la technique de l'Apostain confirme ces résultats, avec un marquage des ADN simple-brin coupés plus important dans les cellules différenciées carencées. Un processus de ré-entrée des neurones différenciés dans le cycle cellulaire semble prédisposer les neurones à la mort par apoptose, confirmant les études antérieures (Akchiche et al., 2010; Bossenmeyer-Pourie et al., 2002). Ceci ferait intervenir une répression de la phosphatase PP2A, en lien avec une augmentation de la cycline E.

De manière générale, la carence en folates n'affecte pas l'induction de la différenciation en elle-même, puisqu'elle ne modifie pas le profil d'expression de marqueurs neuronaux tels que la Neu-N. Cependant, la différenciation des cellules se trouve fortement perturbée. En lien avec cette observation, le pourcentage de cellules présentant des prolongements cellulaires ainsi que la longueur de ces prolongements sont significativement réduits dans les cellules déficientes en folate.

Alors que la caractérisation phénotypique confirme l'obtention de neurones de type glutamatergique, comme en témoigne la présence du transporteur VGLUT2, l'expression de ce marqueur est diminuée dans les cellules carencées, avec surtout une localisation perturbée et restreinte à l'espace périnucléaire. De même, l'expression de la protéine NeuroD, qui appartient

à la famille des bHLH intervenant dans le programme neurogénique, se trouve quant à elle augmentée avec cette même distribution périnucléaire et restreinte aux corps cellulaires. En accord avec le fait que les histones désacétylases (HDACs) sont connues pour exercer des effets répresseurs de la différenciation neuronale (Liu et al., 2012), nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de HDAC4.

Enfin, une altération de la plasticité et de l'activité synaptique est fortement suggérée par l'expression anormale de la synaptotagmine I (marqueur de l'activité pré-synaptique) et du PSD-95 (marqueur de l'activité postsynaptique) pour lequel la formation de clusters, un index de l'activité synaptique, est significativement réduite. Ces différents arguments attestent d'une perturbation de la répartition cellulaire d'acteurs fonctionnels importants.

La différenciation des neurones nécessite une réorganisation du cytosquelette impliquant les microtubules et les protéines associées qui permettent la régulation de l'élongation et de la stabilisation des axones et des dendrites (Witte et al., 2008). Ainsi, nos observations ont conduit à étudier les composants du cytosquelette. Suite à la déficience en vitamine B9 dans notre modèle cellulaire, on note une diminution de l'expression des différentes protéines constituant les microtubules (β-tubuline, α-tubuline, α-tubuline acétylée, MAP2 A/B). Ceci est associé à une augmentation de l'expression de la forme immature des protéines associées aux microtubules (MAP2C). Les analyses immunocytochimiques ont confirmé cette désorganisation, avec l'apparition de filopodes anormaux, une perte de la polarité cellulaire (qui nécessite la présence d'α-tubuline acétylée) et une localisation périnucléaire de la majorité des différentes protéines. Bien que le traitement par un inhibiteur des ADN méthyltransférases (5-azacytidine) ou des HDACs (SAHA) n'ait pas eu d'effet sur les β-tubulines, le SAHA a augmenté l'expression des tubulines α, et plus particulièrement de l'α-tubuline acétylée. De plus, ce traitement au SAHA a permis de corriger, au moins en partie, les manifestations d'un défaut de différenciation dans les cellules carencées, avec une restauration partielle de la formation des prolongements neuronaux.

Par ailleurs, il a été mis en évidence des altérations fonctionnelles du transport vésiculaire illustrées par une diminution d'expression des protéines motrices, la dynéine et la kinésine. Les analyses immunocytochimiques ont confirmé les défauts de différenciation, avec une agrégation notable des protéines concernées dans les cellules déficientes en B9. De manière intéressante, il est apparu une co-localisation de la kinésine et de la dynéine avec l'homocystéine, laquelle est accentuée en situation de carence. L'existence d'une interaction homocystéine-protéine a été confirmée d'une part par co-immunoprécipitation basée sur une précipitation de l'homocystéine suivie d'une immunodétection de la kinésine ou de la dynéine (et inversement) et d'autre part par la technique de *Duolink in situ PLA*, une méthode qui quantifie l'apparition d'un signal

fluorescent (blob) en cas d'interaction entre deux protéines[1]. Ces résultats suggèrent une modification post-traductionnelle impliquant une liaison avec l'homocystéine des protéines motrices associées aux microtubules. Ainsi, l'homocystéinylation de la kinésine et de la dynéine a eu pour conséquence de réduire les interactions avec leurs protéines partenaires, notamment la β-tubuline.

Une étude par spectrométrie de masse a permis d'identifier la séquence protéique homocystéinylée. Dans le cas de la dynéine, l'alignement de séquence a désigné le résidu lysine K1218 comme étant N-homocystéinylé. La N-homocystéinylation est toxique et irréversible ; elle conduit à l'agrégation des protéines, avec pour conséquence une diminution de leur activité biologique voire leur dégradation via le protéasome (Ferretti et al., 2010; Sibrian-Vazquez et al., 2010). Cette homocystéinylation des protéines motrices peut en partie expliquer l'altération des capacités fonctionnelles des neurones en culture dans des conditions de carence.

En raison de l'importance de la réorganisation du cytosquelette pour la plasticité synaptique dans le cadre des fonctions cognitives, les modifications engendrées par la déficience en folates pourraient entraîner des troubles cognitifs, comme par exemple des déficits dansles processsus d'apprentissage et de mémorisation. Aussi, il nous est apparu pertinent de confirmer ces résultats *in vivo* sur le modèle animal de carence, à différents âges (au stade embryonnaire E20, puis aux âges de 21 et 450 jours). Enfin, ces observations concernant l'impact d'un déficit en folate sur le devenir des progéniteurs neuronaux nous ont incités à étudier l'homocystéinylation d'autres protéines du cytosquelette mais aussi des composants des microfilaments d'actine. Les résultats suivants faisant l'objet d'une future publication aborderont cette problématique en détail.

[1] Cette technique permet de détecter et de quantifier l'interaction entre deux protéines lorsque celles-ci sont à proximité (28Å). Une étape d'amplification finale consiste à l'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes. Le signal final est ainsi détecté et visualisé comme un spot fluorescent individuel.

II. Perspectives de travail

II.1. Etude *in vivo* chez des rats exposés à une carence précoce en donneurs de méthyles

Ce travail vise à étudier l'impact d'une carence en donneurs de méthyles (vitamines B9, B12 et choline) sur les protéines motrices du cytosquelette chez le rat Wistar selon le protocole décrit par ailleurs.

II. 1.a. La carence en donneurs de méthyles affecte le métabolisme des monocarbones

	Témoins 21 jours	Déficients 21 jours
Homocystéine plasmatique (µmol/L)	6,3 ± 0,2	42,5 ± 3,6**
Vit. B9 plasmatique (nM)	74,1 ± 4,5	15,4 ± 1,9**
Vit. B12 plasmatique(pM)	648,9 ± 29,1	286,6 ± 17,6**
Ratio SAM/SAH (Cerveau)	4,5 ± 0,3	3,1 ± 0,4*

Tableau 5 : Effets d'un régime déficient sur les ratons de 21 jours.
Concentration d'homocystéine, vitamine B9 et B12 ($n_{témoins}$=17, $n_{déficients}$=20) dans le plasma, et ratio SAM/SAH dans le cerveau ($n_{témoins}$=6, $n_{déficients}$=14). * p<0,05, ** p<0,01. SAM = S-adénosylméthionine, SAH = S-adénosylhomocystéine.

Afin de valider le modèle expérimental, les concentrations en folate, B12 et homocystéine ont été mesurées dans le plasma de ratons de 21 jours nés de mères témoins ou carencées. Les résultats sont présentés dans le tableau 5. En condition de carence, on observe une chute des concentrations en folates et vitamine B12 (p<0,01) associée à une forte augmentation de la concentration en homocystéine (p<0,01). Le calcul de l'index de méthylation (SAM/SAH) dans le tissu cérébral montre une baisse significative de la capacité de méthylation cellulaire dans le groupe carencé par rapport au témoin.

Ainsi, le modèle animal à 21 jours présente des caractéristiques biochimiques communes à celles du modèle cellulaire de progéniteurs neuronaux hippocampiques (lignée H19-7) de carence en folates (Akchiche et al., 2012).

II. 1.b. Effets de la carence en donneurs de méthyles sur les protéines motrices

Comme pour le modèle cellulaire, l'immunohistochimie montre unecolocalisation cellulaire de l'Hcy avec les deux protéines motrices (dynéine et kinésine). Alors que des traces d'homocystéine étaient présentes dès le jour embryonnaire E20 dans l'hippocampe des rats témoins, l'homocystéine augmentant avec l'âge (figure 28), des quantités plus élevées en homocystéine ont été mises en évidence chez les rats carencés à E20 et au moment de sevrage

(J21), qui correspond à la période à laquelle les animaux ont commencé à recevoir le régime standard. Plus important encore, l'accumulation de l'homocystéine est toujours plus prononcée à 450jours (sénescence) chez les rats préalablement soumis au régime carencé.

De plus, la colocalisation entre Hcy et protéines motrices, accentuée dans le cas de carence en donneurs de méthyles, s'accompagne de la présence d'agrégats (flèches), indicateurs de protéines mal structurées et non fonctionnelles.

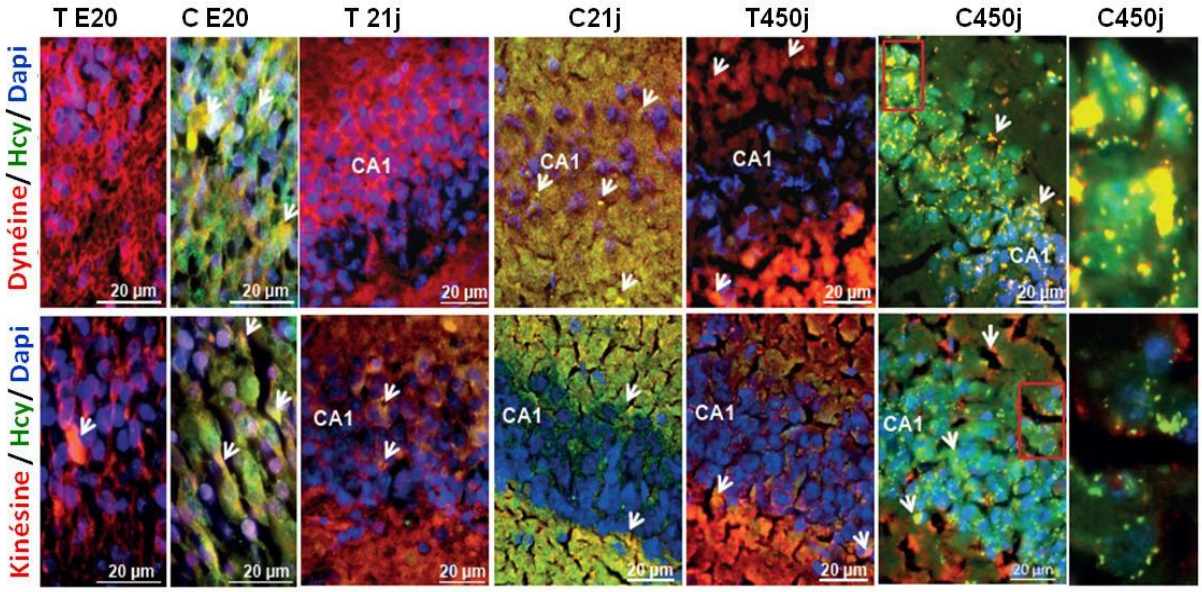


Figure 28 : Anaylses immunohistochimiques de l'Hcy et des protéines motrices sur des coupes de cerveau de rat.

Co-marquage de dynéine/homocystéine et de kinésine /homocystéine dans la région CA1 de l'hippocampe des animaux témoins et carencés au stade embryonnaire de 20 jours (E20), puis à 21 jours (J21) et 450 jours (J450) postnatals.

L'augmentation de l'interaction entre l'homocystéine et les deux protéines suite à la carence en donneurs de méthyles a été confirmée par des expériences de Duolink® *in situ* proximity ligation assay (figure 29).

La figure 29 montre une augmentation du nombre de spots/cellule et du nombre de cellules concernées chez les animaux carencés aux différents âges (au stade embryonnaire E20, puis aux âges de 21 et 450 jours). Ces résultats correspondent à une plus grande interaction de chacune des protéines avec l'Hcy, reflétant l'homocystéinylation des protéines motrices dans le modèle animal, et confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment dans le modèle cellulaire (Akchiche et al., 2012).

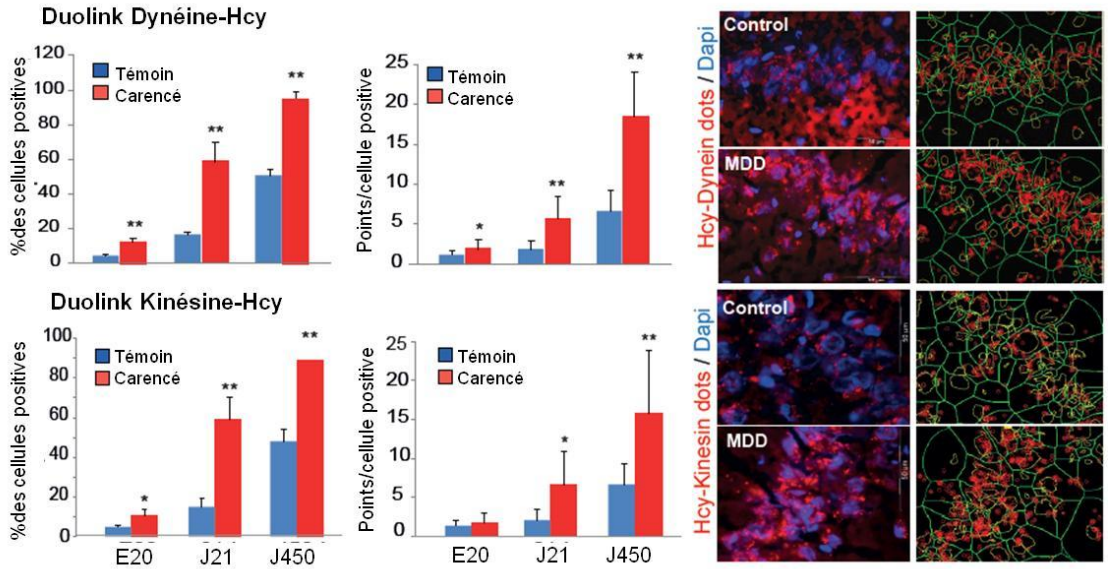


Figure 29 : Interaction Homocystéine-protéines motrices par Duolink® in situ proximity ligation assay.

Interaction *in situ* entre l'homocystéine et la dynéine ou la kinésine dans la région CA1 de l'hippocampe des rats témoins et carencés. Les données obtenues représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. * p<0,05, ** p<0,01 *(MDD=methyl donor deficiency)*.

II.2. Etude protéomique et identification des protéines homocystéinylées par spectrométrie de masse

L'étude précédemment décrite a été complétée par l'identification d'autres cibles du cytosquelette susceptibles d'être modifiées par la carence. Ainsi, nous avons procédé à une étude protéomique dans le but d'identifier l'ensemble des protéines susceptibles d'être modifiées post-traductionnellement par homocystéinylation. Pour cela, dans une première étape, les protéines issues de la lignée H19-7 ont été immunoprécipitées en présence de l'anticorps dirigé contre l'homocystéine. Les expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées à l'aide d'un kit commercial *Pierce® Co-Immunoprecipitation commercial kit* (Thermo Scientific Pierce, Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). Cette méthode permet d'optimiser l'isolement des complexes protéiques natifs à partir d'un lysat cellulaire par immobilisation directe d'anticorps purifiés sur un support d'agarose, sans effet d'interférences d'anticorps (Howell et al., 2006). La deuxième étape consiste en une analyse par spectrométrie de masse (SM). Les peptides tryptiques ont été obtenus à partir de protéines immunoprécipitées (Ren et al., 2009) et séparés en utilisant un système de nano-chromatographie (*Easy nLC, Proxeon*) connecté en ligne à un spectromètre de masse *LTQ Velos Orbitrap* (ThermoFisher). Les conditions de séparation sont décrites en détails par Ren et al. (Ren et al., 2009). Les spectres ont été acquis sur l'analyseur *Orbitrap* en mode haute résolution. En résumé, cette méthode d'élution et d'identification de protéines immunoprécipitées est désignée comme analyse en nano-LC-MS/MS. Les expériences ont été

reproduites en triplicat et, de manière intéressante, nous avons constaté de grands chevauchements entre les trois expériences, démontrant ainsi la robustesse de cette approche expérimentale. Les résultats obtenus ont permis d'identifier la présence d'une centaine de protéines homocystéinylées, sachant que seules les protéines cellulaires qui ont été trouvées enrichies dans le groupe carencé ont été considérées (Tableau 6).

Protéines N-Homocystéinylées	Protéine S-Homocystéinylée
Microtubule associated protein 4 (MAP4)	**synaptic Ras GTPase activating protein [Rattus norvegicus]**
Microtubule associated protein 1A (MAP1A)	
Epiplakin	
Dynein	
Ankyrin	
Cofilin	
Plectin	
Nebulin	
Tropomyosine	
Myosine	
Ahnak	
Keratin I and II	
Centromere prot C1 and autoantigen F	
ras GTPase-activating protein nGAP	
rab11 family-interacting protein 1	
F-actin-capping protein subunit beta	
Neurofilament heavy polypeptide	
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2	
Spna2 protein	
RAN binding protein 2-like isoform 2	

Tableau 6 : Liste des protéines homocystéinylées identifiées par SM.
Parmi une centaine de protéines homocystéinylées, une sélection de protéines associées au cytosquelette a permis de dresser cette liste d'une vingtaine de protéines. La grande majorité d'entre elles sont N-homocystéinylées, modification post-traductionnelle irréversible, contrairement à la S-homocystéinylation.

II.3. Analyse de l'homocystéinylation des protéines associées aux microtubules

II.3.a Homocystéinylation de Map1a et Map4

Suite à l'analyse par spectrométrrie de masse, nous avons étudié en détails l'homocystéinylation de deux protéines associées aux microtubules, MAP1a et MAP4. Le tableau 7 montre les séquences et les sites exacts homocystéinylés de ces deux protéines. Les lysines homocystéinylées sont montrées en rouge. On note que MAP1a est homocystéinylée sur le résidu K411, site de liaison fonctionnel du PSD95. Map4 est homocystéinylée sur les résidus K764 et K776, à proximité des sites de liaison fonctionnels de la tubuline, Tau et d'autres MAPs.

Fait intéressant, l'alignement des séquences homocystéinylées identifiées a montré une homologie avec les MAP1 et MAP4 humaine avec une conservation à 100%. L'homocystéinylation en K411 de MAP1a a lieu dans un domaine conservé et qui est impliqué dans le fonctionnement de la synapse (Interaction PSD95, Cav2) (Clemmensen et al., 2012; Leenders et al., 2008; Reese et al., 2007) et dans le remodelage des dendrites (Szebenyi et al., 2005). L'homocystéinylation de MAP4 en K765 et K777 correspond à une région importante pour sa fixation aux microtubules et proche des sites de liaisons aux autres MAPs (Kitazawa et al., 2000; Tokuraku et al., 1999).

	Sequences	Protein accession	Alignments	Modifications
MAP4 (Rattus norvegicus) 984aa	tSPskPSSAPALRPGPKTTPtISKAtSPSTTLVStGSSSR	gi66730360	267-277	S2 (Acetyl), S4(phospho), K5 (N-Hcy), S7 (Phospho), T30 (Phospho), S38 (Acetyl)
	tSPSKPSSAPALRPGPkTtPtISKAtSPSTTLVStGSSSR	gi66730360	267-277	T1 (Acetyl), K17 (N-Hcy), T19 (Phospho), T21 (Phospho, T26 (Phospho), T34 (Acetyl)
MAP1a (Rattus norvegicus) 2776aa	EKISkLEEK	gi13591886	407-415	K5 (N-Hcy)
	AVGkEEkYVVTsEk	gi13591886	935-948	K4 (N-Hcy), K7 (N-Hcy), S12 (Acetyl), K14 (Acetyl)

Tableau 7: Analyses par sepectrométrie de masse des modifications post-traductionnelle des protéines associées aux microtubules (MAP1a et MAP4).

Nos résultats montrent une diminution de l'expression des MAPs dans les progéniteurs neuronaux suite à la carence en folates (figure 30). Les aggrégats observés corrspondent à des formes mal repliées de la protéine susceptible de perdre ainsi sa fonctionnalité.

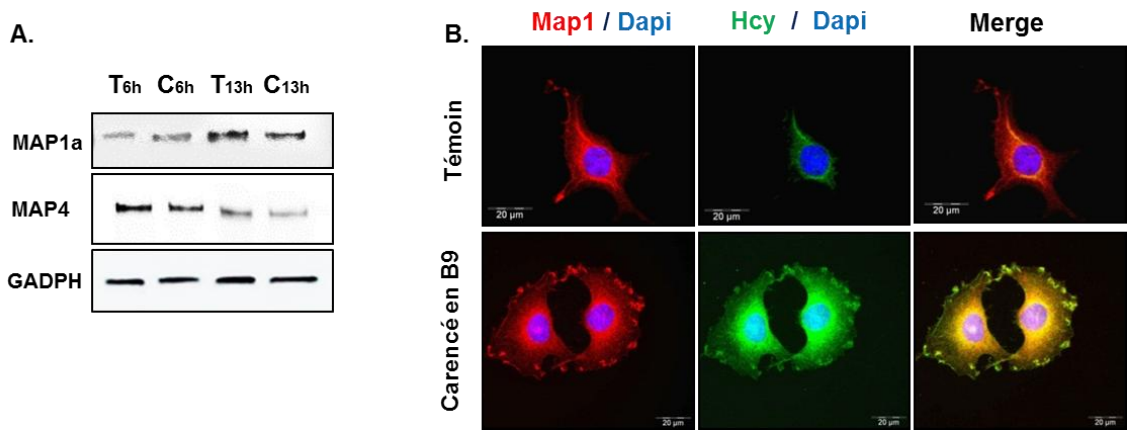


Figure 30 : Effet de la carence sur l'expression des MAPs.
(A) Analyse de l'expression de Map1a et Map4 par Western Blot dans les cellules témoins (T) et carencées en folates (C) à 6 et 13h de différenciation (n=3). (B) Colocalisation par immucocytochimie de MAP1a avec l'Hcy dans les cellules témoins et carencées en folates.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la N-homocystéinylation sur les résidus lysine des protéines fait intervenir l'homocystéine thiolactone, un composé produit par la méthionine ARNt synthétase (MARS). Dans les cellules carencées en folates, l'expression de MARS est augmentée comme le montre le western Blot de la figure 31, A. L'immunocytochimie montre aussi une colocalisation de MARS avec l'Hcy (figure 31, B).

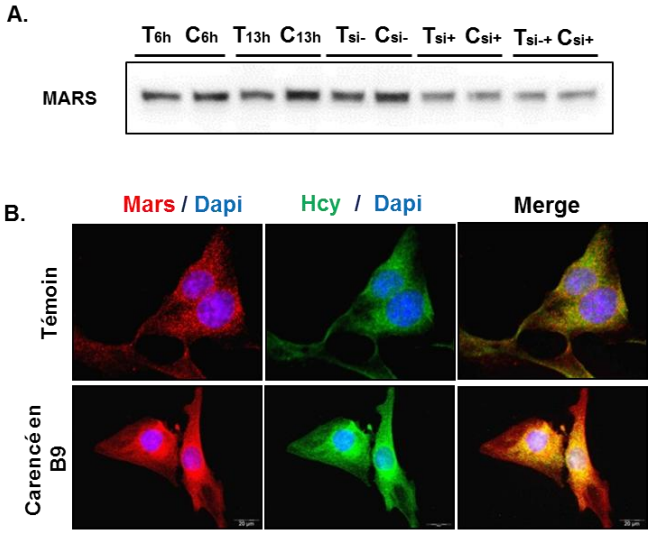


Figure 31: Etude de l'expression de la méthionine ARNt synthétase (MARS) dans les cellules témoins et carencées en folates.
(A) Analyse de l'expression de MARS par Western Blot dans les cellules témoins (T) et carencées en folates (C), ou dans les cellules transfectées par un siARN contrôle négatif (Tsi-, Csi-) ou siARN dirigé contre la protéine MARS (Tsi+, Csi+), à 6 et 13h de différenciation (n=3). (B) Colocalisation par immunocytochimie de MARS avec l'homocystéine dans les cellules témoins et carencées en folates.

L'interaction de Map1a avec l'Hcy étudiée par *Duolink® assay* est augmentée dans les cellules carencées, reflétant une augmentation de l'homocystéinylation de la protéine. Ceci est

associé à une diminution de l'interaction de Map1a au niveau de son site fonctionnel avec la β-tubuline (figure 32). L'invalidation de la protéine MARS conduit à la diminution de l'interaction Map1a/Hcy dans les cellules carencées transfectées comparé aux cellules carencées non transfectées. En parallèle, ceci est associé à une augmentation de l'interaction entre Map1a et la β-tubuline. Ces résultats confirment ainsi la nécessité de la présence de MARS pour l'homocystéinylation de Map1a, une modification post-traductionnelle responsable de la réduction de la fonctionnalité de la protéine.

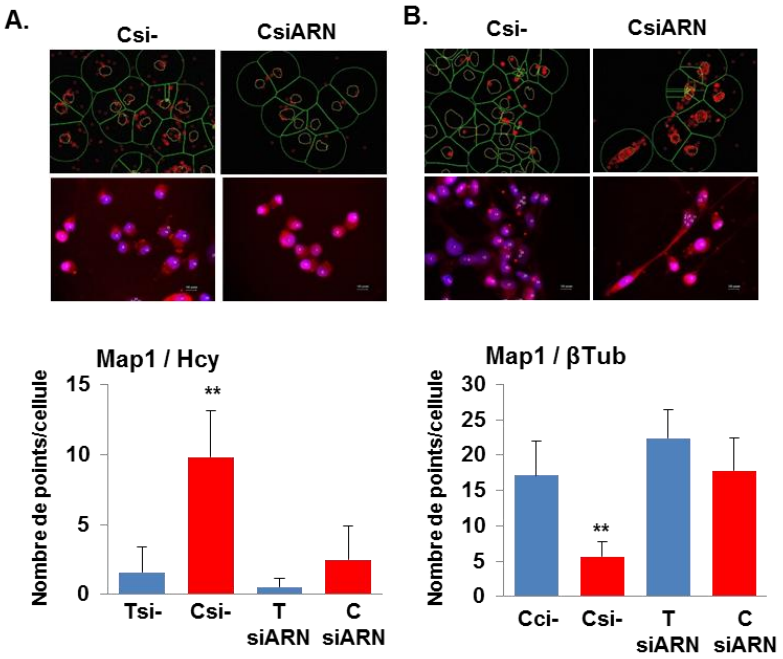


Figure 32 : Analyses de l'interaction de Map1a avec l'homocystéine et la ß-tubuline.
(A) Homocystéinylation de Map1a par étude d'interaction avec l'Hcy étudiée par *Duolink® assay* dans les cellules témoins (T) et carencées (C) à 13h après induction de la différenciation (si- = siARN contrôle négatif non ciblé, siRNA= siRNA dirigé contre MARS). Les photos représentent les points Map1a/Hcy analysés par le *freeware de BlobFinder*. Un point rouge est représentatif d'une interaction protéique. (B) Effet de l'invalidation de MARS sur l'interaction fonctionnelle entre Map1a et β-tubuline étudiée par *Duolink® assay* dans les cellules témoins (T) et carencées (C) à 13h après induction de la différenciation (si- = siARN contrôle négatif non ciblé, siRNA= siRNA dirigé contre MARS).
Les expériences ont été réalisées en triplicat. Différence statistiquement significative entre témoins et carencés : ** p <0,01.

II.3.b Homocystéinylation de Tau

Suite à nos observations de formation d'agrégats cellulaires de MAPs homocystéinylées, nous nous sommes intéressés à une autre protéine associée aux microtubules, la protéine Tau. Tau est un marqueur connu de la maladie d'Alzheimer (MA), la forme la plus commune de démence. Les lésions détectées dans la maladie d'Alzheimer font intervenir l'accumulation de deux principales protéines mal repliées : les peptides ß-amyloïde (Aß) dans les plaques

cérébrales et la protéine Tau hyperphosphorylée et agrégée présente dans les dégénérescences neurofibrillaires (Braak and Braak, 1991; Mandelkow and Mandelkow, 2012).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'agrégation de la protéine Tau pourrait survenir comme conséquence à son homocystéinylation. Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de la protéine Tau et sa forme phosphorylée dans les cellules témoins et carencées en folates. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de Tau, mais surtout de phospho-Tau (pTau) dans les conditions de carence (figure 33).

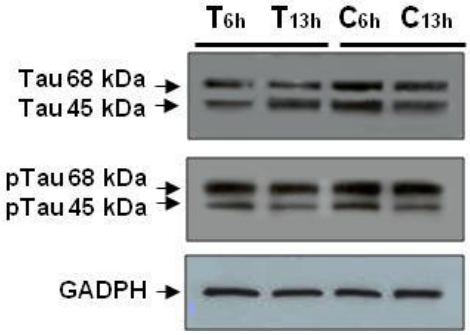


Figure 33 : Effet de la carence en folates sur l'expression de Tau et sa phosphorylation.
L'expression de Tau et de sa forme phosphorylée analysée par Western Blot dans les cellules H19-7 témoins (T) et carencées en folates (C) à 6h et 13h après induction de la différenciation (n=5).

Dans un second temps, nous avons recherché une éventuelle homocystéinylation de la protéine Tau dans les conditions de carence en folates. Comme le montre la figure 34, les expériences de co-immunoprécipitation réalisées à l'aide du kit *Pierce® Co-Immunoprecipitation commercial kit,* ainsi que les analyses immunocytochimiques confirment l'interaction entre Hcy et Tau, principalement dans les cellules carencées. De plus, conformément à leur colocalisation observée en immunocytochimie, on note la présence d'agrégats cellulaires, de manière identique à ce que l'on observe après addition d'Hcy thiolactone dans les cellules en culture.

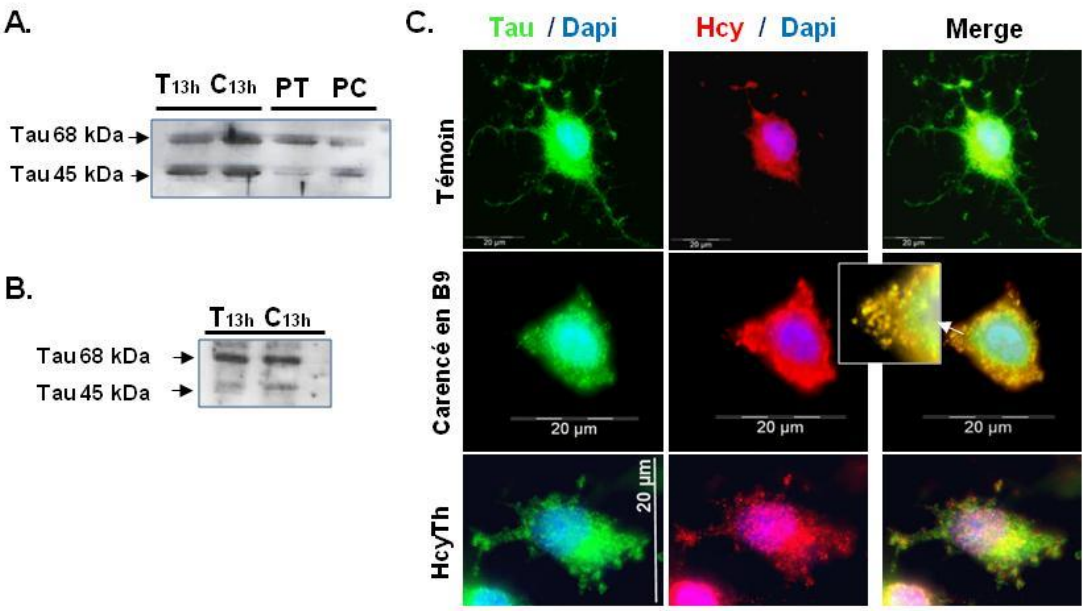


Figure 34 : Homocystéinylation et agrégation de Tau.
(A-B) Homocystéinylation de Tau dans les cellules témoins (T) et carencées en folates (C) en prolifération (P) et à 13h après induction de la différenciation (13h). L'étude a été réalisée par immuno-précipitation de l'homocystéine suivie par immunodétection de Tau (A) (Hcy IP / Tau WB) et par immunoprécipitation de Tau suivie par immunodétection de l'Hcy (B) (Tau IP / Hcy WB) (n = 3). (C) Immunocytochimie des cellules H19-7 montrant une colocalisation de l'homocystéine avec la protéine Tau. L'homocystéine thiolactone (HcyTh) a été utilisée comme contrôle pour reproduire l'accumulation de l'homocystéine.

L'augmentation de l'interaction de Tau avec l'Hcy dans les cellules carencées a été confirmée par *Duolink® assay* (figure 35, B). Comme pour Map1a, ceci est associé à une diminution de l'interaction de Tau avec la β-tubuline (figure 35, C). L'invalidation de la protéine MARS, essentielle pour la formation de la liaison Hcy-N-protéine, conduit à la diminution de l'interaction Tau/Hcy dans les cellules carencées transfectées par comparaison aux cellules carencées non transfectées (figure 35A,B). L'invalidation de MARS est également associée à une augmentation de l'interaction entre Tau et la β-tubuline (figure 35, C). Ces résultats confirment ainsi la diminution de fonctionnalité de la protéine Tau suite à sa modification par homocystéinylation dans les cellules carencées en folates.

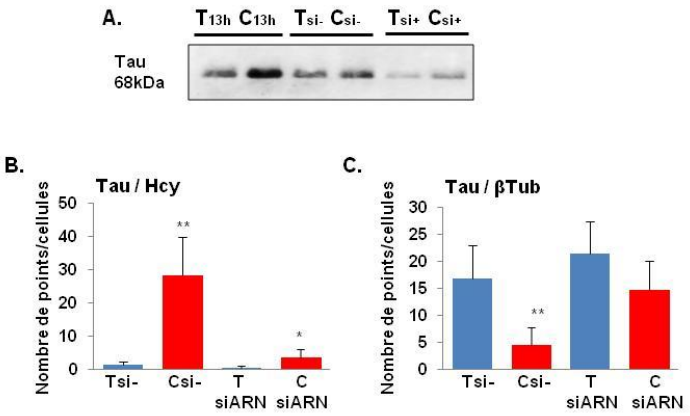


Figure 35: Conséquences de l'invalidation de MARS sur l'homocystéinylation de Tau et sur sa capacité fonctionnelle.

(A) Analyse de l'expression de Tau immunoprécipitée avec l'Hcy suivie d'une immunorévélation dans les cellules témoins (T) et carencées en folates (C), et dans les cellules transfectées par un siARN contrôle négatif (Tsi-, Csi-) ou siARN dirigé contre la protéine MARS (Tsi+, Csi+), à 13h après l'induction de la différenciation (n=3). (B) Homocystéinylation de Tau par *Duolink® assay* (C). Effet de l'invalidation de MARS sur l'interaction fonctionnelle entre Tau et β-tubuline suivie par *Duolink® assay* dans les cellules témoins (T) et carencées (C) à 13h après induction de la différenciation (si- = siARN contrôle négatif non ciblé, siRNA= siRNA dirigé contre MARS).

Les expériences ont été réalisées en triplicat. Différence statistiquement significative entre témoins et carencés : ** $p < 0,01$.

II.4. Confirmation de l'homocystéinylation des protéines associées aux microtubules (Tau, Map1a) *in vivo*

Les résultats obtenus in vivo sur le modèle de rat carencé en donneurs de méthyles sont en accord avec ceux obtenus dans le modèle cellulaire. Ainsi, l'analyse par *Duolink® assay* montre une augmentation de l'interaction Tau/Hcy et Map1/Hcy chez les animaux soumis à la carence gestationnelle (figure 36). Cette interaction correspond à l'homocystéinylation des protéines Tau et Map1 ici observée dans la région CA1 de l'hippocampe aux différents stades étudiés (Stade embryonnaire E20, 21 jours postnatals J21, 450 jours postnatals J450). Les diagrammes correspondent au comptage du nombre de spots par cellule. Un exemple représentatif à 21jours (figure 36) montre clairement un signal plus intense et un nombre de spots augmenté chez les animaux carencés.

Fait intéressant, on note également l'augmentation de l'homocystéinylation des deux protéines avec l'âge. Ainsi à J450, les animaux carencés présentent une proportion de Tau ou de MAP1 homocystéinylées plus importante que chez les ratons ou les embryons carencés.

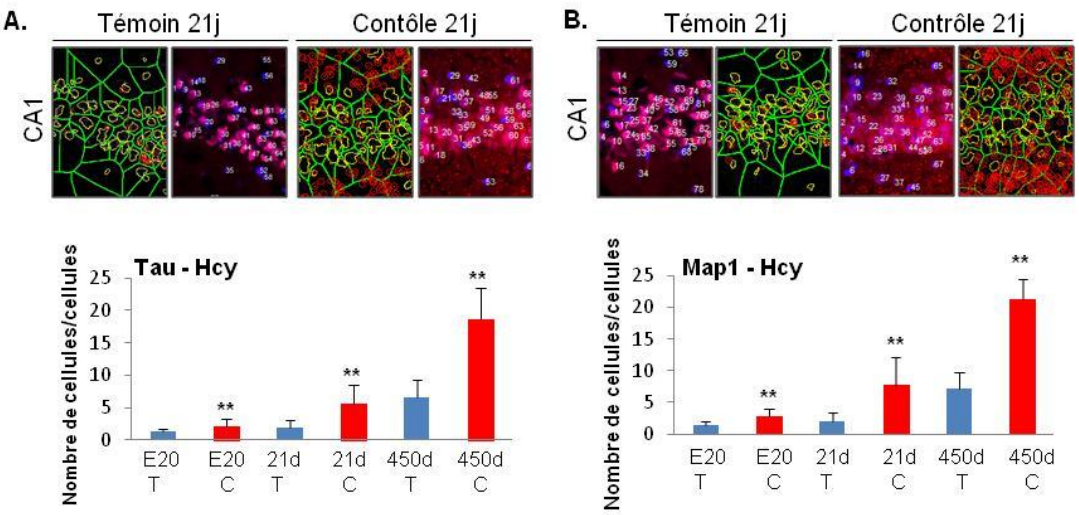


Figure 36 : Homocystéinylation de Tau et Map1 dans la région CA1 de l'hippocampe.
Homocystéinylation de Tau (A) et de Map1a (B) par étude de l'interaction avec l'Hcy par *Duolink® assay* sur des coupes de la région CA1 de l'hippocampe des animaux témoins (T) et carencés (C) au stade embryonnaire E20, chez des ratons à J21 et des rats âgés à J450 (n=4). Les photos représentent les points Tau/Hcy (A) et Map1a/Hcy (B) analysés par le *freeware de BlobFinder*.
Les expériences ont été réalisées en triplicat. Différence statistiquement significative entre témoins et carencés : ** p <0,01.

L'analyse en immunohistochimie sur des coupes de la région CA1 de l'hippocampe de jeunes rats de 21 jours et rats âgés de 450 jours confirme l'augmentation de la colocalisation Tau/Hcy dans le cas des animaux carencés, ainsi que l'agrégation de Tau (figure 37), plus importante au cours du vieillissement.

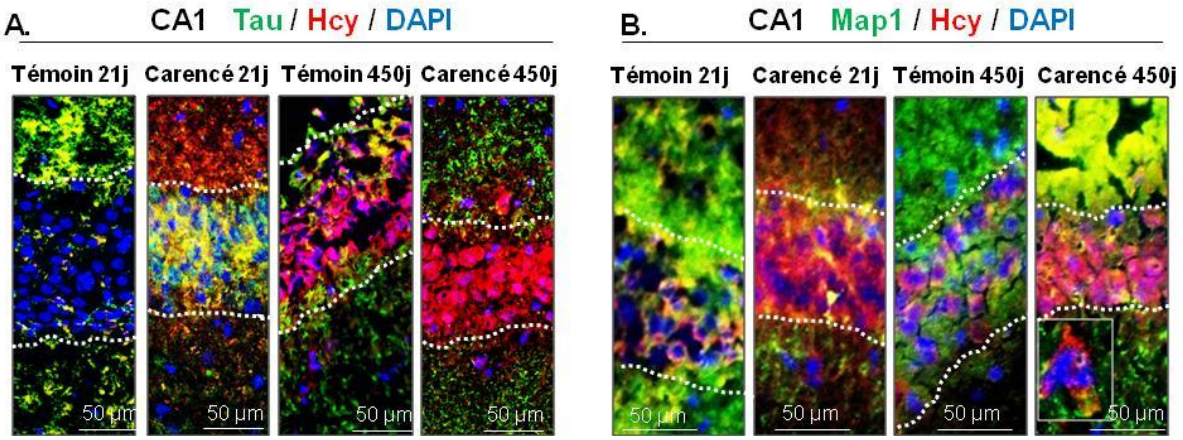


Figure 37 :Homocystéinylation de Tau et Map1 dans l'hippocampe de rats en fonction de l'âge. Effets de la carence en donneurs de méthyles.
Immunohistochimie montrant la colocalisation entre Hcy et Tau et l'agrégation sur des coupes de la région CA1 de l'hippocampe (tirets blancs) des animaux témoins (T) et carencés (C) de rats à 21 jours et 450 jours.

De la même façon, on retrouve la colocalisation Tau/Hcy chez les animaux carencés à l'âge de 6 mois (figure 38, A). L'interaction Tau/Hcy et Map1/Hcy chez ces animaux a été confirmée par *Duolink® assay* (figure 38, B). Ceci est associé à une augmentation de l'interaction entre MARS et Hcy dans les conditions de carence. Cette homocystéinylation des protéines associées aux microtubules est à l'origine d'une diminution de l'interaction de Tau et de Map1 au niveau de leur site fonctionnel respectif avec la β-tubuline.

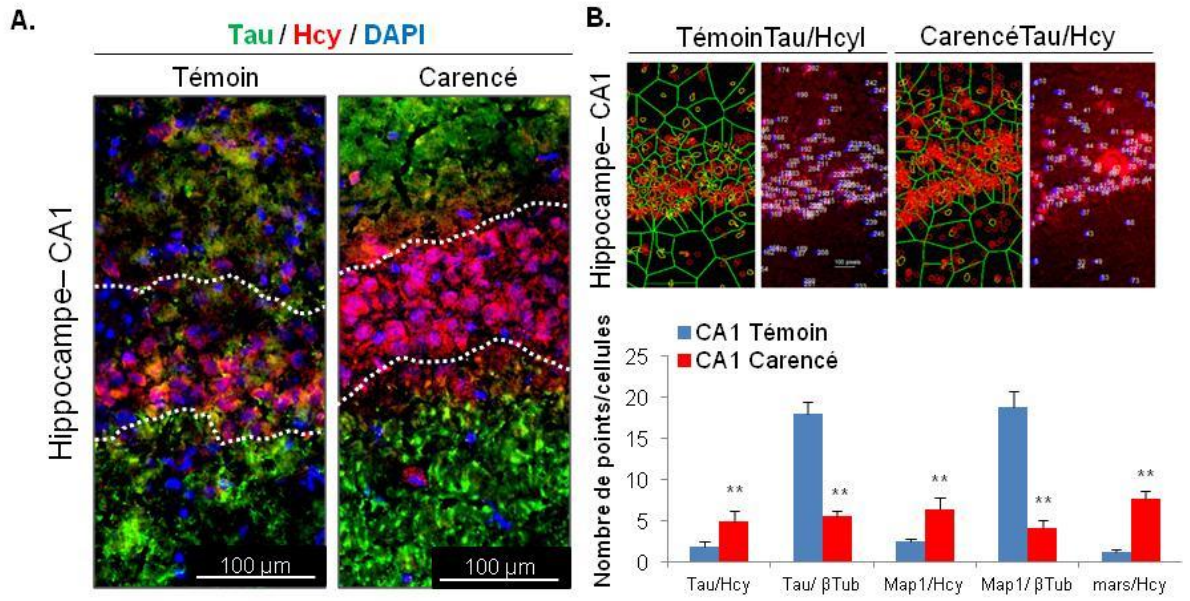


Figure 38 : Conséquences de l'homocystéinylation de Tau et Map1 dans l'hippocampe de rats adultes de 6 mois.
(A) Immunohistochimie montrant la colocalisation entre Hcy et Tau et son agrégation sur des coupes de la région CA1 de l'hippocampe (tirets blancs) des animaux témoins (T) et carencés (C) à 6 mois. (B) Interaction *in situ* entre Tau/Hcy, Tau/βTubulin, Map1/Hcy, Map1/βTubulin et Mars/Hcy par *Duolink® assay* sur des coupes de la région CA1 de l'hippocampe des animaux témoins (T) et carencés (C) (n=4).
Les expériences ont été réalisées en triplicat. Différence statistiquement significative entre témoins et carencés : ** $p < 0{,}01$.

Ces résultats ont été par la suite confirmés sur deux autres régions cérébrales, le cortex et le cervelet. Ainsi, l'analyse par *Duolink® assay* montre que, comme dans l'hippocampe, Tau et Map1 sont homocystéinylées dans ces deux structures cérébrales aux différents âges (E20, J21, J450) (figure 39). L'interaction Tau/Hcy et Map1/Hcy augmente chez les animaux soumis à la carence gestationnelle comparés aux témoins. A J450, les animaux carencés présentent une proportion de Tau et de Map1 homocystéinylées plus élevée que chez les embryons et les ratons carencés.

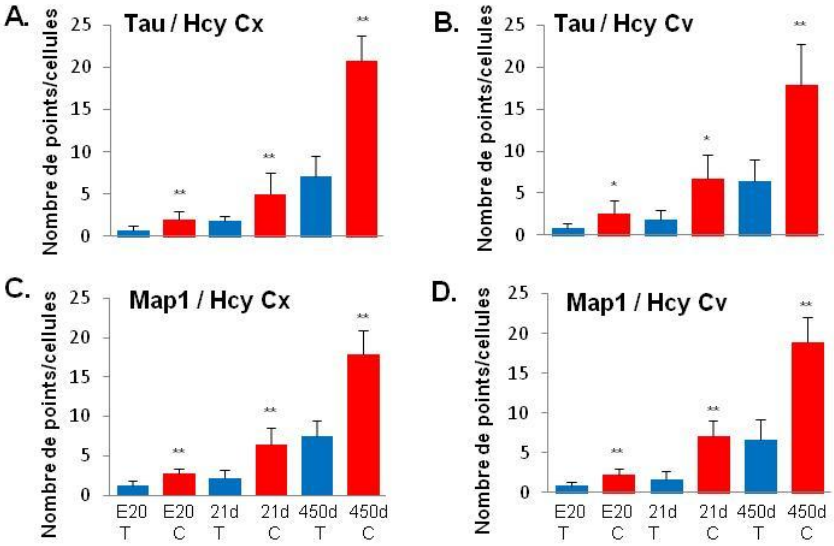


Figure 39 : Homocystéinylation de Tau et Map1 dans le cortex et le cervelet.
Homocystéinylation de Tau (A-B) et de Map1a (C-D) par étude de l'interaction avec l'Hcy par *Duolink® assay* sur des coupes du cortex (Cx) (A-C) et du cervelet (Cv) (B-D) des animaux témoins (T) et carencés (C) au stade embryonnaire E20, à J21 et J450 (n=4).
Les expériences ont été réalisées en triplicat. Différence statistiquement significative entre témoins et carencés : ** $p < 0,01$.

Comme dans l'hippocampe, on retrouve l'interaction Tau/Hcy et Map1/Hcy chez les animaux carencés de 6 mois dans le cervelet (figure 40, A) et le cortex (figure 40, B). Ceci a été confirmé par *Duolink® assay* qui montre aussi une augmentation de l'interaction entre MARS et Hcy dans les conditions de carence dans les deux structures cérébrales. Cette homocystéinylation des protéines associées aux microtubules est à l'origine d'une diminution de l'interaction de Tau et de Map1 avec la β-tubuline. A titre d'exemple, l'analyse par immunohistochimie (figure 40, C) montre une forte colocalisation de l'Hcy avec Tau conduisant à son agrégation dans le cervelet.

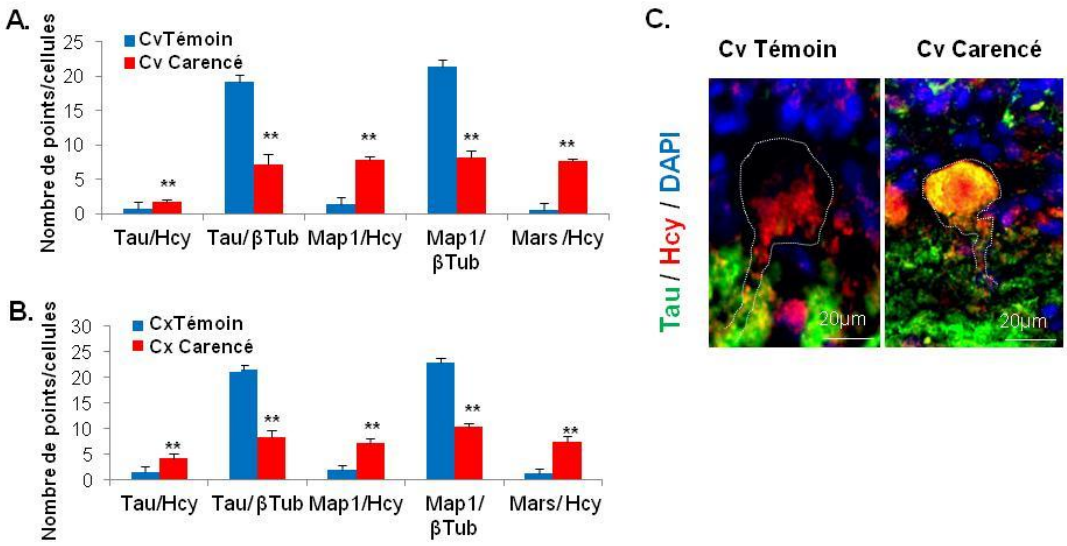


Figure 40 : Conséquences de l'homocystéinylation de Tau et Map1 dans le cervelet et le cortex de rats adultes de 6 mois.

Interaction *in situ* entre Tau/Hcy, Tau/βTubulin, Map1/Hcy, Map1/βTubulin et Mars/Hcy par *Duolink® assay* sur des coupes de cervelet (A) et du cortex (B) des animaux témoins (T) et carencés (C) (n=6). Les expériences ont été réalisées en triplicat. Différence statistiquement significative entre témoins et carencés : ** $p < 0,01$.

(C) Immunohistochimie montrant la colocalisation entre Hcy et Tau sur des coupes du cervelet des animaux témoins (T) et carencés (C) (n=6). Cette photo montre l'accumulation des agrégats de Tau dans les cellules de Purkinje (tirets blancs).

II.5. Conséquences de l'homocystéinylation des protéines du cytosquelette sur les fonctions cognitives

La désorganisation du cytosquelette est associée à de graves répercussions au niveau de la plasticité synaptique avec une perte de fonctionnalité par défaut de transport des vésicules synaptiques. Aussi, l'homocystéinylation des protéines associées aux microtubules telles Map1 et Tau conduit à leur agrégation. Or, l'hyperphosphorylation de Tau et son accumulation en agrégats dans les dégénérescences neurofibrillaires est un signe caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Sachant que la perte de mémoire est l'un des symptômes de la maladie et qu'au niveau fonctionnel, l'hippocampe est une structure clé pour l'apprentissage et la mémoire, nous avons évalué les effets de la carence en donneurs de méthyles, associée aux perturbations du cytosquelette, sur les fonctions cognitives (figure 50).

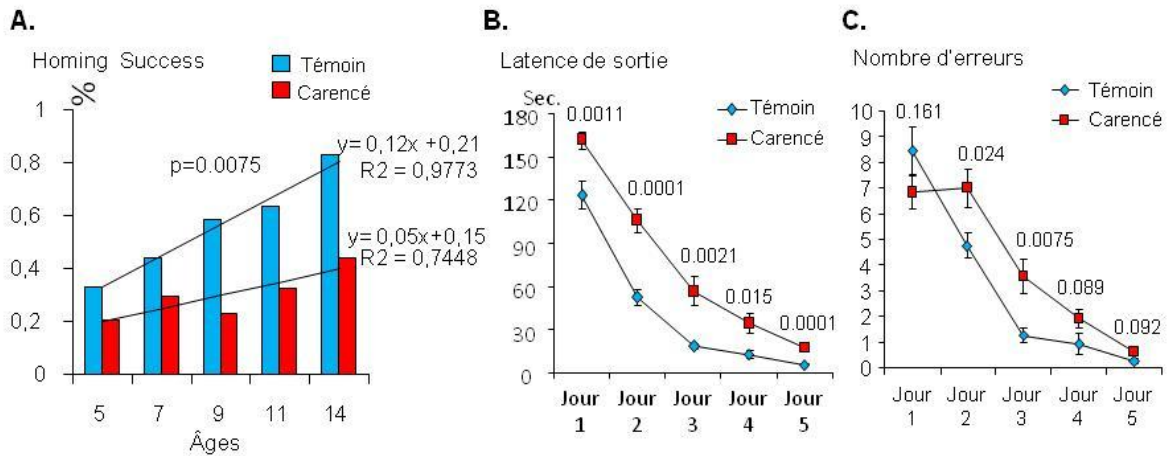


Figure 50 : Tests comportementaux d'évaluation des capacités d'apprentissage et de mémorisation.

Evaluation de la capacité d'apprentissage par (A) *Homing test* (hippocampique et non-hippocampique) ($n_{témoins}$=33, $n_{déficients}$=35) chez les ratons de 5-14 jours, (B) *Multiple T-maze* (hippocampique) ($n_{témoins}$=22, $n_{déficients}$=29) chez les ratons de 40-44 jours.

Les tests révèlent un score d'amélioration linéaire deux fois plus important chez les rats témoins comparativement aux carencés, comme le montre les pentes des courbes d'apprentissage jour après jour (F=132,9, p=0,0075) (figure 50, A). Tandis que 42% des ratons carencés réussissent le test à 14 jours avec un score d'amélioration journalier moyen de 5%, la performance dans le groupe témoins est nettement meilleure, avec un score d'amélioration moyen de 12%. Ces résultats ont été confirmés 4 semaines plus tard, à l'occasion des tests d'évaluation de l'apprentissage et des capacités mnésiques dans un labyrinthe multi-T (figure 50 B, C), avec des scores significativement plus faibles chez les animaux carencés, tant en termes de temps pour effectuer la tâche qu'en termes de nombre d'erreurs.

Dans leur ensemble, les résultats d'analyses comportementales dans les conditions de carence en donneurs de méthyles reflètent un déficit dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, notamment visuo-spatiale qui fait intervenir l'hippocampe.

Discussion

Partie I. Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la régulation transcriptionnelle au cours du développement cérébral embryonnaire

Impact des facteurs nutritionnels sur le développement

A la fin des années 1980, Barker et Osmond avaient postulé que le phénotype du fœtus puis son devenir sont influencés par de nombreux facteurs, notamment l'apport en macro-et micronutriments (Barker and Osmond, 1986). Le génome en tant que tel n'est pas modifié mais différents éléments peuvent affecter l'expression des gènes, avec des conséquences durables sur les fonctions métaboliques, susceptibles d'être transmises aux générations suivantes. Les observations épidémiologiques ainsi que des études cliniques et expérimentales supportent le concept de la « programmation fœtale » comme pouvant contribuer à la survenue d'un certain nombre de pathologies comme l'obésité, le diabète de type 2 (et donc le syndrome métabolique) ou encore les maladies allergiques. En effet, des contraintes nutritionnelles affectant le développement induiraient, en sollicitant la plasticité phénotypique, des ajustements métaboliques, physiologiques et endocriniens. Ces changements chez le fœtus et la façon dont ses organes se développent impliqueraient un ralentissement de la croissance et favoriseraient une accumulation de la masse grasse. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette programmation fœtale sont loin d'être complètement compris. La première partie de notre travail avait pour but d'étudier l'impact des facteurs alimentaires maternels sur le développement embryonnaire, en particulier du système nerveux central, et ses conséquences à court- mais aussi à long-terme.

Dans ce contexte, les carences en vitamines du groupe B (folates et vitamine B12) associées à une augmentation des concentrations en homocystéine sont susceptibles d'influencer le développement de l'embryon. De plus, leur déficience, relativement fréquente chez les femmes enceintes, a été associée à des retards de développement, tant chez l'homme (Molloy et al., 2008) que chez l'animal (Molina et al., 2008). Enfin, une telle déficience est connue pour être un facteur de risque dans l'accélération de la survenue de différentes pathologies liées à l'âge (Mattson and Shea, 2003). Pourtant, les différentes études de supplémentation en vitamines B12 ou B9 chez les personnes âgées ont donné des résultats mitigés, souvent contradictoires quant à une amélioration fonctionnelle cérébrale (Durga et al., 2007; Ford et al., 2010; Malouf et al., 2003). Toutefois, l'hypothèse de Barker qui a montré que la survenue de différentes pathologies pouvait avoir comme origine des altérations très précoces pourrait peut-être expliquer les différences d'efficacité rapportées dans ces études observationnelles. C'est sur la

base de ce postulat que nous avons conduit nos travaux sur le cerveau des individus exposés à une carence précoce, et en particulier au niveau de l'hippocampe, siège de nombreux processus cognitifs.

L'exposition précoce à une carence en donneurs de méthyles entraîne un retard de croissance et des anomalies du développement

Selon l'hypothèse proposée par la DOHaD (origines développementales de la santé et de la maladie) (Barker, 2004) une susceptibilité accrue à la survenue de certaines maladies est en partie façonnée au cours de la programmation fœtale par les liens entre la nutrition et les mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Faulk and Dolinoy, 2011; Gabory et al., 2011). Il est connu que le métabolisme du folate joue un rôle crucial dans certains de ces mécanismes, car il détermine le flux de monocarbones vers la synthèse ou la méthylation de l'ADN et de l'ARN, et régit également la méthylation des régulateurs de l'expression des gènes via la S-adénosylméthionine. Dans cet équilibre métabolique, le 5-méthyltétrahydrofolate fournit le groupement méthyle nécessaire à l'enzyme méthionine synthase (vitamine B12-dépendante) qui intervient au croisement entre les cycles des folates et de la méthionine, catalysant la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (Gueant et al., 2013a). L'acide folique influence les mécanismes épigénétiques et épigénomiques impliqués dans la programmation fœtale, le développement embryo-fœtal du cerveau et le retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Forges et al., 2007; Stover, 2011).

Au sein du laboratoire, il a été mis en évidence que l'exposition précoce à une carence en donneurs de méthyles (périodes péri-conceptionnelle, gestationnelle puis au cours de l'allaitement) entraîne un retard de croissance et des perturbations neurofonctionnelles chez les rats à l'âge de 21 jours (Blaise et al., 2007). Ces résultats sont aujourd'hui confirmés et enrichis par nos observations morphométriques sur les embryons à 20 jours de gestation. On relève un taux important d'embryons de petite taille et de petit poids chez les individus issus de mères carencées. Ceci est en grande partie le reflet d'un retard de développement précoce des animaux exposés à la carence maternelle, avec une taille significativement réduite de leurs fémurs. Ces observations sont en accord avec d'autres études où il a été montré que la concentration en folates au cours de la période embryonnaire est un facteur limitant de la progression du développement et de la croissance (Burren et al., 2008), tandis qu'il a été rapporté qu'une carence en vitamine B12 affecte le poids corporel de la progéniture (Molina et al., 2008). Les observations faites au niveau cérébral vont dans le même sens, apportant des éléments phénotypiques caractéristiques d'un retard de développement chez les animaux carencés, avec

une diminution du poids du cerveau (de l'ordre de 15%), un défaut de fermeture du tube neural visible au niveau antérieur (sutures médianes du cervelet) et postérieur (spina bifida/ queues twistées) ainsi qu'une réduction de l'épaisseur de structures spécifiques (hippocampe, SVZ) par comparaison aux animaux témoins et qui sont proportionnellement plus marquées (40%).

La carence en donneurs de méthyles perturbe le déroulement du programme neurogénique

Dans le cadre général de la neurulation, les deux grands mécanismes cellulaires impliqués sont la prolifération et la différenciation sous le contrôle d'un programme extrêmement précis, du point de vue du déroulement chronologique de l'expression des gènes impliqués, et qui correspond au programme neurogénique. Ainsi, selon nos résultats, ces différents éléments phénotypiques peuvent être reliés, au-delà d'une apoptose accrue, à l'inhibition ou l'activation prématurée de l'expression de certains gènes connus pour être impliqués dans ce programme (Copp et al., 2003). Ces gènes sont en majeure partie des facteurs de transcription bHLH (Hes1, Mash1…) dont l'expression est régulée par des mécanismes épigénétiques (méthylation/acétylation), mais aussi au niveau post-transcriptionnel par l'intervention de différents miRs (Shookhoff and Gallicano, 2010).

Des études antérieures ont mis en évidence des conséquences néfastes d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation de progéniteurs neuronaux, notamment via l'impact de l'augmentation de l'homocystéine associée à la diminution du rapport SAM/SAH aboutissant à des défauts de méthylation (Hoffman et al., 1980). Kruman et son équipe (Kruman et al., 2005) ont rapporté l'effet inhibiteur d'une carence en folates sur la prolifération des progéniteurs neuronaux d'hippocampe *in vitro* et dans les cellules progénitrices chez l'adulte *in vivo*, résultats en accord avec la sensibilité de l'hippocampe au taux d'homocystéine (Blaise et al., 2007). Que ce soit sur le modèle animal *in vivo* ou *in vitro* sur le modèle cellulaire de neuroprogéniteurs, une carence en donneurs de méthyles provoque une altération du potentiel de méthylation et des changements des régulations épigénétiques via les méthyltransférases et les histone désacétylases (Akchiche et al., 2012; Garcia et al., 2011). Cette perturbation de la méthylation pourra intervenir dans la régulation d'un certains nombres de gènes impliqués dans les différents mécanismes biologiques importants dans le développement cérébral (prolifération, différenciation, apoptose, synaptogenèse, plasticité synaptique, etc.).

Afin de cibler certains gènes dont l'expression serait particulièrement sensible à la carence en donneurs de méthyles, un screening de 84 gènes impliqués dans le développement, sur plaque PCR de 96 puits, a été réalisé.

La variation de l'expression de 41 gènes a été mise en évidence et l'analyse à l'aide du logiciel *Ingenuity pathway analysis* (IPA) a permis d'établir des réseaux d'interactions entre les produits des gènes concernés. Le réseau identifié avec le score[2] le plus élevé était : « Développement et fonctionnement du système nerveux, assemblage et organisation cellulaire ». Parmi les gènes de ce réseau, nous avons choisi de focaliser sur des gènes-clés du programme neurogénique, afin d'évaluer d'éventuelles corrélations avec les indices de perturbations développementales observées.

La carence en donneur de méthyles inhibe la voir développementale Stat3

Un gène particulièrement intéressant et dont l'expression était fortement inhibée en situation de carence, à la fois *in vivo* et *in vitro* est le gène *Stat3*. La protéine Stat3 est un acteur majeur de la prolifération cellulaire au cours du neurodéveloppement (Cheng et al., 2011; Deverman and Patterson, 2009; Dziennis and Alkayed, 2008; Murase et al., 2012) et la perturbation de son expression a été décrite dans certaines neuropathologies (Abou-Ghazal et al., 2008; Priester et al., 2013; Rummel et al., 2004). La voie Stat3 intervient à la fois dans la prolifération, la survie, la croissance et la différenciation des cellules neuronales au cours du développement cérébral (Cheng et al., 2011; Deverman and Patterson, 2009). Dans le cerveau adulte Stat3 n'est fortement exprimée que dans les zones neurogéniques (gyrus denté, SVZ) et son expression peut être induite à la suite d'un dommage lésionnel (Xia et al., 2002). Chez les rongeurs, Stat3 est exprimée en permanence à partir du stade embryonnaire E14 jusqu'à 3 mois après la naissance. Au cours du développement postnatal, son expression augmente entre le 3ème jour postnatal (PN3) et PN21 (Dziennis and Alkayed, 2008). Or, nos résultats montrent que l'expression de Stat3 aux niveaux transcriptionnel et protéique est diminuée dans les conditions de carence, en accord avec les résultats du screening. Nous avons également observé une diminution de la phosphorylation de Stat3 (Tyr705/Ser727), soit une inactivation de la voie Stat3, corrélée avec une diminution du marquage nucléaire de phospho-Stat3 dans les tissus et les cellules en culture en condition de carence.

MiR-124 inhibe la voie Stat3 en condition de carence en donneur de méthyles

La phosphorylation de Stat3 implique plusieurs kinases qui sont affectées différemment par la privation en donneurs de méthyles. Les facteurs de croissance tels que le facteur de croissance épidermique (EGF) stimulent la phosphorylation de Stat3 sur le résidu tyrosine par

[2] Le score est dérivé d'une valeur p et indique la probabilité que les gènes cibles dans un réseau soient associés par hasard. Ainsi, un score de 2 indique qu'il y a une chance de 1/100 que les gènes aient été identifiés par hasard, soit un pourcentage de 99% de confidence pour les résultats obtenus.

leur activité tyrosine kinase ou via Src (Zorina et al., 2010), tandis que la phosphorylation des résidus sérine a lieu via les MAP kinases (ERK 1/2) et d'autres kinases à sérine comme la sérine-thréonine kinase Akt (Decker and Kovarik, 2000). Dans nos modèles, phospho-ERK1/2, phospho-Src et phospho-p38 ont été réprimées consécutivement à la carence, suggérant leur rôle potentiel dans les conséquences physiopathologiques observées. Alors que Akt ne semble pas être impliquée, l'expression de phospho-JNK a été augmentée, une observation cohérente avec la régulation négative potentielle de Stat3 par JNK (Lim and Cao, 1999).

Les microARN constituent une classe étendue de petits ARN non-codants qui contrôlent l'expression des gènes d'une manière post-transcriptionnelle. À cet égard, Stat3 a été identifiée comme une cible de miR-124 (Krichevsky et al., 2006), le microARN le plus abondant dans le cerveau des mammifères (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2005). L'identification récente d'un rôle central pour miR-124 dans la plasticité synaptique (Rajasethupathy et al., 2009) rend l'analyse de l'expression de ce microARN particulièrement intéressante dans le cadre de l'étude du développement cérébral. miR-124 régule Stat3 soit par inhibition de la phosphorylation sur le résidu Tyr705 (Krichevsky et al., 2006), soit, comme cela a été démontré plus récemment, en ciblant la région 3'UTR du gène de Stat3 pour aboutir à la répression de l'expression de la protéine (Cai et al., 2012). Dans nos modèles *in vivo* et *in vitro*, l'expression de miR-124 était augmentée en condition de carence en donneurs de méthyles, ce qui suggère un rôle clé pour miR-124 sur la voie de signalisation Stat3 en réponse à la déficience en vitamine B12 et B9.

MiR-124 régule négativement les kinases ERK1/2 et Src

Ces résultats ont été renforcés par nos expériences complémentaires utilisant la transfection de siARN. En effet, l'invalidation de miR-124 (~90%) dans les cellules H19-7 a permis de rétablir la fonctionnalité de la voie de signalisation Stat3 dans les cellules déficientes en folates, notamment en permettant la phosphorylation et l'activation des kinases ERK1/2 et Src.

De plus, le traitement par siARN a notablement amélioré le phénotype des cellules carencées, avec une augmentation significative du nombre de prolongements cellulaires. Comme mentionné ci-dessus, ERK1/2 et Src phosphorylent Stat3 respectivement sur son résidu Ser727 et Tyr705, la phosphorylation de ces deux résidus étant nécessaire pour l'activation du facteur de transcription et sa dimérisation. Tandis que miR-124 a été récemment identifié comme un régulateur négatif des MAP kinases ERK1/2 (Yamane et al., 2013), notre travail constitue la première démonstration d'une régulation négative de l'activité de Src par miR-124.

Bien que les mécanismes précis par lesquels le statut en vitamine B peut influencer l'expression de miR-124 restent à élucider, l'existence d'un lien entre les folates et certains miRs a déjà été documentée. Ainsi, l'expression altérée de différents miRs dans le cerveau fœtal de souris mutante sujette à des défauts du tube neural (Splotch$^{-/-}$) a été restaurée par une supplémentation en acide folique chez la mère (Ichi et al., 2010). Enfin, une étude a montré que la carence en folates modifie le profil d'expression de plusieurs miRs dans les cellules lymphoblastoïdes humaines en culture (Marsit et al., 2006). Par ailleurs, une régulation épigénétique de l'expression des miRs a été récemment décrite (Sato et al., 2011). A ce titre, le niveau de méthylation influencerait l'expression des gènes codant miR-124 (Wang et al., 2013a).

L'inhibition de la voie Stat3 est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et à une augmentation de l'apoptose neuronale

L'expression de miR-124a est augmentée dans les conditions de déficience en donneurs de méthyles, ce qui conduit à une diminution de la phosphorylation de Stat3 et à une inactivation de cette voie. Le facteur de transcription Stat3 joue un rôle prépondérant dans les processus de survie cellulaire, le maintien de l'état indifférencié des cellules, et la neuroprotection (Zhao et al., 2011). La diminution de son activation par phosphorylation en situation de carence participerait à l'induction prématurée de la différenciation des cellules mais pourrait également être responsable d'une diminution de la survie cellulaire, comme en témoigne la diminution de l'expression de protéines anti-apoptotiques cibles comme Bcl-2 et Bcl-xL dans nos modèles expérimentaux. Ces données sont en accord avec les analyses morphologiques. En effet, il a été précédemment rapporté une augmentation de l'apoptose neuronale dans le cerveau des rats de 21 jours nés de mère carencée (Blaise et al., 2007), ainsi qu'un taux élevé de mort cellulaire par apoptose dans les cellules H19-7 carencées en folates (Akchiche et al., 2012). De même, la répression de la voie Stat3 en condition de carence pourrait jouer un rôle dans la diminution de l'épaisseur des couches cellulaires de l'hippocampe et de la zone subventriculaire que nous avons observée chez les embryons carencés et qui persiste jusqu'aux stades de vieillissement cérébral.

La carence en donneurs de méthyles perturbe la voie Notch, un autre acteur majeur du programme neurogénique

En parallèle, il est connu que l'activation de Stat3 par phosphorylation (Tyr705/Ser727) est Notch-dépendante (Gouti and Gavalas, 2008). Or, Notch et son ligand Dll1 figurent parmi les gènes dont l'expression est modifiée par la carence en donneurs de méthyles. Aussi, nous avons approfondi notre étude par l'analyse de l'expression des protéines impliquées dans la voie Notch.

Nous avons ainsi observé une diminution de l'expression du facteur de transcription Hes1 qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de Mash1. En conditions normales, l'expression transcriptionnelle du gène *Hes1* nécessite la liaison de Dll1 à son récepteur Notch. Son expression induit la répression du facteur de transcription Mash1, nécessaire à l'expression des gènes pro-neuraux comme les neurogénines Ngn1/2/3 (Fode et al., 2000). La voie Notch est impliquée dans le maintien du renouvellement des cellules souches neurales et interagit avec de nombreux autres acteurs influençant la balance prolifération/différenciation (Nagao et al., 2007). Des travaux en cours au laboratoire, portant sur la perturbation de l'expression des miRs en lien avec la carence en donneurs de méthyles, ont montré l'implication de miR-34 dans la régulation négative de la voie Notch. MiR-34 est connu pour réprimer Dll1 (de Antonellis et al., 2011), ce qui a pour conséquence une inhibition de la voie de prolifération et une diminution de l'expression de Hes1 aboutissant à une expression prématurée de Mash1 et une induction inapproprié de la différenciation des progéniteurs via l'expression des gènes pro-neuraux.

L'inhibition de la voie Notch est impliquée dans les défauts de fermeture du tube neural

Mash1 est connue pour contrôler l'induction temporelle de la différenciation (Sugimori et al., 2007) au cours du développement. Il a été montré que l'inactivation de Hes1 et l'expression inappropriée de Mash1 au cours de la neurulation entraînent l'expression précoce de marqueurs de différenciation neuronale et des anomalies de fermeture du tube neural au niveau du crâne (Copp et al., 2003). Une autre étude a rapporté un lien entre les perturbations d'expression de Hes1/Mash1, en relation avec des défauts de développement du tube neural et des mécanismes épigénétiques folates-dépendants (Ichi et al., 2010). Ces données sont en accord avec nos résultats qui montrent que la carence en donneurs de méthyles est associée à un phénotype « queue twistée », évocateur d'un défaut de fermeture du tube neural postérieur.

Trim71 participe au défaut de fermeture des sutures du cervelet

Nous avons mis en évidence une plus grande fréquence d'ouverture de la suture médiane du cervelet et des hémisphères cérébraux chez les embryons de 20 jours carencés par rapport aux témoins. Ceci nous a conduits à analyser l'expression de Trim71, protéine nécessaire à l'initiation et à la fermeture du tube neural et dont l'expression est régulée par les microARN miR-125 et Let7 exprimés à la jonction entre le mésencéphale et le rhombencéphale (Kloosterman et al., 2006). En conditions normales, Trim71 est exprimée très tôt dans le neuroépithélium où elle contrôle la régulation temporelle de la différenciation cellulaire (Slack et al., 2000), un défaut de son expression pourra ainsi jouer un rôle dans les défauts de fermeture du tube neural. Au

moment de la fermeture du tube neural, son expression est normalement réprimée par Let-7, permettant la fermeture totale (Maller Schulman et al., 2008). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire associent une surexpression de Let7 à la carence en donneurs de méthyles. L'étude de Maller Schulman (Maller Schulman et al., 2008) montre que la perte de Trim71 est responsable de défauts de fermeture du tube neural pouvant être létaux, mais ne définit pas les mécanismes impliqués. Ainsi, la diminution de l'expression de Trim71 dans notre modèle de carence est en accord avec les observations morphologiques, particulièrement au stade E20 qui présente un fort taux d'ouverture de la suture médiane du cerveau.

Pour conclure cette première partie de notre travail nous avons montré que la carence en donneurs de méthyles est responsable d'une diminution des acteurs des voies de prolifération et de survie cellulaire associée à une augmentation inappropriée de l'expression de gènes pro-neuronaux impliqués dans la différenciation, deux processus cellulaires dans lesquels interviennent des mécanismes épigénétiques, notamment via les microARN (figure 51). Les conséquences directes sont des modifications de la balance entre prolifération et différenciation en lien avec l'activation ou l'inactivation de gènes à des moments inopportuns, affectant ainsi le développement du SNC.

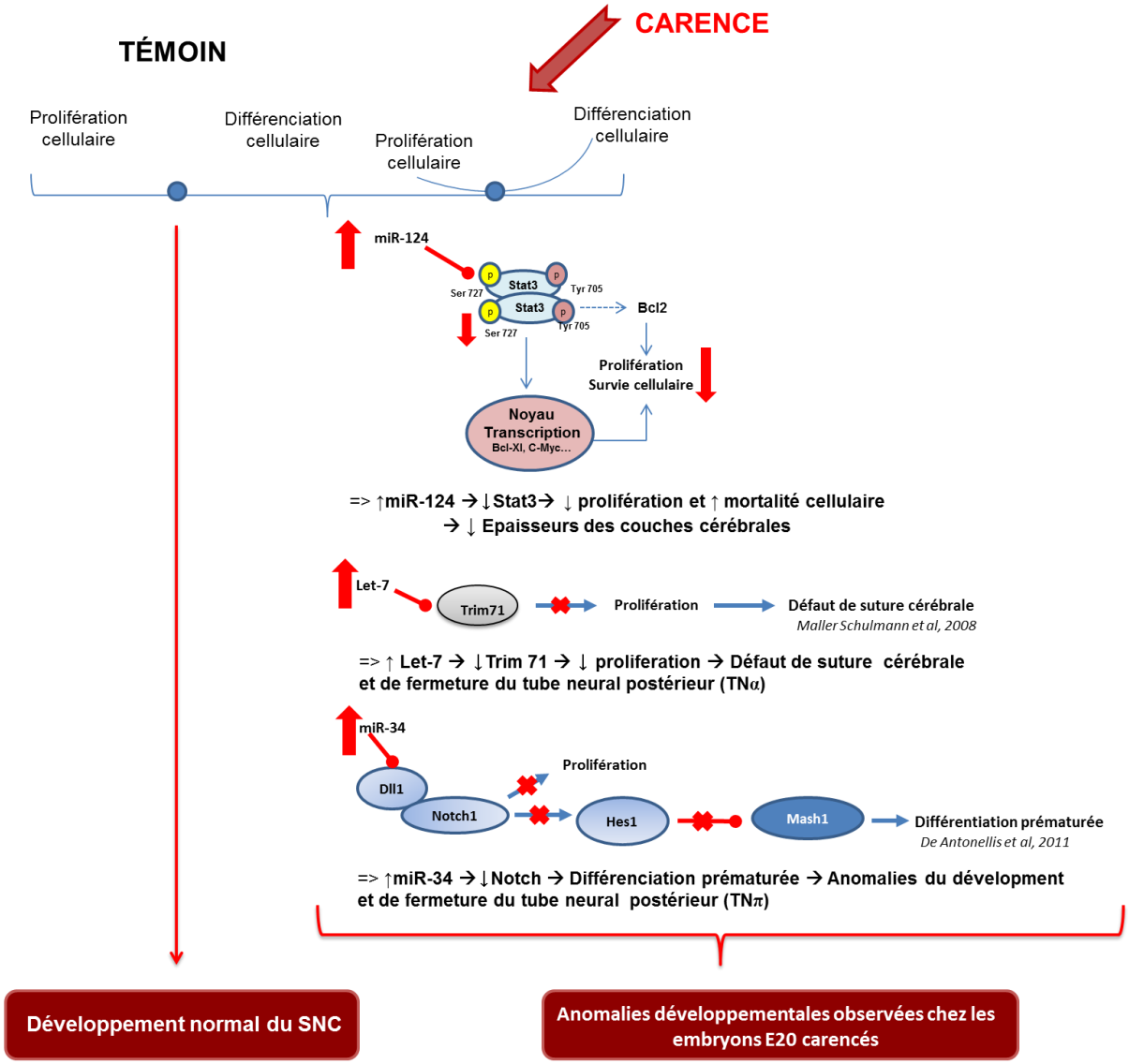


Figure 51 : Effets de la carence sur le développement du SNC.

Schéma de synthèse représentant les conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la balance entre prolifération et différenciation en lien avec une altération de la régulation épigénétique du programme neurogénique par action des microARN. Ce schéma montre les mécanismes qui, selon nos propres résultats, semblent impliqués dans la survenue des anomalies développementales chez les embryons E20 carencés en donneurs de méthyles.

Partie II. Carence en donneurs de méthyles et développement cérébral : perturbations de la plasticité synaptique par régulation post-traductionnelle

Les résultats de la partie précédente ont montré que, suite à une carence en vitamines B, les altérations du métabolisme des monocarbones, associées à une réduction du potentiel de méthylation, sont à l'origine d'une répression de la neurogenèse et de troubles de la différenciation cellulaire, en lien avec des altérations transcriptionnelles. Certains mécanismes épigénomiques peuvent se produire au niveau post-traductionnel. La deuxième partie de notre travail avait pour but l'étude de telles modifications qui, en lien avec la carence en donneurs de méthyles, sont susceptibles de perturber la différenciation neuronale.

La carence en folates affecte le métabolisme des monocarbones et augmente l'expression des histone désacétylases dans les progéniteurs hippocampiques H19-7

La carence en folates dans les neuroprogéniteurs en culture est associée à une augmentation des taux d'homocystéine et à une diminution de la disponibilité en SAM et du ratio SAM/SAH. Ceci va conduire à des modifications des réactions de transméthylation, essentielles dans les mécanismes épigénétiques/épigénomiques. La différenciation des cellules progénitrices en neurones fonctionnels nécessite l'expression finement régulée d'un ensemble de gènes spécifiques, avec un certain nombre d'étapes orchestrées spatio-temporellement. Les modifications épigénétiques/épigénomiques de l'ADN et des histones émergent comme des processus fondamentaux par lesquels les neurones adaptent leur réponse transcriptionnelle en fonction du stade de développement et des paramètres environnementaux (Hirabayashi and Gotoh, 2010). Dans ce contexte, nous avons montré que la carence en folates augmente l'expression des régulateurs épigénomiques HDACs. Les HDACs régulent de nombreux processus biologiques importants, notamment la prolifération cellulaire et la différenciation, en formant des complexes avec divers facteurs de transcription et corégulateurs transcriptionnels (Haberland et al., 2009). Il a ainsi été démontré que l'inactivation pharmacologique des HDACs favorise la différenciation neuronale (Yu et al., 2009b). Dans notre modèle, l'utilisation de SAHA, un inhibiteur non sélectif des HDACs, a amélioré la différenciation des progéniteurs, comme en témoignent l'étude morphologique des neurones et le comptage du nombre de neurites par cellule.

La carence en folates diminue la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation des progéniteurs hippocampiques

Dans ce modèle cellulaire, il a été préalablement montré que la différenciation des progéniteurs en neurones matures est associée à une perte cellulaire par apoptose, comme c'est le

cas *in vivo* au cours du développement cérébral. Ce processus mobilise la voie mitochondriale intrinsèque initiée par ERK1/2 et fait intervenir les caspases 9 et 3 (Akchiche et al., 2010). Nous avons montré que la situation de carence en folates amplifie ce phénomène en augmentant la perte du potentiel de membrane mitochondrial, l'activation des caspases 9 et 3 et la perte cellulaire. Ce processus ferait intervenir une répression de la protéine phosphatase PP2A, en lien avec une augmentation de la cycline E et une ré-entrée des neurones différenciés dans le cycle cellulaire, prélude à la mort neuronale. A ce titre, PP2A a été décrite comme étant impliquée dans la régulation de l'apoptose (Andrabi et al., 2007) et dans l'activité des G1 kinases cycline-dependantes (Yan and Mumby, 1999). La carence en folates d'une part diminue la prolifération des cellules H19-7 dans leur phase « progéniteurs » et, d'autre part, elle les fragilise à l'apoptose développementale après induction de leur différenciation.

La carence en folates perturbe l'activité et la plasticité synaptiques

Il est établi que la transmission synaptique et la plasticité sont particulièrement sensibles aux facteurs environnementaux, et un dysfonctionnement synaptique intervient précocement dans la pathogenèse de diverses maladies neurologiques (Mattson et al., 2000). Les folates et la SAM peuvent moduler l'activité synaptique des neurones et accroître leur vulnérabilité aux agressions (Kruman et al., 2000). La maturation des compartiments fonctionnels post-synaptiques implique une machinerie spécialisée pour la formation des « clusters » au niveau des dendrites qui vont permettre la fonctionnalité des synapses (Bourne and Harris, 2008). Ainsi, le niveau de regroupement de PSD-95 (*« clustering »*) pourrait être directement lié à l'activité et l'intégrité synaptique dans les neurones hippocampiques (Farias et al., 2009). Dans notre modèle de carence cellulaire l'expression et le « *clustering* » de PSD-95 ont été notablement réduits. De la même façon, l'expression de la synaptotagmine I, qui reflète le recyclage des synapses (Kraszewski et al., 1995), est également réduite au niveau des axones des cellules carencées en folates.

La carence en folates entrave la formation des microtubules au cours de la différenciation

La différenciation des neurones implique une réorganisation marquée du cytosquelette impliquant les filaments d'actine qui régissent la formation et l'organisation du cône de croissance, et les microtubules qui régulent l'élongation et la stabilisation des axones et des dendrites (Witte et al., 2008). Ainsi, le dynamisme des microtubules et de l'actine est important pour la spécification et le développement des deux types de prolongements cellulaires. Loin d'être de simples éléments de structure, les microtubules apparaissent comme des facteurs déterminants de la polarité neuronale. Nous avons montré que cette polarité est perdue lors d'une

carence en folates, en lien avec la localisation perturbée des différentes protéines du cytosquelette (β-Tubuline, α-tubuline, α-tubuline acétylée et Map2) et une diminution à la fois du nombre et de la longueur des neurites.

En outre, il a été documenté qu'un faible apport en folates était lié à l'échec de la méthylation post-traductionnelle du cytosquelette nécessaire à la différenciation du tissu neural (Bjorklund and Gordon, 2006). On se serait alors attendu à une diminution plus marquée de l'expression des différentes protéines en cas de traitement des cellules par un agent déméthylant (5-Azacytidine). Or ce n'est pas le cas ; le phénomène de compensation observé aboutit à l'hypothèse d'une hypométhylation du promoteur causé par l'agent déméthylant, associée à une surexpression du gène, et par conséquent de la protéine. Pourtant, la diminution de l'expression des protéines observée dans le cas de la carence en absence de traitement avec l'agent déméthylant suggère qu'il ne s'agit pas d'une régulation transcriptionnelle, mais plutôt d'une altération de la stabilité post-traductionnelle. Le traitement par l'agent acétylant (SAHA) augmente l'expression de l'α-tubuline acétylée et restaure la polarisation cellulaire, confirmant qu'il s'agit en effet d'une modification post-traductionnelle. Ce processus passe probablement par une inhibition de l'histone désacétylase HDAC6 qui est surexprimée dans notre modèle en conditions de carence. En effet, contrairement à d'autres histone désacétylases ayant une activité de remodelage de la chromatine, HDAC6 est connue pour catalyser la désacétylation des substrats cytoplasmiques, y compris l'α-tubuline qui joue un rôle clé dans la polarité cellulaire (Hubbert et al., 2002).

La carence en folates induit des modifications post-traductionnelles par homocystéinylation de composants du cytosquelette dans les progéniteurs neuronaux

Un résultat particulièrement marquant de notre étude est la démonstration d'une homocystéinylation de certains composés du cytosquelette, avec l'agrégation subséquente de protéines telles que les protéines motrices associées au transport synaptiques (kinésine et dynéine) et les protéines associées aux microtubules (Map1, Map4 et Tau). Nous avons montré que ces observations étaient directement en lien avec l'accumulation d'homocystéine en obtenant des résultats similaires avec l'ajout d'homocystéine thiolactone dans le milieu de culture.

La démonstration des modifications post-traductionnelles de protéines neuronales par l'Hcy et son congénère cyclique, l'Hcy thiolactone, émerge comme étant d'un grand intérêt pour résoudre la controverse concernant le rôle de l'Hcy en tant que médiateur/agent causal dans la pathogenèse cérébrale. Par ailleurs, il a été rapporté une association entre les pathologies associées à l'Hcy et la mise en jeu d'un stress oxydant...

L'homocystéinylation des protéines motrices kinésine et dynéine a été confirmée par différentes approches, et ces modifications post-traductionnelles s'accompagnent d'une diminution de l'interaction avec les protéines partenaires, reflétant une perte de fonctionnalité. Or, le trafic synaptique joue un rôle primordial dans la formation des synapses, leur plasticité et leur fonctionnalité (Schlager and Hoogenraad, 2009). Cette perturbation des protéines motrices peut être directement reliée à la diminution du fonctionnement et de la plasticité synaptique que nous avons observés dans le modèle cellulaire (« *clustering* » du PSD-95) et a été confirmée *in vivo* dans le modèle de carence gestationnelle en donneurs de méthyles. La réduction du niveau d'expression des protéines motrices peut s'expliquer par la dégradation, via le protéasome, des protéines qui sont soumises à des dommages oxydatifs suite à leur liaison avec l'homocystéine. En effet, des preuves chimiques ont établi un lien de causalité entre les protéines liées à l'Hcy et les dommages oxydatifs (Sibrian-Vazquez et al., 2010).

L'homocystéinylation des protéines associées aux microtubules, Tau, Map1 et Map4 a également été associée à la diminution de leur capacité de liaison aux protéines partenaires et ce mécanisme pourrait participer à la perte de polarité observée dans nos cellules carencées en folates. En accord avec ces résultats, Karima et al. (Karima et al., 2012) ont rapporté que la N-homocysteinylation *in vitro* de la protéine Tau humaine (isoforme 4R/1N) inhibait sa fonction via une altération de la liaison spécifique Tau-tubuline, empêchant ainsi la liaison de Tau aux microtubules.

Au total, un screening par co-immunoprécipitation de l'Hcy suivie d'une analyse en spectrométrie de masse a permis d'identifier une vingtaine de protéines homocystéinylées associées aux cytosquelettes.

La N-homocystéinylation des protéines est associée à leur agrégation et à la perte de leur fonctionnalité

Des études *in vitro* ont montré que la N-homocystéinylation des protéines conduit à leur agrégation, formant ainsi des sortes de fibrilles, comme les fibrilles de l'insuline (Yousefi et al., 2012) mais aussi les fibrilles de type β-amyloïde, un facteur associé à la survenue de la maladie d'Alzheimer (Karima et al., 2012; Paoli et al., 2010). De même, il a été suggéré un lien entre cette pathologie et une diminution de l'activité de l'homocystéine thiolactonase (Suszynska et al., 2010). Un mécanisme récemment proposé impliquerait une toxicité de l'Hcy par homocystéinylation de certaines protéines. Cette modification post-traductionnelle pourrait conduire à l'acquisition d'un caractère amyloïdogène (Paoli et al., 2010; Stroylova et al., 2012). Ces données ont été obtenues *in vitro* en montrant que la N-homocystéinylation des α(S1)-, β-

and κ-caséines provoque un changement de leurs propriétés et de leur structure par augmentation de leur contenu en feuillet β, transformation caractéristique des peptides β-amyloïdes (Stroylova et al., 2011). En plus, Khodadadi et al. (Khodadadi et al., 2012) ont montré que, tout comme la présence d'homocystéine elle-même, l'homocystéinylation des résidus lysine contribue à augmenter la neurotoxicité du peptide Aß.

Nos résultats obtenus sur l'homocystéinylation de la protéine Tau sont en parfaite concordance avec les observations précédentes. En effet, nous avons montré des agrégats et une perte de la fonctionnalité de la protéine Tau suite à son homocystéinylation conduisant à une diminution de l'interaction de la protéine Tau avec la β-tubuline, empêchant ainsi la liaison aux microtubules. De la même façon, une telle altération de la liaison spécifique Tau-tubuline a été récemment montrée par des expériences d'homocystéinylation *in vitro* (Karima et al., 2012).

D'autres protéines liées aux microtubules sont importantes pour la formation des neurites. C'est le cas en particulier de Map2 (Caceres et al., 1992), alors que Map1 et Map4 sont plutôt nécessaires à la formation des axones et au fonctionnement synaptique (Dehmelt and Halpain, 2004; DiTella et al., 1996). L'agrégation de Tau avec les Map de haut poids moléculaire (MAP1 et Map2) pourra être à l'origine d'un désassemblage du cytosquelette (Alonso et al., 1997). L'accumulation de ces deux Map est aussi responsable de la formation des corps de Lewy, agrégats anormaux de protéines qui se forment à l'intérieur des cellules nerveuses au cours de la maladie de Parkinson (Galloway et al., 1989; Pollak et al., 2003). Ainsi, dans le cadre des maladies neurodégénératives, le cytosquelette neuronal émerge comme cible thérapeutique potentielle (Benitez-King et al., 2004). Pour notre part, nous avons montré l'homocystéinylation de Map1 et Map2 en situation de carence en donneurs de méthyles. L'ensemble de ces résultats fait actuellement l'objet de la rédaction d'un article et d'un dépôt de brevet.

La carence en donneurs de méthyles est associée à l'homocystéinylation de composés des microfilaments et des neurofilaments

La spectrométrie de masse nous a permis d'identifier d'autres cibles de la N-homocystéinylation, dont certaines qui se lient microfilaments d'actine ou aux neurofilaments.

L'agrégation de la cofiline, une protéine de liaison à l'actine, sera susceptible de bloquer le transport et induire ainsi une perte synaptique dans les neurones hippocampiques (Cichon et al., 2012). En cas de stress, l'activation de la liaison de la cofiline à l'actine conduit à la formation d'une sorte de faisceaux (« *Cofilin/Actin-Rods* »). La formation de ces faisceaux diminue la disponibilité de l'actine nécessaire à la polarisation neuronale et semble ainsi intervenir dans le

cadre de certaines maladies neurodégénératives (Bamburg et al., 2010; Munsie and Truant, 2012). Nous avons également montré que l'actine était homocystéinylée, s'aggrégeait et n'interagissait plus avec ses partenaires protéiques. D'autres part, des études ont montré l'accumulation des neurofilaments (chaînes loudes et légères) suite à certains troubles neurologiques (Gaiottino et al., 2013; Kuhle et al., 2011). De plus, des agrégats de neurofilaments ont été rapportés dans les neurones moteurs de la moelle épinière de patients souffrant de la sclérose latérale amyotrophique (Mendonca et al., 2005). Nous avons étudié l'agrégation de ces différents types de protéines et leur liaison à l'homocystéine. Les données obtenues confirment notre hypothèse d'agrégation de protéines neuronales par N-homocystéinylation. Ces résultats feront l'objet d'une future publication en cours de préparation.

La carence en donneurs de méthyles induit l'homocystéinylation de Tau, Map1 et Map4 chez le rat *in vivo* et une perte des capacités cognitives

Nous avons montré que l'homocystéinylation des protéines neuronales décrite sur le modèle cellulaire était également présente *in vivo*. Tandis qu'elle a pu être observée à l'état basal dans le cerveau des rats témoins, cette homocystéinylation protéique était considérablement augmentée dans le cerveau des rats nés de mère carencée en donneurs de méthyles ou carencés à l'âge de 6 mois. Ceci est en accord avec des résultats obtenus antérieurement sur les protéines plasmatiques et qui montrent l'existence d'une N-homocystéinylation à l'état basal chez des sujets sains (Mendonca et al., 2005). Des travaux avaient par la suite montré la présence des protéines homocystéinylées à un niveau deux fois plus élevé chez des patients présentant une hyperhomocystéinémie (Perna et al., 2006). La N-homocystéinylation étant irréversible, nos résultats suggèrent des altérations fonctionnelles cérébrales durables, hypothèse en accord avec la démonstration d'une association entre sa présence en grande quantité et certaines maladies (Perna et al., 2006).

Différentes études ont montré, tant chez l'homme (Barbaux et al., 2000) que chez l'animal (Lalonde et al., 2008; Lee et al., 2005), qu'il existait une diminution des capacités cognitives et des aptitudes motrices en réponse à une élévation de la concentration en homocystéine. A cet égard, nous avons montré que les rats carencés en donneurs de méthyles présentaient un retard dans leurs capacités d'apprentissage-mémorisation spatiale (test du Homing) par comparaison aux animaux témoins du même âge.

Cette perte des capacités cognitives est caractéristique de certaines pathologies liées au vieillissement, telles que la maladie d'Alzheimer. Or, la survenue de cette maladie est fréquemment associée à une augmentation des taux d'Hcy plasmatique (Czapski et al., 2012;

Ray et al., 2013; Zhang et al., 2008a). De plus, dans notre modèle de carence, PP2A se trouve réprimée. Or, PP2A est impliquée dans la déphosphorylation de la protéine Tau (Wang et al., 1995), son expression et son activité étant diminuées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Sontag et al., 2004; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001). Différents auteurs ont émis une hypothèse associant la maladie d'Alzheimer à une réduction de la méthylation de la protéine PP2A dans un contexte d'hyperhomocystéinémie (Sontag et al., 2008; Tolstykh et al., 2000; Vafai and Stock, 2002).

Conclusions et Perspectives

L'ensemble de nos travaux montre qu'une altération du métabolisme des monocarbones engendrée par une carence en folates affecte la neurogenèse et induit des troubles de la différenciation neuronale par perturbation du programme neurogénique.Ces anomalies mettent en jeux des mécanismes épigénomiques impliquant la méthylation, l'acétylation et les microARNs aboutissant à des altérations de voies de signalisation cruciales lors du développement, comme les voies Stat3 et Notch1. Ces défauts de différenciation affectent des protéines du cytosquelette, aboutissant à une croissance anormale des neurites, des dysfonctionnements synaptiques associés à des processus d'agrégation irréversible des protéines structurales suite à leur homocystéinylation.

Ces différents processus vont perturber la mise en place des réseaux neuronaux au cours du développement cérébral et conduire à une atrophie cérébrale. Ils seront associés à plus long terme à des défauts de maturation et à des atteintes fonctionnelles telles que le retard dans l'acquisition de différentes capacités (apprentissage et mémorisation), ainsi que nous l'avons observé dans notre modèle animal.

Nos résultats apportent des données nouvelles qui permettent une meilleure compréhension des effets néfastes d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles, principalement folates et vitamine B12, sur le développement du cerveau et son activité fonctionnelle à plus long terme, avec en particulier un risque accru de neuropathologie.

Sur le plan mécanistique, il serait intéressant de poursuivre ce travail en approfondissant l'étude des voies de signalisation comme les voies Notch et Trim71 pour identifier les processus par lesquels ces deux voies interfèrent avec la fermeture du tube neural dans notre modèle de carence. Il s'avère aussi important d'étudier les mécanismes épigénomiques en amont, notamment par l'analyse des miRs connus pour participer à la régulation chronologique du programme neurogénique (Bae et al., 2012; Ichi et al., 2010; Maller Schulman et al., 2008).

A l'heure actuelle, les femmes enceintes bénéficient d'une supplémentation systématique en folates au cours du premier trimestre de la grossesse. Les données épidémiologiques ont montré l'intérêt d'une telle supplémentation pour la réduction de la prévalence de pathologies congénitales comme le spina bifida ou les fentes labio-palatines.

En France, cette recommandation semble encore insuffisamment prise en compte et l'Inpes fait campagne pour sensibiliser les professionnels de santé. Il n'existe aucune recommandation relative à la poursuite de la supplémentation en folates au-delà du premier trimestre, alors que la mise en place fonctionnelle des structures s'effectue tout au long de la grossesse et se poursuit après la naissance, en particulier dans certaines structures comme le cervelet.

Au vu de nos résultats qui révèlent des effets délétères irréversibles (agrégation protéiques) d'une carence en vitamines B aux différents stades du développement et de la maturation cérébrale, il nous paraît intéressant d'étudier, sur notre modèle animal, les effets potentiels d'une supplémentation plus tardive des femelles gestantes, c'est-à-dire aux périodes correspondant aux deuxième et/ou troisième trimestre de grossesse, voire en période périnatale. Cela permettrait de mettre en évidence et de prévenir la mise en place d'anomalies survenant plus tardivement au cours de la gestation et affectant principalement la fonctionnalité et la plasticité cérébrale.

D'autre part, la plupart des maladies neurodégénératives sont associées à une accumulation de protéines ayant des propriétés physico-chimiques modifiées (mal repliées ou agrégées) dans le système nerveux central (Shelkovnikova et al., 2012). Les principales protéines décrites dans ce cadre sont les peptides amyloïdes (Aß), Tau, l'α-synucléine, et la TDP-43 (*transactive response DNA binding protein 43*), qui sont impliquées respectivement dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS) (Kovacs et al., 2013). Pour ce type de désordre désigné également comme protéinopathie, les troubles sont étroitement liés à l'agrégation de ces protéines et conduisent à une mort neuronale. Pourtant, le rôle précis de l'agrégation des protéines dans la dégénérescence cellulaire n'est pas clairement compris, et compte-tenu du caractère irreversible et cumulatif au cours du temps de l'homocystéinylation et de l'agrégation de protéines neuronales dans nos modèles expérimentaux, il serait important d'étudier l'homocystéinylation de ces protéines dans le cadre des pathologies, en associant des analyses sur des biopsies du cerveau de patients.

Références Bibliographiques

Abou-Ghazal, M., Yang, D.S., Qiao, W., Reina-Ortiz, C., Wei, J., Kong, L.Y., Fuller, G.N., Hiraoka, N., Priebe, W., Sawaya, R. and Heimberger, A.B. (2008) The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas. *Clin Cancer Res*, **14**, 8228-8235.

Abrajano, J.J., Qureshi, I.A., Gokhan, S., Zheng, D., Bergman, A. and Mehler, M.F. (2009) REST and CoREST modulate neuronal subtype specification, maturation and maintenance. *PLoS One*, **4**, e7936.

Adinolfi, L.E., Ingrosso, D., Cesaro, G., Cimmino, A., D'Anto, M., Capasso, R., Zappia, V. and Ruggiero, G. (2005) Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*, **41**, 995-1003.

Ajamian, F., Suuronen, T., Salminen, A. and Reeben, M. (2003) Upregulation of class II histone deacetylases mRNA during neural differentiation of cultured rat hippocampal progenitor cells. *Neurosci Lett*, **346**, 57-60.

Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourie, C., Kerek, R., Martin, N., Pourie, G., Koziel, V., Helle, D., Alberto, J.M., Ortiou, S., Camadro, J.M., Leger, T., Gueant, J.L. and Daval, J.L. (2012) Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *Faseb J*, **26**, 3980-3992.

Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourie, C., Pourie, G., Koziel, V., Nedelec, E., Gueant, J.L. and Daval, J.L. (2010) Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus*, **20**, 949-961.

Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S. and Iqbal, K. (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 298-303.

Alpert, J.E., Mischoulon, D., Nierenberg, A.A. and Fava, M. (2000) Nutrition and depression: focus on folate. *Nutrition*, **16**, 544-546.

Altmae, S., Stavreus-Evers, A., Ruiz, J.R., Laanpere, M., Syvanen, T., Yngve, A., Salumets, A. and Nilsson, T.K. (2010) Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertil Steril*, **94**, 130-137.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M. and Tramontin, A.D. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 287-293.

Andersen, C.B., Madsen, M., Storm, T., Moestrup, S.K. and Andersen, G.R. (2010) Structural basis for receptor recognition of vitamin-B(12)-intrinsic factor complexes. *Nature*, **464**, 445-448.

Andersson, A., Brattstrom, L., Israelsson, B., Isaksson, A., Hamfelt, A. and Hultberg, B. (1992) Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest*, **22**, 79-87.

Andrabi, S., Gjoerup, O.V., Kean, J.A., Roberts, T.M. and Schaffhausen, B. (2007) Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19011-19016.

Anello, G., Gueant-Rodriguez, R.M., Bosco, P., Gueant, J.L., Romano, A., Namour, B., Spada, R., Caraci, F., Pourie, G., Daval, J.L. and Ferri, R. (2004) Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, **15**, 859-861.

Araki, A., Sako, Y. and Ito, H. (1993) Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis*, **103**, 149-157.

Aranha, M.M., Santos, D.M., Sola, S., Steer, C.J. and Rodrigues, C.M. (2011) miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. *PLoS One*, **6**, e21396.

Asthana, J., Kapoor, S., Mohan, R. and Panda, D. (2013) Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. *J Biol Chem*, **288**, 22516-22526.

Bae, Y., Yang, T., Zeng, H.C., Campeau, P.M., Chen, Y., Bertin, T., Dawson, B.C., Munivez, E., Tao, J. and Lee, B.H. (2012) miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Hum Mol Genet*, **21**, 2991-3000.

Bamburg, J.R., Bernstein, B.W., Davis, R.C., Flynn, K.C., Goldsbury, C., Jensen, J.R., Maloney, M.T., Marsden, I.T., Minamide, L.S., Pak, C.W., Shaw, A.E., Whiteman, I. and Wiggan, O. (2010) ADF/Cofilin-actin rods in neurodegenerative diseases. *Curr Alzheimer Res*, **7**, 241-250.

Banerjee, R.V., Johnston, N.L., Sobeski, J.K., Datta, P. and Matthews, R.G. (1989) Cloning and sequence analysis of the Escherichia coli metH gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J Biol Chem*, **264**, 13888-13895.

Banigan, M.G., Kao, P.F., Kozubek, J.A., Winslow, A.R., Medina, J., Costa, J., Schmitt, A., Schneider, A., Cabral, H., Cagsal-Getkin, O., Vanderburg, C.R. and Delalle, I. (2013) Differential expression of exosomal microRNAs in prefrontal cortices of schizophrenia and bipolar disorder patients. *PLoS One*, **8**, e48814.

Banka, S., Blom, H.J., Walter, J., Aziz, M., Urquhart, J., Clouthier, C.M., Rice, G.I., de Brouwer, A.P., Hilton, E., Vassallo, G., Will, A., Smith, D.E., Smulders, Y.M., Wevers, R.A., Steinfeld, R., Heales, S., Crow, Y.J., Pelletier, J.N., Jones, S. and Newman, W.G. (2011) Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet*, **88**, 216-225.

Barbaux, S., Plomin, R. and Whitehead, A.S. (2000) Polymorphisms of genes controlling homocysteine/folate metabolism and cognitive function. *Neuroreport*, **11**, 1133-1136.

Barker, D.J. (2004) Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health*, **58**, 114-115.

Barker, D.J. and Osmond, C. (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, **1**, 1077-1081.

Barre, B., Vigneron, A. and Coqueret, O. (2005) The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem*, **280**, 15673-15681.

Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.

Battaglia-Hsu, S.F., Akchiche, N., Noel, N., Alberto, J.M., Jeannesson, E., Orozco-Barrios, C.E., Martinez-Fong, D., Daval, J.L. and Gueant, J.L. (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 21930-21935.

Beedholm-Ebsen, R., van de Wetering, K., Hardlei, T., Nexo, E., Borst, P. and Moestrup, S.K. (2010) Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood*, **115**, 1632-1639.

Benitez-King, G., Ramirez-Rodriguez, G., Ortiz, L. and Meza, I. (2004) The neuronal cytoskeleton as a potential therapeutical target in neurodegenerative diseases and schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **3**, 515-533.

Benkhalifa, M., Montjean, D., Cohen-Bacrie, P. and Menezo, Y. (2010) Imprinting: RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte. *Fertil Steril*, **93**, 1585-1590.

Bertolo, R.F. and McBreairty, L.E. (2013) The nutritional burden of methylation reactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **16**, 102-108.

Beveridge, N.J. and Cairns, M.J. (2012) MicroRNA dysregulation in schizophrenia. *Neurobiol Dis*, **46**, 263-271.

Bialecka, M., Kurzawski, M., Roszmann, A., Robowski, P., Sitek, E.J., Honczarenko, K., Gorzkowska, A., Budrewicz, S., Mak, M., Jarosz, M., Golab-Janowska, M., Koziorowska-Gawron, E., Drozdzik, M. and Slawek, J. (2012) Association of COMT, MTHFR, and SLC19A1(RFC-1) polymorphisms with homocysteine blood levels and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics*, **22**, 716-724.

Bienvenu, F., Barre, B., Giraud, S., Avril, S. and Coqueret, O. (2005) Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Mol Biol Cell*, **16**, 1850-1858.

Bjorklund, N.K. and Gordon, R. (2006) A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *Int J Dev Biol*, **50**, 135-141.

Blaise, S.A., Nedelec, E., Alberto, J.M., Schroeder, H., Audonnet, S., Bossenmeyer-Pourie, C., Gueant, J.L. and Daval, J.L. (2009) Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol*, **216**, 231-238.

Blaise, S.A., Nedelec, E., Schroeder, H., Alberto, J.M., Bossenmeyer-Pourie, C., Gueant, J.L. and Daval, J.L. (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol*, **170**, 667-679.

Blom, H.J., Shaw, G.M., den Heijer, M. and Finnell, R.H. (2006) Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 724-731.

Bockhorn, J., Yee, K., Chang, Y.F., Prat, A., Huo, D., Nwachukwu, C., Dalton, R., Huang, S., Swanson, K.E., Perou, C.M., Olopade, O.I., Clarke, M.F., Greene, G.L. and Liu, H. (2013) MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res Treat*, **137**, 373-382.

Borowczyk, K., Shih, D.M. and Jakubowski, H. (2012) Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraoxonase 1. *J Alzheimers Dis*, **30**, 225-231.

Bosco, P., Gueant-Rodriguez, R.M., Anello, G., Barone, C., Namour, F., Caraci, F., Romano, A., Romano, C. and Gueant, J.L. (2003) Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A*, **121A**, 219-224.

Bosco, P., Gueant-Rodriguez, R.M., Anello, G., Spada, R., Romano, A., Fajardo, A., Caraci, F., Ferri, R. and Gueant, J.L. (2006) Association of homocysteine (but not of MTHFR 677 C>T, MTR 2756 A>G, MTRR 66 A>G and TCN2 776 C>G) with ischaemic cerebrovascular disease in Sicily. *Thromb Haemost*, **96**, 154-159.

Bossenmeyer-Pourie, C., Lievre, V., Grojean, S., Koziel, V., Pillot, T. and Daval, J.L. (2002) Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. *Neuroscience*, **114**, 869-882.

Bottiglieri, T. (2005) Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **29**, 1103-1112.

Bottiglieri, T., Arning, E., Wasek, B., Nunbhakdi-Craig, V., Sontag, J.M. and Sontag, E. (2012) Acute administration of L-DOPA induces changes in methylation metabolites, reduced protein phosphatase 2A methylation, and hyperphosphorylation of Tau protein in mouse brain. *J Neurosci*, **32**, 9173-9181.

Bottiglieri, T., Godfrey, P., Flynn, T., Carney, M.W., Toone, B.K. and Reynolds, E.H. (1990) Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **53**, 1096-1098.

Bottiglieri, T., Laundy, M., Crellin, R., Toone, B.K., Carney, M.W. and Reynolds, E.H. (2000) Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **69**, 228-232.

Bourne, J.N. and Harris, K.M. (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, **31**, 47-67.

Boyles, A.L., Hammock, P. and Speer, M.C. (2005) Candidate gene analysis in human neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **135C**, 9-23.

Braak, H. and Braak, E. (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, **1**, 213-216.

Bromberg, J. (2002) Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, **109**, 1139-1142.

Burke, G., Robinson, K., Refsum, H., Stuart, B., Drumm, J. and Graham, I. (1992) Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med*, **326**, 69-70.

Burren, K.A., Savery, D., Massa, V., Kok, R.M., Scott, J.M., Blom, H.J., Copp, A.J. and Greene, N.D. (2008) Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate

deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Hum Mol Genet*, **17**, 3675-3685.

Burren, K.A., Scott, J.M., Copp, A.J. and Greene, N.D. (2010) The genetic background of the curly tail strain confers susceptibility to folate-deficiency-induced exencephaly. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **88**, 76-83.

Caceres, A., Mautino, J. and Kosik, K.S. (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron*, **9**, 607-618.

Cai, B., Li, J., Wang, J., Luo, X., Ai, J., Liu, Y., Wang, N., Liang, H., Zhang, M., Chen, N., Wang, G., Xing, S., Zhou, X., Yang, B., Wang, X. and Lu, Y. (2012) microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. *Stem Cells*, **30**, 1746-1755.

Caldwell, M.A., He, X., Wilkie, N., Pollack, S., Marshall, G., Wafford, K.A. and Svendsen, C.N. (2001) Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol*, **19**, 475-479.

Cankurtaran, M., Yesil, Y., Kuyumcu, M.E., Ozturk, Z.A., Yavuz, B.B., Halil, M., Ulger, Z., Cankurtaran, E.S. and Ariogul, S. (2013) Altered levels of homocysteine and serum natural antioxidants links oxidative damage to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **33**, 1051-1058.

Cario, H., Bode, H., Debatin, K.M., Opladen, T. and Schwarz, K. (2009) Congenital null mutations of the FOLR1 gene: a progressive neurologic disease and its treatment. *Neurology*, **73**, 2127-2129.

Cario, H., Smith, D.E., Blom, H., Blau, N., Bode, H., Holzmann, K., Pannicke, U., Hopfner, K.P., Rump, E.M., Ayric, Z., Kohne, E., Debatin, K.M., Smulders, Y. and Schwarz, K. (2011) Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. *Am J Hum Genet*, **88**, 226-231.

Carson, N.A. and Neill, D.W. (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child*, **37**, 505-513.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. and Jove, R. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, **10**, 105-115.

Chai, G.S., Jiang, X., Ni, Z.F., Ma, Z.W., Xie, A.J., Cheng, X.S., Wang, Q., Wang, J.Z. and Liu, G.P. (2013) Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine. *J Neurochem*, **124**, 388-396.

Chakraborty, P., Goswami, S.K., Rajani, S., Sharma, S., Kabir, S.N., Chakravarty, B. and Jana, K. (2013) Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PLoS One*, **8**, e64446.

Chamberlin, M.E., Ubagai, T., Mudd, S.H., Thomas, J., Pao, V.Y., Nguyen, T.K., Levy, H.L., Greene, C., Freehauf, C. and Chou, J.Y. (2000) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet*, **66**, 347-355.

Cheng, X., Jin, G., Zhang, X., Tian, M. and Zou, L. (2011) Stage-dependent STAT3 activation is involved in the differentiation of rat hippocampus neural stem cells. *Neurosci Lett*, **493**, 18-23.

Chiba, T., Yamada, M., Sasabe, J., Terashita, K., Shimoda, M., Matsuoka, M. and Aiso, S. (2009) Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry*, **14**, 206-222.

Chittka, A., Nitarska, J., Grazini, U. and Richardson, W.D. (2012) Transcription factor positive regulatory domain 4 (PRDM4) recruits protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) to mediate histone arginine methylation and control neural stem cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*, **287**, 42995-43006.

Choi, H.J., Lee, J.H., Park, S.Y., Cho, J.H. and Han, J.S. (2009) STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells. *Exp Mol Med*, **41**, 94-101.

Chorna, L.B., Akopian, H.R., Makukh, H.V. and Fedoryk, I.M. (2011) [Allelic polymorphism of MTHFR, MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers]. *Tsitol Genet*, **45**, 51-56.

Christensen, B., Arbour, L., Tran, P., Leclerc, D., Sabbaghian, N., Platt, R., Gilfix, B.M., Rosenblatt, D.S., Gravel, R.A., Forbes, P. and Rozen, R. (1999) Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet*, **84**, 151-157.

Christman, J.K., Sheikhnejad, G., Dizik, M., Abileah, S. and Wainfan, E. (1993) Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis*, **14**, 551-557.

Chwatko, G., Boers, G.H., Strauss, K.A., Shih, D.M. and Jakubowski, H. (2007) Mutations in methylenetetrahydrofolate reductase or cystathionine beta-synthase gene, or a high-methionine diet, increase homocysteine thiolactone levels in humans and mice. *FASEB J*, **21**, 1707-1713.

Cichon, J., Sun, C., Chen, B., Jiang, M., Chen, X.A., Sun, Y., Wang, Y. and Chen, G. (2012) Cofilin aggregation blocks intracellular trafficking and induces synaptic loss in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, **287**, 3919-3929.

Clemmensen, C., Aznar, S., Knudsen, G.M. and Klein, A.B. (2012) The microtubule-associated protein 1A (MAP1A) is an early molecular target of soluble Abeta-peptide. *Cell Mol Neurobiol*, **32**, 561-566.

Cochella, L. and Hobert, O. (2012) Diverse functions of microRNAs in nervous system development. *Curr Top Dev Biol*, **99**, 115-143.

Coelho, D., Kim, J.C., Miousse, I.R., Fung, S., du Moulin, M., Buers, I., Suormala, T., Burda, P., Frapolli, M., Stucki, M., Nurnberg, P., Thiele, H., Robenek, H., Hohne, W., Longo, N., Pasquali, M., Mengel, E., Watkins, D., Shoubridge, E.A., Majewski, J., Rosenblatt, D.S., Fowler, B., Rutsch, F. and Baumgartner, M.R. (2012) Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet*, **44**, 1152-1155.

Copp, A.J., Greene, N.D. and Murdoch, J.N. (2003) The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet*, **4**, 784-793.

Craciunescu, C.N., Brown, E.C., Mar, M.H., Albright, C.D., Nadeau, M.R. and Zeisel, S.H. (2004) Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr*, **134**, 162-166.

Craig, E.M., Van Goor, D., Forscher, P. and Mogilner, A. (2012) Membrane tension, myosin force, and actin turnover maintain actin treadmill in the nerve growth cone. *Biophys J*, **102**, 1503-1513.

Cravo, M.L. and Camilo, M.E. (2000) Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status. *Nutrition*, **16**, 296-302.

Cylwik, B. and Chrostek, L. (2011) [Disturbances of folic acid and homocysteine metabolism in alcohol abuse]. *Pol Merkur Lekarski*, **30**, 295-299.

Czapski, G.A., Maruszak, A., Styczynska, M., Zekanowski, C., Safranow, K. and Strosznajder, J.B. (2012) Association between plasma biomarkers, CDK5 polymorphism and the risk of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **72**, 397-411.

Czeizel, A.E. and Dudas, I. (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*, **327**, 1832-1835.

Daval, J.L., Blaise, S. and Gueant, J.L. (2009) Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, E1; author reply E2.

De-Regil, L.M., Fernandez-Gaxiola, A.C., Dowswell, T. and Pena-Rosas, J.P. (2010) Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007950.

de Antonellis, P., Medaglia, C., Cusanelli, E., Andolfo, I., Liguori, L., De Vita, G., Carotenuto, M., Bello, A., Formiggini, F., Galeone, A., De Rosa, G., Virgilio, A., Scognamiglio, I., Sciro, M., Basso, G., Schulte, J.H., Cinalli, G., Iolascon, A. and Zollo, M. (2011) MiR-34a targeting of Notch ligand delta-like 1 impairs CD15+/CD133+ tumor-propagating cells and supports neural differentiation in medulloblastoma. *PLoS One*, **6**, e24584.

De Bree, A., Verschuren, W.M., Kromhout, D., Kluijtmans, L.A. and Blom, H.J. (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev*, **54**, 599-618.

de Carvalho, S.C., Muniz, M.T., Siqueira, M.D., Siqueira, E.R., Gomes, A.V., Silva, K.A., Bezerra, L.C., D'Almeida, V., de Oliveira, C.P. and Pereira, L.M. (2013) Plasmatic higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr J*, **12**, 37.

De Castro, S.C., Leung, K.Y., Savery, D., Burren, K., Rozen, R., Copp, A.J. and Greene, N.D. (2010) Neural tube defects induced by folate deficiency in mutant curly tail (Grhl3) embryos are associated with alteration in folate one-carbon metabolism but are unlikely to result from diminished methylation. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **88**, 612-618.

de Lau, L.M., Smith, A.D., Refsum, H., Johnston, C. and Breteler, M.M. (2009) Plasma vitamin B12 status and cerebral white-matter lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **80**, 149-157.

Deacon, T.W., Pakzaban, P. and Isacson, O. (1994) The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res*, **668**, 211-219.

Decker, T. and Kovarik, P. (2000) Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*, **19**, 2628-2637.

Dehmelt, L. and Halpain, S. (2004) Actin and microtubules in neurite initiation: are MAPs the missing link? *J Neurobiol*, **58**, 18-33.

Dekker, G.A., de Vries, J.I., Doelitzsch, P.M., Huijgens, P.C., von Blomberg, B.M., Jakobs, C. and van Geijn, H.P. (1995) Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, **173**, 1042-1048.

Deverman, B.E. and Patterson, P.H. (2009) Cytokines and CNS development. *Neuron*, **64**, 61-78.

Di Giuseppe, D., Di Simplicio, P., Capecchi, P.L., Lazzerini, P.E. and Pasini, F.L. (2003) Alteration in the redox state of plasma in heart-transplant patients with moderate hyperhomocysteinemia. *J Lab Clin Med*, **142**, 21-28.

Di Simplicio, P., Franconi, F., Frosali, S. and Di Giuseppe, D. (2003) Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids*, **25**, 323-339.

Ding, W., Zhou, D.L., Jiang, X. and Lu, L.S. (2013) Methionine synthase A2756G polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer: evidence based on 27 studies. *PLoS One*, **8**, e60508.

DiTella, M.C., Feiguin, F., Carri, N., Kosik, K.S. and Caceres, A. (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci*, **109 (Pt 2)**, 467-477.

Do, D.V., Ueda, J., Messerschmidt, D.M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, M.Z., Zhang, W., Moh, A., Wu, Q., Robson, P., Ng, H.H., Poellinger, L., Knowles, B.B., Solter, D. and Fu, X.Y. (2013) A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes Dev*, **27**, 1378-1390.

Doolin, M.T., Barbaux, S., McDonnell, M., Hoess, K., Whitehead, A.S. and Mitchell, L.E. (2002) Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet*, **71**, 1222-1226.

dos Santos, E.F., Busanello, E.N., Miglioranza, A., Zanatta, A., Barchak, A.G., Vargas, C.R., Saute, J., Rosa, C., Carrion, M.J., Camargo, D., Dalbem, A., da Costa, J.C., de Sousa Miguel, S.R., de Mello Rieder, C.R. and Wajner, M. (2009) Evidence that folic acid deficiency is a major determinant of hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis*, **24**, 257-269.

Douaud, G., Refsum, H., de Jager, C.A., Jacoby, R., Nichols, T.E., Smith, S.M. and Smith, A.D. (2013) Preventing Alzheimer's disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 9523-9528.

Duan, W., Ladenheim, B., Cutler, R.G., Kruman, II, Cadet, J.L. and Mattson, M.P. (2002) Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem*, **80**, 101-110.

Dujmovic, I., Lunn, M.P., Reilly, M.M. and Petzold, A. (2013) Serial cerebrospinal fluid neurofilament heavy chain levels in severe Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve*, **48**, 132-134.

Durga, J., van Boxtel, M.P., Schouten, E.G., Kok, F.J., Jolles, J., Katan, M.B. and Verhoef, P. (2007) Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet*, **369**, 208-216.

Dwivedi, Y. (2011) Evidence demonstrating role of microRNAs in the etiopathology of major depression. *J Chem Neuroanat*, **42**, 142-156.

Dziennis, S. and Alkayed, N.J. (2008) Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci*, **19**, 341-361.

Ebisch, I.M., Thomas, C.M., Peters, W.H., Braat, D.D. and Steegers-Theunissen, R.P. (2007) The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update*, **13**, 163-174.

El Maghraoui, A., Ghozlani, I., Mounach, A., Rezqi, A., Oumghar, K., Achemlal, L., Bezza, A. and Ouzzif, Z. (2012) Homocysteine, folate, and vitamin B12 levels and vertebral fracture risk in postmenopausal women. *J Clin Densitom*, **15**, 328-333.

Ellison, J., Clark, P., Walker, I.D. and Greer, I.A. (2004) Effect of supplementation with folic acid throughout pregnancy on plasma homocysteine concentration. *Thromb Res*, **114**, 25-27.

Esfandiari, F., Green, R., Cotterman, R.F., Pogribny, I.P., James, S.J. and Miller, J.W. (2003) Methyl deficiency causes reduction of the methyl-CpG-binding protein, MeCP2, in rat liver. *Carcinogenesis*, **24**, 1935-1940.

Eves, E.M., Boise, L.H., Thompson, C.B., Wagner, A.J., Hay, N. and Rosner, M.R. (1996) Apoptosis induced by differentiation or serum deprivation in an immortalized central nervous system neuronal cell line. *J Neurochem*, **67**, 1908-1920.

Fan, G. and Hutnick, L. (2005) Methyl-CpG binding proteins in the nervous system. *Cell Res*, **15**, 255-261.

Fang, M., Wang, J., Zhang, X., Geng, Y., Hu, Z., Rudd, J.A., Ling, S., Chen, W. and Han, S. (2012) The miR-124 regulates the expression of BACE1/beta-secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. *Toxicol Lett*, **209**, 94-105.

Farias, G.G., Alfaro, I.E., Cerpa, W., Grabowski, C.P., Godoy, J.A., Bonansco, C. and Inestrosa, N.C. (2009) Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, **284**, 15857-15866.

Farkas, M., Keskitalo, S., Smith, D.E., Bain, N., Semmler, A., Ineichen, B., Smulders, Y., Blom, H., Kulic, L. and Linnebank, M. (2013a) Hyperhomocysteinemia in Alzheimer's disease: the hen and the egg? *J Alzheimers Dis*, **33**, 1097-1104.

Farkas, S.A., Bottiger, A.K., Isaksson, H.S., Finnell, R.H., Ren, A. and Nilsson, T.K. (2013b) Epigenetic alterations in folate transport genes in placental tissue from fetuses with neural tube defects and in leukocytes from subjects with hyperhomocysteinemia. *Epigenetics*, **8**, 303-316.

Faulk, C. and Dolinoy, D.C. (2011) Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*, **6**, 791-797.

Fedosov, S.N. (2012) Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *Subcell Biochem*, **56**, 347-367.

Fernandez, L.L. and Scheibe, R.M. (2005) Is MTHFR polymorphism a risk factor for Alzheimer's disease like APOE? *Arq Neuropsiquiatr*, **63**, 1-6.

Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S. and Bicchiega, V. (2010) Effect of homocysteinylation on high density lipoprotein physico-chemical properties. *Chem Phys Lipids*, **163**, 228-235.

Finkelstein, J.D. (2007) Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clin Chem Lab Med*, **45**, 1694-1699.

Flynn, K.C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B.K., Gurniak, C., Shaw, A.E., Meyn, L., Wedlich-Soldner, R., Bamburg, J.R., Small, J.V., Witke, W. and Bradke, F. (2012) ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. *Neuron*, **76**, 1091-1107.

Flynn, K.C., Pak, C.W., Shaw, A.E., Bradke, F. and Bamburg, J.R. (2009) Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev Neurobiol*, **69**, 761-779.

Fode, C., Ma, Q., Casarosa, S., Ang, S.L., Anderson, D.J. and Guillemot, F. (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev*, **14**, 67-80.

Fong, C.S., Shyu, H.Y., Shieh, J.C., Fu, Y.P., Chin, T.Y., Wang, H.W. and Cheng, C.W. (2011) Association of MTHFR, MTR, and MTRR polymorphisms with Parkinson's disease among ethnic Chinese in Taiwan. *Clin Chim Acta*, **412**, 332-338.

Ford, A.H., Flicker, L., McCaul, K., van Bockxmeer, F., Hegarty, S., Hirani, V., Fenner, S. and Almeida, O.P. (2010) The B-VITAGE trial: a randomized trial of homocysteine lowering treatment of depression in later life. *Trials*, **11**, 8.

Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, J.M., Gueant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L. and Gueant, J.L. (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*, **13**, 225-238.

Frey, L. and Hauser, W.A. (2003) Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia*, **44 Suppl 3**, 4-13.

Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P. and et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, **10**, 111-113.

Fryer, R.H., Wilson, B.D., Gubler, D.B., Fitzgerald, L.A. and Rodgers, G.M. (1993) Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*, **13**, 1327-1333.

Fuentes, P., Canovas, J., Berndt, F.A., Noctor, S.C. and Kukuljan, M. (2012) CoREST/LSD1 control the development of pyramidal cortical neurons. *Cereb Cortex*, **22**, 1431-1441.

Fyfe, J.C., Hemker, S.L., Venta, P.J., Fitzgerald, C.A., Outerbridge, C.A., Myers, S.L. and Giger, U. (2013) An exon 53 frameshift mutation in CUBN abrogates cubam function and causes Imerslund-Grasbeck syndrome in dogs. *Mol Genet Metab*, **109**, 390-396.

Gabory, A., Attig, L. and Junien, C. (2011) Epigenetic mechanisms involved in developmental nutritional programming. *World J Diabetes*, **2**, 164-175.

Gaiottino, J., Norgren, N., Dobson, R., Topping, J., Nissim, A., Malaspina, A., Bestwick, J.P., Monsch, A.U., Regeniter, A., Lindberg, R.L., Kappos, L., Leppert, D., Petzold, A., Giovannoni, G. and Kuhle, J. (2013) Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One*, **8**, e75091.

Galloway, P.G., Bergeron, C. and Perry, G. (1989) The presence of tau distinguishes Lewy bodies of diffuse Lewy body disease from those of idiopathic Parkinson disease. *Neurosci Lett*, **100**, 6-10.

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

Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J.R. and Bradke, F. (2007) Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. *J Neurosci*, **27**, 13117-13129.

Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Lorenzini, S., Selvi, E., Colombo, G., Milzani, A., Fanti, P. and Rossi, R. (2012) Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **53**, 907-915.

Gong, Y., Wu, C.N., Xu, J., Feng, G., Xing, Q.H., Fu, W., Li, C., He, L. and Zhao, X.Z. (2013) Polymorphisms in microRNA target sites influence susceptibility to schizophrenia by altering the binding of miRNAs to their targets. *Eur Neuropsychopharmacol*, **23**, 1182-1189.

Gonzalez, R., Pedro, T., Martinez-Hervas, S., Civera, M., Priego, M.A., Catala, M., Chaves, F.J., Ascaso, J.F., Carmena, R. and Real, J.T. (2012) Plasma homocysteine levels are independently associated with the severity of peripheral polyneuropathy in type 2 diabetic subjects. *J Peripher Nerv Syst*, **17**, 191-196.

Gorgone, G., Curro, M., Ferlazzo, N., Parisi, G., Parnetti, L., Belcastro, V., Tambasco, N., Rossi, A., Pisani, F., Calabresi, P., Ientile, R. and Caccamo, D. (2010) Coenzyme Q10, hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T polymorphism in levodopa-treated Parkinson's disease patients. *Neuromolecular Med*, **14**, 84-90.

Gouti, M. and Gavalas, A. (2008) Hoxb1 controls cell fate specification and proliferative capacity of neural stem and progenitor cells. *Stem Cells*, **26**, 1985-1997.

Grasbeck, R., Gordin, R., Kantero, I. and Kuhlback, B. (1960) Selective vitamin B12 malabsorption and proteinuria in young people. A syndrome. *Acta Med Scand*, **167**, 289-296.

Greene, N.D., Stanier, P. and Copp, A.J. (2009) Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*, **18**, R113-129.

Gritsko, T., Williams, A., Turkson, J., Kaneko, S., Bowman, T., Huang, M., Nam, S., Eweis, I., Diaz, N., Sullivan, D., Yoder, S., Enkemann, S., Eschrich, S., Lee, J.H., Beam, C.A., Cheng, J., Minton, S., Muro-Cacho, C.A. and Jove, R. (2006) Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*, **12**, 11-19.

Gueant-Rodriguez, R.M., Juilliere, Y., Candito, M., Adjalla, C.E., Gibelin, P., Herbeth, B., Van Obberghen, E. and Gueant, J.L. (2005) Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemost*, **94**, 510-515.

Gueant-Rodriguez, R.M., Rendeli, C., Namour, B., Venuti, L., Romano, A., Anello, G., Bosco, P., Debard, R., Gerard, P., Viola, M., Salvaggio, E. and Gueant, J.L. (2003) Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett*, **344**, 189-192.

Gueant, J.L., Caillerez-Fofou, M., Battaglia-Hsu, S., Alberto, J.M., Freund, J.N., Dulluc, I., Adjalla, C., Maury, F., Merle, C., Nicolas, J.P., Namour, F. and Daval, J.L. (2013a) Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie*, **95**, 1033-1040.

Gueant, J.L., Gerard, A., Monin, B., Champigneulle, B., Gerard, H. and Nicolas, J.P. (1988) Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. *Gut*, **29**, 1370-1378.

Gueant, J.L., Gueant-Rodriguez, R.M., Anello, G., Bosco, P., Brunaud, L., Romano, C., Ferri, R., Romano, A., Candito, M. and Namour, B. (2003) Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med*, **41**, 1473-1477.

Gueant, J.L., Namour, F., Gueant-Rodriguez, R.M. and Daval, J.L. (2013b) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab*, **24**, 279-289.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. and Bartel, D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **466**, 835-840.

Haberland, M., Montgomery, R.L. and Olson, E.N. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*, **10**, 32-42.

Hajjar, K.A., Mauri, L., Jacovina, A.T., Zhong, F., Mirza, U.A., Padovan, J.C. and Chait, B.T. (1998) Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem*, **273**, 9987-9993.

Han, K., Gennarino, V.A., Lee, Y., Pang, K., Hashimoto-Torii, K., Choufani, S., Raju, C.S., Oldham, M.C., Weksberg, R., Rakic, P., Liu, Z. and Zoghbi, H.Y. (2013) Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p. *Genes Dev*, **27**, 485-490.

Hasegawa, T., Ukai, W., Jo, D.G., Xu, X., Mattson, M.P., Nakagawa, M., Araki, W., Saito, T. and Yamada, T. (2005) Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of

neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, **80**, 869-876.

Hawkins, K., Mohamet, L., Ritson, S., Merry, C.L. and Ward, C.M. (2012) E-cadherin and, in its absence, N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation. *Stem Cells*, **30**, 1842-1851.

Hawthorne, V.S., Huang, W.C., Neal, C.L., Tseng, L.M., Hung, M.C. and Yu, D. (2009) ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, **7**, 592-600.

He, J.C., Gomes, I., Nguyen, T., Jayaram, G., Ram, P.T., Devi, L.A. and Iyengar, R. (2005) The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem*, **280**, 33426-33434.

Heese, P., Linnebank, M., Semmler, A., Muschler, M.A., Heberlein, A., Frieling, H., Stoffel-Wagner, B., Kornhuber, J., Banger, M., Bleich, S. and Hillemacher, T. (2012) Alterations of homocysteine serum levels during alcohol withdrawal are influenced by folate and riboflavin: results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA). *Alcohol Alcohol*, **47**, 497-500.

Heider, I., Lehmensiek, V., Lenk, T., Muller, T. and Storch, A. (2004) Dopaminergic neurotoxicity of homocysteine and its derivatives in primary mesencephalic cultures. *J Neural Transm Suppl*, 1-13.

Herrmann, M., Peter Schmidt, J., Umanskaya, N., Wagner, A., Taban-Shomal, O., Widmann, T., Colaianni, G., Wildemann, B. and Herrmann, W. (2007) The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med*, **45**, 1621-1632.

Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. (2010) Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci*, **11**, 377-388.

Ho, P.I., Collins, S.C., Dhitavat, S., Ortiz, D., Ashline, D., Rogers, E. and Shea, T.B. (2001) Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem*, **78**, 249-253.

Hoffman, D.R., Marion, D.W., Cornatzer, W.E. and Duerre, J.A. (1980) S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine, L-homocystein, and adenosine. *J Biol Chem*, **255**, 10822-10827.

Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J. and Price, D.L. (1987) Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 3472-3476.

Holm, P.I., Hustad, S., Ueland, P.M., Vollset, S.E., Grotmol, T. and Schneede, J. (2007) Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C->t genotypes and B-vitamin status in a large-scale epidemiological study. *J Clin Endocrinol Metab*, **92**, 1535-1541.

Howard, J. and Hyman, A.A. (2003) Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, **422**, 753-758.

Howell, J.M., Winstone, T.L., Coorssen, J.R. and Turner, R.J. (2006) An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins. *Proteomics*, **6**, 2050-2069.

Hu, Y., Chen, E., Mu, Y., Li, J. and Chen, R. (2011) BHMT gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate in a Chinese population. *Biomed Environ Sci*, **24**, 89-93.

Huang, W.W., Yang, J.S., Lin, M.W., Chen, P.Y., Chiou, S.M., Chueh, F.S., Lan, Y.H., Pai, S.J., Tsuzuki, M., Ho, W.J. and Chung, J.G. (2012) Cucurbitacin E Induces G(2)/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2012**, 952762.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. and Yao, T.P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, **417**, 455-458.

Hultberg, B., Berglund, M., Andersson, A. and Frank, A. (1993) Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, **17**, 687-689.

Hussein, W.I., Green, R., Jacobsen, D.W. and Faiman, C. (1999) Normalization of hyperhomocysteinemia with L-thyroxine in hypothyroidism. *Ann Intern Med*, **131**, 348-351.

Ichi, S., Costa, F.F., Bischof, J.M., Nakazaki, H., Shen, Y.W., Boshnjaku, V., Sharma, S., Mania-Farnell, B., McLone, D.G., Tomita, T., Soares, M.B. and Mayanil, C.S. (2010) Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem*, **285**, 36922-36932.

Ihrie, R.A. and Alvarez-Buylla, A. (2008) Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res*, **331**, 179-191.

Ikeda, S., Koyama, H., Sugimoto, M. and Kume, S. (2012) Roles of one-carbon metabolism in preimplantation period--effects on short-term development and long-term programming. *J Reprod Dev*, **58**, 38-43.

Ikeda, S., Namekawa, T., Sugimoto, M. and Kume, S. (2010) Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, **313**, 129-136.

Isobe, C., Abe, T. and Terayama, Y. (2010) L-Dopa therapy increases homocysteine concentration in cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci*, **17**, 717-721.

Jacobsen, D.W. (1998) Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem*, **44**, 1833-1843.

Jacques, P.F., Bostom, A.G., Selhub, J., Rich, S., Ellison, R.C., Eckfeldt, J.H., Gravel, R.A., Rozen, R., National Heart, L. and Blood Institute, N.I.o.H. (2003) Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis*, **166**, 49-55.

Jacques, P.F., Bostom, A.G., Williams, R.R., Ellison, R.C., Eckfeldt, J.H., Rosenberg, I.H., Selhub, J. and Rozen, R. (1996) Relation between folate status, a common mutation in

methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, **93**, 7-9.

Jacques, P.F., Bostom, A.G., Wilson, P.W., Rich, S., Rosenberg, I.H. and Selhub, J. (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr*, **73**, 613-621.

Jain, A.K., Allton, K., Iacovino, M., Mahen, E., Milczarek, R.J., Zwaka, T.P., Kyba, M. and Barton, M.C. (2012) p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol*, **10**, e1001268.

Jain, N., Zhang, T., Kee, W.H., Li, W. and Cao, X. (1999) Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem*, **274**, 24392-24400.

Jakubowski, H. (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem*, **272**, 1935-1942.

Jakubowski, H. (2000) Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr*, **130**, 377S-381S.

Jakubowski, H. (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 470-487.

Jakubowski, H. (2005) Anti-N-homocysteinylated protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med*, **43**, 1011-1014.

Jakubowski, H. (2006) Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr*, **136**, 1741S-1749S.

Jakubowski, H. (2011) Quality control in tRNA charging -- editing of homocysteine. *Acta Biochim Pol*, **58**, 149-163.

Jakubowski, H., Boers, G.H. and Strauss, K.A. (2008) Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylated protein levels in humans. *FASEB J*, **22**, 4071-4076.

Jakubowski, H. and Goldman, E. (1993) Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett*, **317**, 237-240.

Jakubowski, H., Perla-Kajan, J., Finnell, R.H., Cabrera, R.M., Wang, H., Gupta, S., Kruger, W.D., Kraus, J.P. and Shih, D.M. (2009) Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J*, **23**, 1721-1727.

Jakubowski, H., Zhang, L., Bardeguez, A. and Aviv, A. (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res*, **87**, 45-51.

Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, **3**, 415-428.

Jung, J.H., Jeong, S.J., Kim, J.H., Jung, S.K., Jung, D.B., Lee, D., Sohn, E.J., Yun, M., Lee, H.J., Lee, H.J. and Kim, S.H. (2013) Inactivation of HDAC3 and STAT3 is Critically Involved in 1-Stearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine-Induced Apoptosis in Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells. *Cell Biochem Biophys*.

Junn, E. and Mouradian, M.M. (2012) MicroRNAs in neurodegenerative diseases and their therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, **133**, 142-150.

Kalita, J., Agarwal, R., Chandra, S. and Misra, U.K. (2013) A study of neurobehavioral, clinical psychometric, and P3 changes in vitamin B12 deficiency neurological syndrome. *Nutr Neurosci*, **16**, 39-46.

Karima, O., Riazi, G., Khodadadi, S., Aryapour, H., Khalili, M.A., Yousefi, L. and Moosavi-Movahedi, A.A. (2012) Altered tubulin assembly dynamics with N-homocysteinylated human 4R/1N tau in vitro. *FEBS Lett*, **586**, 3914-3919.

Kaut, O., Schmitt, I. and Wullner, U. (2012) Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics*, **13**, 87-91.

Kempisty, B., Sikora, J., Lianeri, M., Szczepankiewicz, A., Czerski, P., Hauser, J. and Jagodzinski, P.P. (2007) MTHFD 1958G>A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet*, **17**, 177-181.

Kenyon, S.H., Nicolaou, A. and Gibbons, W.A. (1998) The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. *Alcohol*, **15**, 305-309.

Kerek, R., Geoffroy, A., Bison, A., Martin, N., Akchiche, N., Pourie, G., Helle, D., Gueant, J.L., Bossenmeyer-Pourie, C. and Daval, J.L. (2013) Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis*, **4**, e755.

Khazaei, S., Yousefi, R. and Alavian-Mehr, M.M. (2012) Aggregation and fibrillation of eye lens crystallins by homocysteinylation; implication in the eye pathological disorders. *Protein J*, **31**, 717-727.

Khodadadi, S., Riazi, G.H., Ahmadian, S., Hoveizi, E., Karima, O. and Aryapour, H. (2012) Effect of N-homocysteinylation on physicochemical and cytotoxic properties of amyloid beta-peptide. *FEBS Lett*, **586**, 127-131.

Kim, B.J., Koh, J.M., Ahn, S.H., Lee, S.H., Kim, E.H., Bae, S.J., Kim, H.K., Choe, J.W., Lim, K.H., Pyun, K.H., Kim, T.H., Kim, S.Y. and Kim, G.S. (2013) High serum total homocysteine levels accelerate hip bone loss in healthy premenopausal women and men. *Bone*, **52**, 56-62.

Kim, E.J., Ables, J.L., Dickel, L.K., Eisch, A.J. and Johnson, J.E. (2011) Ascl1 (Mash1) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS One*, **6**, e18472.

Kim, H.J., Cho, H.K. and Kwon, Y.H. (2008) Synergistic induction of ER stress by homocysteine and beta-amyloid in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem*, **19**, 754-761.

Kim, Y.I., Miller, J.W., da Costa, K.A., Nadeau, M., Smith, D., Selhub, J., Zeisel, S.H. and Mason, J.B. (1994) Severe folate deficiency causes secondary depletion of choline and phosphocholine in rat liver. *J Nutr*, **124**, 2197-2203.

Kitazawa, H., Iida, J., Uchida, A., Haino-Fukushima, K., Itoh, T.J., Hotani, H., Ookata, K., Murofushi, H., Bulinski, J.C., Kishimoto, T. and Hisanaga, S. (2000) Ser787 in the proline-rich region of human MAP4 is a critical phosphorylation site that reduces its activity to promote tubulin polymerization. *Cell Struct Funct*, **25**, 33-39.

Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M. and Hirano, T. (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med*, **189**, 63-73.

Kloosterman, W.P., Wienholds, E., de Bruijn, E., Kauppinen, S. and Plasterk, R.H. (2006) In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods*, **3**, 27-29.

Kobus, K., Ammar, D., Nazari, E.M. and Muller, Y.M. (2013) Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **97**, 386-397.

Kohanbash, G. and Okada, H. (2012) MicroRNAs and STAT interplay. *Semin Cancer Biol*, **22**, 70-75.

Kollins, K.M., Hu, J., Bridgman, P.C., Huang, Y.Q. and Gallo, G. (2009) Myosin-II negatively regulates minor process extension and the temporal development of neuronal polarity. *Dev Neurobiol*, **69**, 279-298.

Kovacs, G.G., Milenkovic, I., Wohrer, A., Hoftberger, R., Gelpi, E., Haberler, C., Honigschnabl, S., Reiner-Concin, A., Heinzl, H., Jungwirth, S., Krampla, W., Fischer, P. and Budka, H. (2013) Non-Alzheimer neurodegenerative pathologies and their combinations are more frequent than commonly believed in the elderly brain: a community-based autopsy series. *Acta Neuropathol*, **126**, 365-384.

Krapels, I.P., van Rooij, I.A., Ocke, M.C., West, C.E., van der Horst, C.M. and Steegers-Theunissen, R.P. (2004) Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr*, **134**, 3106-3113.

Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M. and De Camilli, P. (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the lumenal domain of synaptotagmin. *J Neurosci*, **15**, 4328-4342.

Krause, C., Guzman, A. and Knaus, P. (2011) Noggin. *Int J Biochem Cell Biol*, **43**, 478-481.

Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isacson, O. and Kosik, K.S. (2006) Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells*, **24**, 857-864.

Kriegstein, A. and Alvarez-Buylla, A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, **32**, 149-184.

Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, **11**, 597-610.

Kruman, II, Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L. and Mattson, M.P. (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci*, **20**, 6920-6926.

Kruman, II, Kumaravel, T.S., Lohani, A., Pedersen, W.A., Cutler, R.G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M. and Mattson, M.P. (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **22**, 1752-1762.

Kruman, II, Mouton, P.R., Emokpae, R., Jr., Cutler, R.G. and Mattson, M.P. (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport*, **16**, 1055-1059.

Kuhle, J., Leppert, D., Petzold, A., Regeniter, A., Schindler, C., Mehling, M., Anthony, D.C., Kappos, L. and Lindberg, R.L. (2011) Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*, **76**, 1206-1213.

Kuhle, J., Malmestrom, C., Axelsson, M., Plattner, K., Yaldizli, O., Derfuss, T., Giovannoni, G., Kappos, L. and Lycke, J. (2013) Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*.

Kumari, P., Ali, A., Sukla, K.K., Singh, S.K. and Raman, R. (2013) Lower incidence of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in females: is homocysteine a factor? *J Biosci*, **38**, 21-26.

Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K. and Caceres, A. (2001) Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci*, **21**, 2361-2372.

Kutzbach, C. and Stokstad, E.L. (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta*, **250**, 459-477.

Kwasny-Krochin, B., Gluszko, P. and Undas, A. (2010) Unfavorably altered fibrin clot properties in patients with active rheumatoid arthritis. *Thromb Res*, **126**, e11-16.

Kwong, W.Y., Adamiak, S.J., Gwynn, A., Singh, R. and Sinclair, K.D. (2010) Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle, oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction*, **139**, 705-715.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, **12**, 735-739.

Lalonde, R., Barraud, H., Ravey, J., Gueant, J.L., Bronowicki, J.P. and Strazielle, C. (2008) Effects of a B-vitamin-deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice. *Brain Res*, **1188**, 122-131.

Laraqui, A., Allami, A., Carrie, A., Raisonnier, A., Coiffard, A.S., Benkouka, F., Bendriss, A., Benjouad, A., Bennouar, N., El Kadiri, N., Benomar, A., Fellat, S. and Benomar, M. (2007) Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. *Eur J Intern Med*, **18**, 474-483.

Leblhuber, F., Walli, J., Widner, B., Artner-Dworzak, E., Fuchs, D. and Vrecko, K. (2001) Homocysteine and B vitamins in dementia. *Am J Clin Nutr*, **73**, 127-128.

Leclerc, D., Wilson, A., Dumas, R., Gafuik, C., Song, D., Watkins, D., Heng, H.H., Rommens, J.M., Scherer, S.W., Rosenblatt, D.S. and Gravel, R.A. (1998) Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3059-3064.

Lee, E.S., Chen, H., Soliman, K.F. and Charlton, C.G. (2005) Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents. *Neurotoxicology*, **26**, 361-371.

Lee, S.H., Kim, M.J., Kim, B.J., Kim, S.R., Chun, S., Ryu, J.S., Kim, G.S., Lee, M.C., Koh, J.M. and Chung, S.J. (2010) Homocysteine-lowering therapy or antioxidant therapy for bone loss in Parkinson's disease. *Mov Disord*, **25**, 332-340.

Leeda, M., Riyazi, N., de Vries, J.I., Jakobs, C., van Geijn, H.P. and Dekker, G.A. (1998) Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, **179**, 135-139.

Leenders, A.G., Lin, L., Huang, L.D., Gerwin, C., Lu, P.H. and Sheng, Z.H. (2008) The role of MAP1A light chain 2 in synaptic surface retention of Cav2.2 channels in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **28**, 11333-11346.

Lentz, S.R. (2005) Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost*, **3**, 1646-1654.

Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y.B., Paz, K., Darnell, J.E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R. and Bromberg, J. (2006) Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res*, **66**, 2544-2552.

Li, H., de Faria, J.P., Andrew, P., Nitarska, J. and Richardson, W.D. (2011) Phosphorylation regulates OLIG2 cofactor choice and the motor neuron-oligodendrocyte fate switch. *Neuron*, **69**, 918-929.

Li, Z. and Sheng, M. (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 833-841.

Liang, Y., Li, Y., Li, Z., Liu, Z., Zhang, Z., Chang, S. and Wu, J. (2012) Mechanism of folate deficiency-induced apoptosis in mouse embryonic stem cells: Cell cycle arrest/apoptosis in G1/G0 mediated by microRNA-302a and tumor suppressor gene Lats2. *Int J Biochem Cell Biol*, **44**, 1750-1760.

Lim, A., Sengupta, S., McComb, M.E., Theberge, R., Wilson, W.G., Costello, C.E. and Jacobsen, D.W. (2003) In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin. *J Biol Chem*, **278**, 49707-49713.

Lim, C.P. and Cao, X. (1999) Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem*, **274**, 31055-31061.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-773.

Lin, W.F., Chen, C.J., Chang, Y.J., Chen, S.L., Chiu, I.M. and Chen, L. (2009) SH2B1beta enhances fibroblast growth factor 1 (FGF1)-induced neurite outgrowth through MEK-ERK1/2-STAT3-Egr1 pathway. *Cell Signal*, **21**, 1060-1072.

Linnebank, M., Popp, J., Smulders, Y., Smith, D., Semmler, A., Farkas, M., Kulic, L., Cvetanovska, G., Blom, H., Stoffel-Wagner, B., Kolsch, H., Weller, M. and Jessen, F. S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*, **7**, 373-378.

Liu, A. and Niswander, L.A. (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 945-954.

Liu, C., Teng, Z.Q., Santistevan, N.J., Szulwach, K.E., Guo, W., Jin, P. and Zhao, X. (2010) Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell*, **6**, 433-444.

Liu, H., Wu, H., Wang, Y., Wang, Y., Wu, X., Ju, S. and Wang, X. (2012) Inhibition of class II histone deacetylase blocks proliferation and promotes neuronal differentiation of the embryonic rat neural progenitor cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, **72**, 365-376.

LoTurco, J.J. and Bai, J. (2006) The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci*, **29**, 407-413.

Lovblad, K., Ramelli, G., Remonda, L., Nirkko, A.C., Ozdoba, C. and Schroth, G. (1997) Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol*, **27**, 155-158.

Lowery, L.A. and Van Vactor, D. (2009) The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 332-343.

Lu, C.H., Petzold, A., Kalmar, B., Dick, J., Malaspina, A. and Greensmith, L. (2012) Plasma neurofilament heavy chain levels correlate to markers of late stage disease progression and treatment response in SOD1(G93A) mice that model ALS. *PLoS One*, **7**, e40998.

Ludwig, M.L. and Matthews, R.G. (1997) Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*, **66**, 269-313.

Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., Haas, C.A., Kempermann, G., Taylor, V. and Giachino, C. (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell*, **6**, 445-456.

Mabrouk, H., Douki, W., Mechri, A., Younes, M.K., Omezzine, A., Bouslama, A., Gaha, L. and Najjar, M.F. (2011) [Hyperhomocysteinemia and schizophrenia: case control study]. *Encephale*, **37**, 308-313.

Mahalle, N., Kulkarni, M.V., Garg, M.K. and Naik, S.S. (2013) Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *J Cardiol*, **61**, 289-294.

Maire, C.L., Buchet, D., Kerninon, C., Deboux, C., Baron-Van Evercooren, A. and Nait-Oumesmar, B. (2009) Directing human neural stem/precursor cells into oligodendrocytes by overexpression of Olig2 transcription factor. *J Neurosci Res*, **87**, 3438-3446.

Majdzadeh, N., Wang, L., Morrison, B.E., Bassel-Duby, R., Olson, E.N. and D'Mello, S.R. (2008) HDAC4 inhibits cell-cycle progression and protects neurons from cell death. *Dev Neurobiol*, **68**, 1076-1092.

Majors, A.K., Sengupta, S., Willard, B., Kinter, M.T., Pyeritz, R.E. and Jacobsen, D.W. (2002) Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 1354-1359.

Malinowska, J., Tomczynska, M. and Olas, B. (2012) Changes of blood platelet adhesion to collagen and fibrinogen induced by homocysteine and its thiolactone. *Clin Biochem*, **45**, 1225-1228.

Maller Schulman, B.R., Liang, X., Stahlhut, C., DelConte, C., Stefani, G. and Slack, F.J. (2008) The let-7 microRNA target gene, Mlin41/Trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle*, **7**, 3935-3942.

Malouf, M., Grimley, E.J. and Areosa, S.A. (2003) Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004514.

Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2**, a006247.

Mangoni, A.A., Zinellu, A., Carru, C., Attia, J.R. and McEvoy, M. (2013) Serum thiols and cardiovascular risk scores: a combined assessment of transsulfuration pathway components and substrate/product ratios. *J Transl Med*, **11**, 99.

Marin, O., Valiente, M., Ge, X. and Tsai, L.H. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a001834.

Marsit, C.J., Eddy, K. and Kelsey, K.T. (2006) MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res*, **66**, 10843-10848.

Martin, Y.N., Salavaggione, O.E., Eckloff, B.W., Wieben, E.D., Schaid, D.J. and Weinshilboum, R.M. (2006) Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacogenet Genomics*, **16**, 265-277.

Matherly, L.H., Hou, Z. and Deng, Y. (2007) Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 111-128.

Mato, J.M., Alvarez, L., Ortiz, P. and Pajares, M.A. (1997) S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther*, **73**, 265-280.

Matsunaga, E., Araki, I. and Nakamura, H. (2000) Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development*, **127**, 2357-2365.

Matthews, R.G., Ross, J., Baugh, C.M., Cook, J.D. and Davis, L. (1982) Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry*, **21**, 1230-1238.

Mattson, M.P., Culmsee, C. and Yu, Z.F. (2000) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res*, **301**, 173-187.

Mattson, M.P. and Shea, T.B. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, **26**, 137-146.

McConnell, S.K. (1995) Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron*, **15**, 761-768.

McCully, K.S. (1969) Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*, **56**, 111-128.

McCully, K.S. and Wilson, R.B. (1975) Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*, **22**, 215-227.

Meier, C., Harbrecht, U., Liedtke, R., Oldenburg, J., Conrad, R., Imbierowicz, K., Klingmuller, D. and Geiser, F. (2010) Relative hyperhomocysteinemia in patients with panic disorder: a case-control study. *Neuropsychobiology*, **62**, 164-170.

Mendonca, D.M., Chimelli, L. and Martinez, A.M. (2005) Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Braz J Med Biol Res*, **38**, 925-933.

Menezo, Y., Khatchadourian, C., Gharib, A., Hamidi, J., Greenland, T. and Sarda, N. (1989) Regulation of S-adenosyl methionine synthesis in the mouse embryo. *Life Sci*, **44**, 1601-1609.

Meyer, K., Fredriksen, A. and Ueland, P.M. (2004) High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin Chem*, **50**, 391-402.

Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M. and Shiina, M. (2012) IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, **122**, 143-159.

Mione, M.C., Cavanagh, J.F., Harris, B. and Parnavelas, J.G. (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, **17**, 2018-2029.

Mitchell, L.E. (2005) Epidemiology of neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **135C**, 88-94.

Mohanty, P.K., Kapoor, S., Dubey, A.P., Pandey, S., Shah, R., Nayak, H.K. and Polipalli, S.K. (2012) Evaluation of C677T polymorphism of the methylenetetra hydrofolate reductase gene and its association with levels of serum homocysteine, folate, and vitamin B12 as maternal risk factors for Down syndrome. *Indian J Hum Genet*, **18**, 285-289.

Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T.C., Richter, J., Stadler, M.B., Bibel, M. and Schubeler, D. (2008) Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell*, **30**, 755-766.

Molina, V., Medici, M., Taranto, M.P. and Font de Valdez, G. (2008) Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr*, **62**, 162-168.

Molloy, A.M., Kirke, P.N., Brody, L.C., Scott, J.M. and Mills, J.L. (2008) Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull*, **29**, S101-111; discussion S112-105.

Morin, I., Platt, R., Weisberg, I., Sabbaghian, N., Wu, Q., Garrow, T.A. and Rozen, R. (2003) Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. *Am J Med Genet A*, **119A**, 172-176.

Moroz, N.A., Novak, S.M., Azevedo, R., Colpan, M., Uversky, V.N., Gregorio, C.C. and Kostyukova, A.S. (2013) Alteration of tropomyosin-binding properties of tropomodulin-1 affects its capping ability and localization in skeletal myocytes. *J Biol Chem*, **288**, 4899-4907.

Mudd, S.H. (1985) Vascular disease and homocysteine metabolism. *N Engl J Med*, **313**, 751-753.

Mudd, S.H. and Cantoni, G.L. (1958) Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' yeast. *J Biol Chem*, **231**, 481-492.

Mudd, S.H., Ebert, M.H. and Scriver, C.R. (1980) Labile methyl group balances in the human: the role of sarcosine. *Metabolism*, **29**, 707-720.

Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Refsum, H., Ueland, P.M., Malinow, M.R., Lentz, S.R., Jacobsen, D.W., Brattstrom, L., Wilcken, B., Wilcken, D.E., Blom, H.J., Stabler, S.P., Allen, R.H., Selhub, J. and Rosenberg, I.H. (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1704-1706.

Mulla, M.J., Myrtolli, K., Brosens, J.J., Chamley, L.W., Kwak-Kim, J.Y., Paidas, M.J. and Abrahams, V.M. (2010) Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol*, **63**, 339-348.

Munsie, L.N. and Truant, R. (2012) The role of the cofilin-actin rod stress response in neurodegenerative diseases uncovers potential new drug targets. *Bioarchitecture*, **2**, 204-208.

Murase, S., Kim, E., Lin, L., Hoffman, D.A. and McKay, R.D. (2012) Loss of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling during elevated activity causes vulnerability in hippocampal neurons. *J Neurosci*, **32**, 15511-15520.

Murray, P.J. (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*, **178**, 2623-2629.

Nagao, M., Sugimori, M. and Nakafuku, M. (2007) Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells. *Mol Cell Biol*, **27**, 3982-3994.

Namekata, K., Enokido, Y., Ishii, I., Nagai, Y., Harada, T. and Kimura, H. (2004) Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem*, **279**, 52961-52969.

Namour, F., Olivier, J., Abdelmouttaleb, I., Adjalla, C., Debard, R., Salvat, C. and Gueant, J. (2001) Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood*, **97**, 1092-1098.

Nicolas, J.P. and Gueant, J.L. (1995) Gastric intrinsic factor and its receptor. *Baillieres Clin Haematol*, **8**, 515-531.

Nielsen, L.A., Maroun, L.L., Broholm, H., Laursen, H. and Graem, N. (2006) Neural tube defects and associated anomalies in a fetal and perinatal autopsy series. *Apmis*, **114**, 239-246.

Nielsen, M.J., Rasmussen, M.R., Andersen, C.B., Nexo, E. and Moestrup, S.K. (2012) Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **9**, 345-354.

Nishiyama, M., Kato, Y., Hashimoto, M., Yukawa, S. and Omori, K. (2000) Apolipoprotein E, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation and the risk of senile dementia--an epidemiological study using the polymerase chain reaction (PCR) method. *J Epidemiol*, **10**, 163-172.

O'Leary, F. and Samman, S. (2010) Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*, **2**, 299-316.

O'Neill, C. (1998) Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum Reprod*, **13**, 1312-1316.

O'Rahilly, R. and Muller, F. (2002) The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*, **65**, 162-170.

Obeid, R., Schadt, A., Dillmann, U., Kostopoulos, P., Fassbender, K. and Herrmann, W. (2009) Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin Chem*, **55**, 1852-1860.

Olde Loohuis, N.F., Kos, A., Martens, G.J., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N. and Aschrafi, A. (2012) MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 89-102.

Oltean, S. and Banerjee, R. (2003) Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem*, **278**, 20778-20784.

Ouyang, S., Li, Y., Liu, Z., Chang, H. and Wu, J. (2013) Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. *Gene*, **515**, 308-312.

Paoli, P., Sbrana, F., Tiribilli, B., Caselli, A., Pantera, B., Cirri, P., De Donatis, A., Formigli, L., Nosi, D., Manao, G., Camici, G. and Ramponi, G. (2010) Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *J Mol Biol*, **400**, 889-907.

Papakostas, G.I., Shelton, R.C., Zajecka, J.M., Etemad, B., Rickels, K., Clain, A., Baer, L., Dalton, E.D., Sacco, G.R., Schoenfeld, D., Pencina, M., Meisner, A., Bottiglieri, T., Nelson, E., Mischoulon, D., Alpert, J.E., Barbee, J.G., Zisook, S. and Fava, M. (2012) L-methylfolate as adjunctive therapy for SSRI-resistant major depression: results of two randomized, double-blind, parallel-sequential trials. *Am J Psychiatry*, **169**, 1267-1274.

Park, S., Kim, D., Kaneko, S., Szewczyk, K.M., Nicosia, S.V., Yu, H., Jove, R. and Cheng, J.Q. (2005) Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *J Biol Chem*, **280**, 38932-38941.

Park, S.J., Shin, E.J., Min, S.S., An, J., Li, Z., Hee Chung, Y., Hoon Jeong, J., Bach, J.H., Nah, S.Y., Kim, W.K., Jang, C.G., Kim, Y.S., Nabeshima, Y., Nabeshima, T. and Kim, H.C. (2013) Inactivation of JAK2/STAT3 signaling axis and downregulation of M1 mAChR cause cognitive impairment in klotho mutant mice, a genetic model of aging. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1426-1437.

Pathania, M., Yan, L.D. and Bordey, A. A symphony of signals conducts early and late stages of adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, **58**, 865-876.

Pedersen, G.A., Chakraborty, S., Steinhauser, A.L., Traub, L.M. and Madsen, M. (2010) AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B(12) receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic*, **11**, 706-720.

Perez-Duenas, B., Toma, C., Ormazabal, A., Muchart, J., Sanmarti, F., Bombau, G., Serrano, M., Garcia-Cazorla, A., Cormand, B. and Artuch, R. (2010) Progressive ataxia and myoclonic epilepsy in a patient with a homozygous mutation in the FOLR1 gene. *J Inherit Metab Dis*, **33**, 795-802.

Perla-Kajan, J. and Jakubowski, H. (2012) Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids*, **43**, 1405-1417.

Perla-Kajan, J., Marczak, L., Kajan, L., Skowronek, P., Twardowski, T. and Jakubowski, H. (2007) Modification by homocysteine thiolactone affects redox status of cytochrome C. *Biochemistry*, **46**, 6225-6231.

Perna, A.F., Ingrosso, D. and De Santo, N.G. (2003) Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids*, **25**, 409-417.

Perna, A.F., Satta, E., Acanfora, F., Lombardi, C., Ingrosso, D. and De Santo, N.G. (2006) Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int*, **69**, 869-876.

Perrin, F.E., Boisset, G., Docquier, M., Schaad, O., Descombes, P. and Kato, A.C. (2005) No widespread induction of cell death genes occurs in pure motoneurons in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Hum Mol Genet*, **14**, 3309-3320.

Poehlmann, T.G., Busch, S., Mussil, B., Winzer, H., Weinert, J., Mebes, I., Schaumann, A., Fitzgerald, J.S. and Markert, U.R. (2005) The possible role of the Jak/STAT pathway in lymphocytes at the fetomaternal interface. *Chem Immunol Allergy*, **89**, 26-35.

Pollak, D., Cairns, N. and Lubec, G. (2003) Cytoskeleton derangement in brain of patients with Down syndrome, Alzheimer's disease and Pick's disease. *J Neural Transm Suppl*, 149-158.

Pooya, S., Blaise, S., Moreno Garcia, M., Giudicelli, J., Alberto, J.M., Gueant-Rodriguez, R.M., Jeannesson, E., Gueguen, N., Bressenot, A., Nicolas, B., Malthiery, Y., Daval, J.L., Peyrin-Biroulet, L., Bronowicki, J.P. and Gueant, J.L. (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. *J Hepatol*, **57**, 344-351.

Priester, M., Copanaki, E., Vafaizadeh, V., Hensel, S., Bernreuther, C., Glatzel, M., Seifert, V., Groner, B., Kogel, D. and Weissenberger, J. (2013) STAT3 silencing inhibits glioma single cell infiltration and tumor growth. *Neuro Oncol*, **15**, 840-852.

Pront, R., Margalioth, E.J., Green, R., Eldar-Geva, T., Maimoni, Z., Zimran, A. and Elstein, D. (2009) Prevalence of low serum cobalamin in infertile couples. *Andrologia*, **41**, 46-50.

Przybyla, L.M., Theunissen, T.W., Jaenisch, R. and Voldman, J. (2013) Matrix remodeling maintains embryonic stem cell self-renewal by activating Stat3. *Stem Cells*, **31**, 1097-1106.

Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H. and Goldman, I.D. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, **127**, 917-928.

Quadros, E.V., Nakayama, Y. and Sequeira, J.M. (2009) The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood*, **113**, 186-192.

Quadros, E.V. and Sequeira, J.M. (2013) Cellular uptake of cobalamin: transcobalamin and the TCblR/CD320 receptor. *Biochimie*, **95**, 1008-1018.

Quere, I., Paul, V., Rouillac, C., Janbon, C., London, J., Demaille, J., Kamoun, P., Dufier, J.L., Abitbol, M. and Chasse, J.F. (1999) Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 127-137.

Quiniou, E., Guichard, P., Perahia, D., Marco, S. and Mouawad, L. (2013) An atomistic view of microtubule stabilization by GTP. *Structure*, **21**, 833-843.

Qureshi, G.A., Qureshi, A.A., Devrajani, B.R., Chippa, M.A. and Syed, S.A. (2008) Is the deficiency of vitamin B12 related to oxidative stress and neurotoxicity in Parkinson's patients? *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **7**, 20-27.

Qureshi, I.A., Gokhan, S. and Mehler, M.F. (2010) REST and CoREST are transcriptional and epigenetic regulators of seminal neural fate decisions. *Cell Cycle*, **9**, 4477-4486.

Rajasethupathy, P., Fiumara, F., Sheridan, R., Betel, D., Puthanveettil, S.V., Russo, J.J., Sander, C., Tuschl, T. and Kandel, E. (2009) Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron*, **63**, 803-817.

Rajkovic, A., Catalano, P.M. and Malinow, M.R. (1997) Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol*, **90**, 168-171.

Ranke, B., Ranke, E. and Chow, B.F. (1960) The interrelationship between vitamin B6 and B12 deficiencies in rats. *J Nutr*, **71**, 411-415.

Rash, B.G., Lim, H.D., Breunig, J.J. and Vaccarino, F.M. (2011) FGF signaling expands embryonic cortical surface area by regulating Notch-dependent neurogenesis. *J Neurosci*, **31**, 15604-15617.

Ray, L., Khemka, V.K., Behera, P., Bandyopadhyay, K., Pal, S., Pal, K., Basu, D. and Chakrabarti, S. (2013) Serum Homocysteine, Dehydroepiandrosterone Sulphate and Lipoprotein (a) in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Aging Dis*, **4**, 57-64.

Rebeille, F., Jabrin, S., Bligny, R., Loizeau, K., Gambonnet, B., Van Wilder, V., Douce, R. and Ravanel, S. (2006) Methionine catabolism in Arabidopsis cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15687-15692.

Reese, M.L., Dakoji, S., Bredt, D.S. and Dotsch, V. (2007) The guanylate kinase domain of the MAGUK PSD-95 binds dynamically to a conserved motif in MAP1a. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 155-163.

Refsum, H., Guttormsen, A.B., Fiskerstrand, T. and Ueland, P.M. (1998) Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur J Pediatr*, **157 Suppl 2**, S45-49.

Regland, B., Johansson, B.V., Grenfeldt, B., Hjelmgren, L.T. and Medhus, M. (1995) Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J Neural Transm Gen Sect*, **100**, 165-169.

Reich, N.C. (2009) STAT3 revs up the powerhouse. *Sci Signal*, **2**, pe61.

Rejnmark, L., Vestergaard, P., Hermann, A.P., Brot, C., Eiken, P. and Mosekilde, L. (2008) Dietary intake of folate, but not vitamin B2 or B12, is associated with increased bone mineral density 5 years after the menopause: results from a 10-year follow-up study in early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*, **82**, 1-11.

Ren, D., Pipes, G.D., Liu, D., Shih, L.Y., Nichols, A.C., Treuheit, M.J., Brems, D.N. and Bondarenko, P.V. (2009) An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. *Anal Biochem*, **392**, 12-21.

Reynolds, E.H., Preece, J.M., Bailey, J. and Coppen, A. (1970) Folate deficiency in depressive illness. *Br J Psychiatry*, **117**, 287-292.

Robert, K., Nehme, J., Bourdon, E., Pivert, G., Friguet, B., Delcayre, C., Delabar, J.M. and Janel, N. (2005) Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology*, **128**, 1405-1415.

Roberts, J.M., Taylor, R.N., Musci, T.J., Rodgers, G.M., Hubel, C.A. and McLaughlin, M.K. (1989) Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*, **161**, 1200-1204.

Rodgers, G.M. and Kane, W.H. (1986) Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest*, **77**, 1909-1916.

Rodnight, R., Goncalves, C.A., Wofchuk, S.T. and Leal, R. (1997) Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res*, **30**, 325-338.

Rodriguez-Esparragon, F., Serna-Gomez, J.A., Hernandez-Velazquez, E., Buset-Rios, N., Hernandez-Trujillo, Y., Garcia-Bello, M.A. and Rodriguez-Perez, J.C. (2012) Homocysteinylated protein levels in internal mammary artery (IMA) fragments and its genotype-dependence. S-homocysteine-induced methylation modifications in IMA and aortic fragments. *Mol Cell Biochem*, **369**, 235-246.

Romao, L.F., Sousa Vde, O., Neto, V.M. and Gomes, F.C. (2008) Glutamate activates GFAP gene promoter from cultured astrocytes through TGF-beta1 pathways. *J Neurochem*, **106**, 746-756.

Ronco, A.M., Garrido, A., Llanos, M.N., Guerrero-Bosagna, C., Tamayo, D. and Hirsch, S. (2005) Effect of homocysteine, folates, and cobalamin on endothelial cell- and copper-induced LDL oxidation. *Lipids*, **40**, 259-264.

Rosenberg, I.H. (1990) 1989 Herman Award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers. *Am J Clin Nutr*, **51**, 531-534.

Rossbach, M. (2011) Non-Coding RNAs in Neural Networks, REST-Assured. *Front Genet*, **2**, 8.

Rummel, C., Hubschle, T., Gerstberger, R. and Roth, J. (2004) Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *J Physiol*, **557**, 671-687.

Rutsch, F., Gailus, S., Miousse, I.R., Suormala, T., Sagne, C., Toliat, M.R., Nurnberg, G., Wittkampf, T., Buers, I., Sharifi, A., Stucki, M., Becker, C., Baumgartner, M., Robenek, H., Marquardt, T., Hohne, W., Gasnier, B., Rosenblatt, D.S., Fowler, B. and Nurnberg, P. (2009) Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet*, **41**, 234-239.

Sadananda, A. and Ray, K. (2012) Neurogenetics of slow axonal transport: from cells to animals. *J Neurogenet*, **26**, 291-297.

Sansom, S.N., Griffiths, D.S., Faedo, A., Kleinjan, D.J., Ruan, Y., Smith, J., van Heyningen, V., Rubenstein, J.L. and Livesey, F.J. (2009) The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet*, **5**, e1000511.

Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J. and Shimizu, K. (2011) MicroRNAs and epigenetics. *Febs J*, **278**, 1598-1609.

Sauls, D.L., Lockhart, E., Warren, M.E., Lenkowski, A., Wilhelm, S.E. and Hoffman, M. (2006) Modification of fibrinogen by homocysteine thiolactone increases resistance to fibrinolysis: a potential mechanism of the thrombotic tendency in hyperhomocysteinemia. *Biochemistry*, **45**, 2480-2487.

Savage, D.G. and Lindenbaum, J. (1995) Neurological complications of acquired cobalamin deficiency: clinical aspects. *Baillieres Clin Haematol*, **8**, 657-678.

Schlager, M.A. and Hoogenraad, C.C. (2009) Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol Brain*, **2**, 25.

Schubert, J. and Krost, B. (2006) [Prevention of cleft lip and palate. Reducing risk of recurrence--a 25-year clinical experience]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, **10**, 301-305.

Schwahn, B.C., Chen, Z., Laryea, M.D., Wendel, U., Lussier-Cacan, S., Genest, J., Jr., Mar, M.H., Zeisel, S.H., Castro, C., Garrow, T. and Rozen, R. (2003) Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB J*, **17**, 512-514.

Seitz-Tutter, D., Langford, G.M. and Weiss, D.G. (1988) Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport. *Exp Cell Res*, **178**, 504-512.

Selhub, J. (1999) Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*, **19**, 217-246.

Serafini, G., Pompili, M., Innamorati, M., Giordano, G., Montebovi, F., Sher, L., Dwivedi, Y. and Girardi, P. (2012) The role of microRNAs in synaptic plasticity, major affective disorders and suicidal behavior. *Neurosci Res*, **73**, 179-190.

Sery, O., Sramkova, T., Klempova, J., Stastny, F., Lochman, J. and Khan, N.A. (2012) The relationship between the C677T polymorphism of the MTHFR gene and serum levels of

luteinizing hormone in males with erectile dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett*, **33**, 499-504.

Shaw, G.M., Jensvold, N.G., Wasserman, C.R. and Lammer, E.J. (1994) Epidemiologic characteristics of phenotypically distinct neural tube defects among 0.7 million California births, 1983-1987. *Teratology*, **49**, 143-149.

Shelkovnikova, T.A., Kulikova, A.A., Tsvetkov, F.O., Peters, O., Bachurin, S.O., Bukhman, V.L. and Ninkina, N.N. (2012) [Proteinopathies--forms of neurodegenerative disorders with protein aggregation-based pathology]. *Mol Biol (Mosk)*, **46**, 402-415.

Shookhoff, J.M. and Gallicano, G.I. (2010) A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. *Genesis*, **48**, 282-294.

Sibai, B.M. (1999) Thrombophilias and adverse outcomes of pregnancy--what should a clinician do? *N Engl J Med*, **340**, 50-52.

Sibrian-Vazquez, M., Escobedo, J.O., Lim, S., Samoei, G.K. and Strongin, R.M. (2010) Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 551-554.

Siebzehnrubl, F.A., Buslei, R., Eyupoglu, I.Y., Seufert, S., Hahnen, E. and Blumcke, I. (2007) Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells. *Exp Brain Res*, **176**, 672-678.

Sikora, M., Marczak, L., Twardowski, T., Stobiecki, M. and Jakubowski, H. (2010) Direct monitoring of albumin lysine-525 N-homocysteinylation in human serum by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*, **405**, 132-134.

Silla, Y., Sundaramoorthy, E., Talwar, P. and Sengupta, S. (2013) S-linked protein homocysteinylation: identifying targets based on structural, physicochemical and protein-protein interactions of homocysteinylated proteins. *Amino Acids*, **44**, 1307-1316.

Siqueira, E.R., Oliveira, C.P., Muniz, M.T., Silva, F., Pereira, L.M. and Carrilho, F.J. (2011) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and high plasma homocysteine in chronic hepatitis C (CHC) infected patients from the Northeast of Brazil. *Nutr J*, **10**, 86.

Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, **5**, 659-669.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.

Smithells, R.W., Sheppard, S. and Schorah, C.J. (1976) Vitamin dificiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*, **51**, 944-950.

Sohn, K.J., Croxford, R., Yates, Z., Lucock, M. and Kim, Y.I. (2004) Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 134-144.

Sontag, E., Hladik, C., Montgomery, L., Luangpirom, A., Mudrak, I., Ogris, E. and White, C.L., 3rd. (2004) Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*, **63**, 1080-1091.

Sontag, J.M., Nunbhakdi-Craig, V., Montgomery, L., Arning, E., Bottiglieri, T. and Sontag, E. (2008) Folate deficiency induces in vitro and mouse brain region-specific downregulation of leucine carboxyl methyltransferase-1 and protein phosphatase 2A B(alpha) subunit expression that correlate with enhanced tau phosphorylation. *J Neurosci*, **28**, 11477-11487.

Spiegelstein, O., Mitchell, L.E., Merriweather, M.Y., Wicker, N.J., Zhang, Q., Lammer, E.J. and Finnell, R.H. (2004) Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Dev Dyn*, **231**, 221-231.

Stabler, S.P. and Allen, R.H. (2004) Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr*, **24**, 299-326.

Stiess, M. and Bradke, F. Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol*, **71**, 430-444.

Stone, N., Pangilinan, F., Molloy, A.M., Shane, B., Scott, J.M., Ueland, P.M., Mills, J.L., Kirke, P.N., Sethupathy, P. and Brody, L.C. (2011) Bioinformatic and genetic association analysis of microRNA target sites in one-carbon metabolism genes. *PLoS One*, **6**, e21851.

Stover, P.J. (2011) Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, **4**, 293-305.

Stover, P.J. and Field, M.S. (2011) Trafficking of intracellular folates. *Adv Nutr*, **2**, 325-331.

Stroylova, Y.Y., Chobert, J.M., Muronetz, V.I., Jakubowski, H. and Haertle, T. (2012) N-homocysteinylation of ovine prion protein induces amyloid-like transformation. *Arch Biochem Biophys*, **526**, 29-37.

Stroylova, Y.Y., Zimny, J., Yousefi, R., Chobert, J.M., Jakubowski, H., Muronetz, V.I. and Haertle, T. (2011) Aggregation and structural changes of alpha(S1)-, beta- and kappa-caseins induced by homocysteinylation. *Biochim Biophys Acta*, **1814**, 1234-1245.

Sudchada, P., Saokaew, S., Sridetch, S., Incampa, S., Jaiyen, S. and Khaithong, W. (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 Res Clin Pract*, **98**, 151-158.

Sugimori, M., Nagao, M., Bertrand, N., Parras, C.M., Guillemot, F. and Nakafuku, M. (2007) Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development*, **134**, 1617-1629.

Sunden, S.L., Renduchintala, M.S., Park, E.I., Miklasz, S.D. and Garrow, T.A. (1997) Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys*, **345**, 171-174.

Susser, E., Brown, A.S., Klonowski, E., Allen, R.H. and Lindenbaum, J. (1998) Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association. *Biol Psychiatry*, **44**, 141-143.

Suszynska, J., Tisonczyk, J., Lee, H.G., Smith, M.A. and Jakubowski, H. (2010) Reduced homocysteine-thiolactonase activity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **19**, 1177-1183.

Suzuki, T., Matsuo, K., Hirose, K., Hiraki, A., Kawase, T., Watanabe, M., Yamashita, T., Iwata, H. and Tajima, K. (2008) One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*, **29**, 356-362.

Szebenyi, G., Bollati, F., Bisbal, M., Sheridan, S., Faas, L., Wray, R., Haferkamp, S., Nguyen, S., Caceres, A. and Brady, S.T. (2005) Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr Biol*, **15**, 1820-1826.

Szulwach, K.E., Li, X., Smrt, R.D., Li, Y., Luo, Y., Lin, L., Santistevan, N.J., Li, W., Zhao, X. and Jin, P. (2010) Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol*, **189**, 127-141.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3801-3804.

Tang, L.S., Santillano, D.R., Wlodarczyk, B.J., Miranda, R.C. and Finnell, R.H. (2005) Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **135C**, 48-58.

Tang, Y., Luo, Y., Jiang, Z., Ma, Y., Lin, C.J., Kim, C., Carter, M.G., Amano, T., Park, J., Kish, S. and Tian, X.C. (2012) Jak/Stat3 signaling promotes somatic cell reprogramming by epigenetic regulation. *Stem Cells*, **30**, 2645-2656.

Tanner, S.M., Li, Z., Bisson, R., Acar, C., Oner, C., Oner, R., Cetin, M., Abdelaal, M.A., Ismail, E.A., Lissens, W., Krahe, R., Broch, H., Grasbeck, R. and de la Chapelle, A. (2004) Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Hum Mutat*, **23**, 327-333.

Tatro, E.T., Risbrough, V., Soontornniyomkij, B., Young, J., Shumaker-Armstrong, S., Jeste, D.V. and Achim, C.L. (2013) Short-term recognition memory correlates with regional CNS expression of microRNA-138 in mice. *Am J Geriatr Psychiatry*, **21**, 461-473.

Tchantchou, F., Graves, M., Falcone, D. and Shea, T.B. (2008) S-adenosylmethionine mediates glutathione efficacy by increasing glutathione S-transferase activity: implications for S-adenosyl methionine as a neuroprotective dietary supplement. *J Alzheimers Dis*, **14**, 323-328.

Temple, S. (2001) The development of neural stem cells. *Nature*, **414**, 112-117.

Teng, Y.W., Mehedint, M.G., Garrow, T.A. and Zeisel, S.H. (2011) Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism, resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J Biol Chem*, **286**, 36258-36267.

Thomas, P. and Fenech, M. (2008) Methylenetetrahydrofolate reductase, common polymorphisms, and relation to disease. *Vitam Horm*, **79**, 375-392.

Thomas, P.K., Hoffbrand, A.V. and Smith, I.S. (1982) Neurological involvement in hereditary transcobalamin II deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **45**, 74-77.

Thompson, P.M., Tolbert, C.E. and Campbell, S.L. (2013) Vinculin and metavinculin: oligomerization and interactions with F-actin. *FEBS Lett*, **587**, 1220-1229.

Tili, E., Michaille, J.J., Costinean, S. and Croce, C.M. (2008) MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*, **4**, 534-541.

Timmer, J.R., Wang, C. and Niswander, L. (2002) BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development*, **129**, 2459-2472.

Timofeeva, O.A., Chasovskikh, S., Lonskaya, I., Tarasova, N.I., Khavrutskii, L., Tarasov, S.G., Zhang, X., Korostyshevskiy, V.R., Cheema, A., Zhang, L., Dakshanamurthy, S., Brown, M.L. and Dritschilo, A. (2012) Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *J Biol Chem*, **287**, 14192-14200.

Tokuraku, K., Katsuki, M., Matui, T., Kuroya, T. and Kotani, S. (1999) Microtubule-binding property of microtubule-associated protein 2 differs from that of microtubule-associated protein 4 and tau. *Eur J Biochem*, **264**, 996-1001.

Tolstykh, T., Lee, J., Vafai, S. and Stock, J.B. (2000) Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits. *Embo J*, **19**, 5682-5691.

Tozer, S., Le Dreau, G., Marti, E. and Briscoe, J. (2013) Temporal control of BMP signalling determines neuronal subtype identity in the dorsal neural tube. *Development*, **140**, 1467-1474.

Triantafyllou, N.I., Nikolaou, C., Boufidou, F., Angelopoulos, E., Rentzos, M., Kararizou, E., Evangelopoulos, M.E. and Vassilopoulos, D. (2008) Folate and vitamin B12 levels in levodopa-treated Parkinson's disease patients: their relationship to clinical manifestations, mood and cognition. *Parkinsonism Relat Disord*, **14**, 321-325.

Tsukamoto, H. and Lu, S.C. (2001) Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J*, **15**, 1335-1349.

Turkson, J., Bowman, T., Garcia, R., Caldenhoven, E., De Groot, R.P. and Jove, R. (1998) Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol*, **18**, 2545-2552.

Ueland, P.M. (2011) Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis*, **34**, 3-15.

Ueland, P.M. and Refsum, H. (1989) Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. *J Lab Clin Med*, **114**, 473-501.

Ueland, P.M., Refsum, H., Stabler, S.P., Malinow, M.R., Andersson, A. and Allen, R.H. (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem*, **39**, 1764-1779.

Undas, A., Slowik, A., Wolkow, P., Szczudlik, A. and Tracz, W. (2010) Fibrin clot properties in acute ischemic stroke: relation to neurological deficit. *Thromb Res*, **125**, 357-361.

Undas, A., Williams, E.B., Butenas, S., Orfeo, T. and Mann, K.G. (2001) Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*, **276**, 4389-4397.

Urayama, S., Semi, K., Sanosaka, T., Hori, Y., Namihira, M., Kohyama, J., Takizawa, T. and Nakashima, K. (2013) Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation. *Cell Struct Funct*, **38**, 55-66.

Vaccaro, O., Perna, A.F., Mancini, F.P., Iovine, C., Cuomo, V., Sacco, M., Tufano, A., Rivellese, A.A., Ingrosso, D. and Riccardi, G. (2000) Plasma homocysteine and microvascular complications in type 1 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **10**, 297-304.

Vadnal, J., Houston, S., Bhatta, S., Freeman, E. and McDonough, J. (2012) Transcriptional signatures mediated by acetylation overlap with early-stage Alzheimer's disease. *Exp Brain Res*, **221**, 287-297.

Vafai, S.B. and Stock, J.B. (2002) Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease. *FEBS Lett*, **518**, 1-4.

van der Put, N.M. and Blom, H.J. (2000) Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **92**, 57-61.

van der Put, N.M., van Straaten, H.W., Trijbels, F.J. and Blom, H.J. (2001) Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)*, **226**, 243-270.

van Leeuwen, F.W., Fischer, D.F., Benne, R. and Hol, E.M. (2000) Molecular misreading. A new type of transcript mutation in gerontology. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 267-281.

Verkleij-Hagoort, A., Bliek, J., Sayed-Tabatabaei, F., Ursem, N., Steegers, E. and Steegers-Theunissen, R. (2007) Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A*, **143A**, 952-960.

Vogelsberg-Ragaglia, V., Schuck, T., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol*, **168**, 402-412.

Vogt, M., Domoszlai, T., Kleshchanok, D., Lehmann, S., Schmitt, A., Poli, V., Richtering, W. and Muller-Newen, G. (2011) The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3. *J Cell Sci*, **124**, 900-909.

Wakahara, R., Kunimoto, H., Tanino, K., Kojima, H., Inoue, A., Shintaku, H. and Nakajima, K. (2012) Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells*, **17**, 132-145.

Waly, M.I., Kharbanda, K.K. and Deth, R.C. (2011) Ethanol lowers glutathione in rat liver and brain and inhibits methionine synthase in a cobalamin-dependent manner. *Alcohol Clin Exp Res*, **35**, 277-283.

Wan, J., Fu, A.K., Ip, F.C., Ng, H.K., Hugon, J., Page, G., Wang, J.H., Lai, K.O., Wu, Z. and Ip, N.Y. (2010) Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, **30**, 6873-6881.

Wang, J.Z., Gong, C.X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1995) Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem*, **270**, 4854-4860.

Wang, P., Chen, L., Zhang, J., Chen, H., Fan, J., Wang, K., Luo, J., Chen, Z., Meng, Z. and Liu, L. (2013a) Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene*.

Wang, R.Y., Phang, R.Z., Hsu, P.H., Wang, W.H., Huang, H.T. and Liu, I.Y. (2013b) In vivo knockdown of hippocampal miR-132 expression impairs memory acquisition of trace fear conditioning. *Hippocampus*, **23**, 625-633.

Wang, W., Kwon, E.J. and Tsai, L.H. (2012a) MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem*, **19**, 359-368.

Wang, Y., Fan, D.X., Duan, J., Li, M.Q., Zhu, X.Y. and Jin, L.P. (2012b) Thymic stromal lymphopoietin downregulates NME1 expression and promotes invasion in human trophoblasts via the activation of STAT3 signaling pathway. *Clin Immunol*, **143**, 88-95.

Watkins, D., Schwartzentruber, J.A., Ganesh, J., Orange, J.S., Kaplan, B.S., Nunez, L.D., Majewski, J. and Rosenblatt, D.S. (2011) Novel inborn error of folate metabolism: identification by exome capture and sequencing of mutations in the MTHFD1 gene in a single proband. *J Med Genet*, **48**, 590-592.

Weber, M., Kuhn, C., Schulz, S., Schiessl, B., Schleussner, E., Jeschke, U., Markert, U.R. and Fitzgerald, J.S. (2012) Expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and its activated forms is negatively altered in trophoblast and decidual stroma cells derived from preeclampsia placentae. *Histopathology*, **60**, 657-662.

Wei, J., Wang, F., Kong, L.Y., Xu, S., Doucette, T., Ferguson, S.D., Yang, Y., McEnery, K., Jethwa, K., Gjyshi, O., Qiao, W., Levine, N.B., Lang, F.F., Rao, G., Fuller, G.N., Calin, G.A. and Heimberger, A.B. (2013) miR-124 inhibits STAT3 signaling to enhance T cell-mediated immune clearance of glioma. *Cancer Res*, **73**, 3913-3926.

Weisberg, I.S., Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Chen, Z., Curtis Ellison, R., Eckfeldt, J.H. and Rozen, R. (2001) The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*, **156**, 409-415.

Werler, M.M., Shapiro, S. and Mitchell, A.A. (1993) Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA*, **269**, 1257-1261.

Wiklund, O., Fager, G., Andersson, A., Lundstam, U., Masson, P. and Hultberg, B. (1996) N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis*, **119**, 99-106.

Willemsen, M.H., Valles, A., Kirkels, L.A., Mastebroek, M., Olde Loohuis, N., Kos, A., Wissink-Lindhout, W.M., de Brouwer, A.P., Nillesen, W.M., Pfundt, R., Holder-Espinasse, M., Vallee, L., Andrieux, J., Coppens-Hofman, M.C., Rensen, H., Hamel, B.C., van Bokhoven, H., Aschrafi, A. and Kleefstra, T. (2011) Chromosome 1p21.3

microdeletions comprising DPYD and MIR137 are associated with intellectual disability. *J Med Genet*, **48**, 810-818.

Wilson, A., Leclerc, D., Saberi, F., Campeau, E., Hwang, H.Y., Shane, B., Phillips, J.A., 3rd, Rosenblatt, D.S. and Gravel, R.A. (1998) Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. *Am J Hum Genet*, **63**, 409-414.

Wilson, F.A., Holtrop, G., Calder, A.G., Anderson, S.E., Lobley, G.E. and Rees, W.D. (2012) Effects of methyl-deficient diets on methionine and homocysteine metabolism in the pregnant rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **302**, E1531-1540.

Wilson, P.A. and Hemmati-Brivanlou, A. (1995) Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, **376**, 331-333.

Witte, H., Neukirchen, D. and Bradke, F. (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol*, **180**, 619-632.

Wong, W.Y., Eskes, T.K., Kuijpers-Jagtman, A.M., Spauwen, P.H., Steegers, E.A., Thomas, C.M., Hamel, B.C., Blom, H.J. and Steegers-Theunissen, R.P. (1999) Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*, **60**, 253-257.

Wouters, M.G., Boers, G.H., Blom, H.J., Trijbels, F.J., Thomas, C.M., Borm, G.F., Steegers-Theunissen, R.P. and Eskes, T.K. (1993) Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*, **60**, 820-825.

Xia, X.G., Hofmann, H.D., Deller, T. and Kirsch, M. (2002) Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats. *Mol Cell Neurosci*, **21**, 379-392.

Xie, X., Mathias, J.R., Smith, M.A., Walker, S.L., Teng, Y., Distel, M., Koster, R.W., Sirotkin, H.I., Saxena, M.T. and Mumm, J.S. (2012) Silencer-delimited transgenesis: NRSE/RE1 sequences promote neural-specific transgene expression in a NRSF/REST-dependent manner. *BMC Biol*, **10**, 93.

Yamane, K., Jinnin, M., Etoh, T., Kobayashi, Y., Shimozono, N., Fukushima, S., Masuguchi, S., Maruo, K., Inoue, Y., Ishihara, T., Aoi, J., Oike, Y. and Ihn, H. (2013) Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J Mol Med (Berl)*, **91**, 69-81.

Yan, Y. and Mumby, M.C. (1999) Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*, **274**, 31917-31924.

Yang, X., Liang, L., Zhang, X.F., Jia, H.L., Qin, Y., Zhu, X.C., Gao, X.M., Qiao, P., Zheng, Y., Sheng, Y.Y., Wei, J.W., Zhou, H.J., Ren, N., Ye, Q.H., Dong, Q.Z. and Qin, L.X. (2013) MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology*, **58**, 158-170.

Yao, Z.G., Zhang, L., Huang, L., Zhu, H., Liu, Y., Ma, C.M., Sheng, S.L. and Qin, C. (2013) Regional and cell-type specific distribution of HDAC2 in the adult mouse brain. *Brain Struct Funct*, **218**, 563-573.

Yeh, S.D. and Chow, B.F. (1959) Vitamin B12 absorption in pyridoxine-deficient rats: further studies. *Am J Clin Nutr*, **7**, 426-432.

Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J. and Reeves, S.A. (2000) Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*, **10**, 47-50.

Yoo, A.S., Staahl, B.T., Chen, L. and Crabtree, G.R. (2009) MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature*, **460**, 642-646.

Yoon, S.N., Kim, K.S., Cho, J.H., Ma, W., Choi, H.J., Kwon, S.J. and Han, J.S. (2012) Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells. *Biochem J*, **441**, 407-416.

Yousefi, R., Jalili, S., Alavi, P. and Moosavi-Movahedi, A.A. (2012) The enhancing effect of homocysteine thiolactone on insulin fibrillation and cytotoxicity of insulin fibril. *Int J Biol Macromol*, **51**, 291-298.

Yu, H., Pardoll, D. and Jove, R. (2009a) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, **9**, 798-809.

Yu, I.T., Park, J.Y., Kim, S.H., Lee, J.S., Kim, Y.S. and Son, H. (2009b) Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. *Neuropharmacology*, **56**, 473-480.

Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna and Nixon, R.A. (2012) Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci*, **125**, 3257-3263.

Zampieri, B.L., Biselli, J.M., Goloni-Bertollo, E.M., Vannucchi, H., Carvalho, V.M., Cordeiro, J.A. and Pavarino, E.C. (2012) Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. *Dis Markers*, **32**, 73-81.

Zetterberg, H. (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol*, **2**, 7.

Zhang, C.E., Tian, Q., Wei, W., Peng, J.H., Liu, G.P., Zhou, X.W., Wang, Q., Wang, D.W. and Wang, J.Z. (2008a) Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*, **29**, 1654-1665.

Zhang, M., Ye, Y., Cong, J., Pu, D., Liu, J., Hu, G. and Wu, J. (2013) Regulation of STAT3 by miR-106a is linked to cognitive impairment in ovariectomized mice. *Brain Res*, **1503**, 43-52.

Zhang, X.M., Zhu, S.W., Duan, R.S., Mohammed, A.H., Winblad, B. and Zhu, J. (2008b) Gender differences in susceptibility to kainic acid-induced neurodegeneration in aged C57BL/6 mice. *Neurotoxicology*, **29**, 406-412.

Zhao, J.B., Zhang, Y., Li, G.Z., Su, X.F. and Hang, C.H. (2011) Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats. *Neurosci Lett*, **498**, 147-152.

Zhao, J.Y., Yang, X.Y., Gong, X.H., Gu, Z.Y., Duan, W.Y., Wang, J., Ye, Z.Z., Shen, H.B., Shi, K.H., Hou, J., Huang, G.Y., Jin, L., Qiao, B. and Wang, H.Y. (2012) Functional variant

in methionine synthase reductase intron-1 significantly increases the risk of congenital heart disease in the Han Chinese population. *Circulation*, **125**, 482-490.

Zhao, Y.N., Li, W.F., Li, F., Zhang, Z., Dai, Y.D., Xu, A.L., Qi, C., Gao, J.M. and Gao, J. (2013) Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, **435**, 597-602.

Zhuo, J.M., Wang, H. and Pratico, D. (2011) Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? *Trends Pharmacol Sci*, **32**, 562-571.

Zimny, J., Sikora, M., Guranowski, A. and Jakubowski, H. (2006) Protective mechanisms against homocysteine toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem*, **281**, 22485-22492.

Zoccolella, S., Lamberti, S.V., Iliceto, G., Santamato, A., Lamberti, P. and Logroscino, G. (2010) Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated patients with Parkinson's disease: potential implications in cognitive dysfunction and dementia? *Curr Med Chem*, **17**, 3253-3261.

Zorina, Y., Iyengar, R. and Bromberg, K.D. (2010) Cannabinoid 1 receptor and interleukin-6 receptor together induce integration of protein kinase and transcription factor signaling to trigger neurite outgrowth. *J Biol Chem*, **285**, 1358-1370.

Fiches techniques

Modèles d'études : description et entretien

Fiche 1

Lignée H19-7 / IGF-IR – Conditions de culture

Prolifération de la lignée H19-7 / IGF-IR

- La mise en culture des cellules a été réalisée comme décrite dans la littérature par Eves et al., (Eves et al., 1996)
- Deux heures avant l'ensemencement des plaques, préparer une solution aqueuse extemporanée et stérile de poly-L-lysine① à 15µg/mL
- Introduire 5 mL de la solution dans un flacon de culture②de 75 cm^2
- Incuber en atmosphère humide (5% CO_2 / 95% air) à 33°C
- Rincer deux fois au PBS③ 1X stérile
- Décongeler une ampoule H19-7/IGF-IR (Fiche 2)
- Incuber à 33°C en atmosphère humide (5% CO_2 / 95% air)
- Changer le milieu de culture tous les deux ou trois jours

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Concentration initiale	Concentration finale
H19-7/IGF-IR **Prolifération**	DMEM④⑤	Sérum de veau fœtal⑥	100%	10%
		Pyruvate de sodium④	100mM	1mM
		L-Glutamine④	200mM	2 mM
		Pénicilline/ Streptomycine④	10000U/10000 mg/mL	50U/50mg/mL
		Puromycine④	50mg/mL	2ng/mL
		Généticine G418④	100mg/mL	200µg/mL

Tableau 1 : Composition du milieu de culture de prolifération

Etude de la carence en folates (vitamine B9)

L'étude de la carence en vitamineB9 est appréhendée comme dans les conditions normales citées ci-dessus ; l'unique différence réside dans l'utilisation d'un DMEM totalement dépourvu d'acide folique (vitamine B9) mais dont la composition est identique qu DMEM classique

Lignée H19-7/IGF-IR : ATCC (Manassas) ;CRL 2526, numéro de lot **3507480**
①Poly-L-Lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 0,2µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
②Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
③PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
④ Tous les produits sont fournis par : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
⑤ DMEM classique (référence : 11960) : DMEM sans B9 (référence : D2429) SIGMA Sigma-Aldrich
⑥ SVF, Sérum de veau fœtal non décomplémenté : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Différenciation de la lignée H19-7 / IGF-IR

La différenciation de la lignée H19-7 permet d'obtenir des neurones matures à partir des progéniteurs neuronaux en prolifération.

- Remplacer le milieu de prolifération par le milieu de différenciation
- Incuber à 39°C en atmosphère humide (5% CO2/ 95% air)

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Concentration initiale	Concentration finale
H19-7/IGF-IR **Différenciation**	DMEM④⑤	Sérum de veau fœtal⑥	100%	1%
		Pyruvate de sodium④	100mM	250 µM
		L-Glutamine④	200mM	1 mM
		Pénicilline/ Streptomycine④	10000U/10000 mg/mL	50U/50mg/mL
		Puromycine④	50mg/mL	1 µg/mL
		Généticine G418④	100mg/mL	400µg/mL
		$N_2$⑦	100%	1%

Tableau 2 : Composition du milieu de culture de différenciation

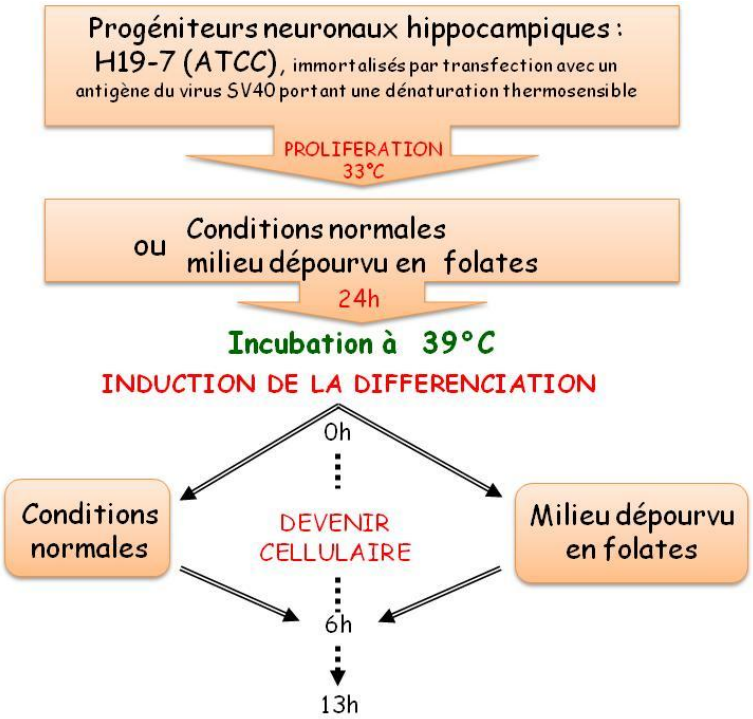


Figure 1 : Représentation schématique du protocole de culture des cellules H19-7.

⑦ Complément N_2 (Gibco) mélange de : progestérone, putrescine, sélénite de sodium, holo- transferrine humaine et enrichi en faceteur de croissance neuronal : le *basic fibroblast growth factor* (bFGF) et l'insuline humaine « *recombinant full chain* ».

Fiche 2

Congélation / Décongélation des lignées H19-7/IGF-IR

❖ Congélation des lignées

Dans du DMSO (9% DMSO①, 36% SVF, 55% DMEM)

- Pour une ampoule contenant 2.10^6 cellules :
- Préparer le milieu de congélation dans de la glace : 70 µL de DMSO, 300 µL de SVF, 450µL de milieu de culture correspondant aux cellules, Après avoir trypsiné, et compté les cellules, centrifuger
- de nouveau et retirer le surnageant. Déposer délicatement les 800 µL de milieu de congélation en agitant légèrement le tube à 4°C
- Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube②
- Placer les tubes dans la boite de congélation③
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans un container à azote liquide
- Référencer les tubes congelés et décongelés dans les registres de cultures cellulaires

❖ Décongélation des lignées

- Sortir le cryotube② de l'azote liquide et le réchauffer rapidement dans un bain-marie à 37°C
- Nettoyer l'extérieur du cryotube à l'alcool.
- Transvaser le contenu du cryotube dans un tube de 15 mL contenant 10 mL du milieu de prolifération
- Centrifuger 5 min à 700 *g* pour l'élimination du DMSO①
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 5 mL de milieu de prolifération
- Ensemencer une boite de culture de 25 cm^2
- Changer le milieu après 48h

① DMSO (Dimethylsulfoxide) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
②Cryotube : Nalgéne ; VWR international, Fontenay-sous-Bois, France
③Boite de congélation : Nalgéne Cryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive

Fiche 3

Repiquage des lignées

Tous les produits doivent être à température ambiante

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS stérile①
- Ajouter de la trypsine-EDTA② 0,05% à raison de 40 µL par cm^2 à trypsiner
- Incuber 5 à 10 min à 33°C
- Préparer pendant ce temps un tube de 15 mL avec du milieu de culture (2 fois le volume de trypsine)
- Décrocher les cellules à la pipette
- Resuspendre les cellules trypsinées dans le tube de 15 mL pour stopper la réaction
- Centrifuger à 700 *g* pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 mL de milieu de culture correspondant au milieu dans lequel les cellules seront ensemencées.
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma③
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à $N.10^4$ cellules/mL
- Pour l'entretien des cellules, ensemencer à $1,5.10^4$ cellule par cm^2

①PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France
② Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France
③ Cellule de Thoma : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche 4

Transfection des cellules par siARN

Principe : Les siARN sont des petits ARN interférents pouvant se lier spécifiquement à une séquence d'ARN messager spécifique et conduit à sa dégradation ou son inhibition, empêchant ainsi son expression ou diminuant sa traduction.

Mise en culture

- La veille de la transfection, ensemencer les cellules sur des lamelles① en verre ou dans des plaques② (voir tableau ci-dessous) traitées avec une solution de poly-L-lysine③ de 15 µg/mL dans du milieu de culture de prolifération (fiche 1)

Taille de la plaque/Surface	Densité d'ensemencement
P35mm	3 à 5 .10^5 cellules / puit
6-well plate	2 à 3 .10^5 cellules / puit
24-well plate	75.10^3 cellules / puit

- Une à deux heures avant la transfection, rincer les cellules avec du PBS④
- Ajouter du milieu DMEM⑤ classique (Sans addition) et incuber 1à 2 heures à 33°C en atmosphère humide (5% CO_2 / 95% air)
- Au moment de la transfection, remplacer le milieu par du DMEM contenant 1mM du pyruvate de sodium et 200 µg/mL de G418 (sans SVF, sans puromycine, sans antibiotiques)

Transfection

- Ramener le milieu de dilution opti-MEM à température ambiante
- Diluer le siARN dans l'opti-MEM⑥ (voir tableau 3) et homogénéiser doucement
- Diluer la lipofectamine RNAimax⑦ dans l'opti-MEM et homogénéiser doucement
- Laisser incuber 5 min à température ambiante
- Mélanger les deux tubes en ajoutant la solution de lipofectamine diluée à celle du siARN
- Homogénéiser et laisser incuber 20 minutes à température ambiante
- Ajouter le mélange lipofectamine/siARN sur les cellules (goutte à goutte sur le milieu de culture sans SVF ni antibiotiques) et mélanger doucement en agitant la plaque en croix
- Incuber les cellules en atmosphère humide (5% CO_2 / 95% air)
- 4 heures après la transfection, ajouter 10% de SVF au milieu et
- Replacer les cellules dans l'incubateur pour une durée de 48-96 heures avant la différenciation

		Séquence	Quantité ou Volume pour boîte de 6 puits*	Volume opti-MEM
SiARN	MARS	5'-GCGCAGUAUCCUUACCAUA -3'	30µL	250 µL
	miR-124	5'-UAAGGCACGCGGUGAAUGCC -3'	30µL (25nm) première transfection, 12 µL (10nM) re-transfection le lendemain	250 µL
	Contrôle négatif		30µL	250 µL
Lipofectamine			4µL	250 µL

Tableau 3 : Séquences et quantités utilisées de siRNA pour les transfections.

*Les volumes sont divisés par 4 pour les plaques de culture de 24 puits

- ① Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldriche
- ②Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
- ③Poly-L-Lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 0,2µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
- ④PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
- ⑤ DMEM classique (référence : 11960) : DMEM sans B9 (référence : D2429) SIGMA Sigma-Aldrich
- ⑥ Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
- ⑦miR-124 : Ambion, Applied Biosystems, France

MARS: Ambion, Life technologies, France

⑧ Invitrogène, Saint Aubin, France

Fiche 5

Liste des traitements utilisés

Les différents traitements sont ajoutés au milieu de culture au moment de l'induction de la différenciation pour une durée 13 heures.

Inhibiteurs	Concentration	Fournisseur	Rôle biologique
5-Azacytidine (5-AZA)	2 µM	Sigma-Aldrich①	Inhibiteur des ADN méthyltransférases
suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	2,5 µM	Aton Pharma②	Inhibiteur des histones désacétylases
Homocystéine thiolactone	100 µM	Sigma-Aldrich①	Mime de l'accumulation endogène de l'homocystéine

① Sigma-Aldrich, Lyon, France
② Aton Pharma, Lawrenceville, Etats Unis

Fiche 6

Cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat (E19)

Préparation des plaques de culture

- Préparer une solution de Poly-DL-ornithine① à 150 µg/mL à diluer dans du PBS-Glucose 30%②
- Stériliser les lamelles en verre③ et tous les instruments de dissection
- Placer une lamelle au fond de chaque puits
- Stocker les plaques dans un incubateur saturé en humidité (maximum 24h)
- Avant la dissection, laver les plaques 2 fois avec du PBS-glucose 30%
- Stocker les plaques en présence de PBS-glucose 30% dans l'incubateur jusqu'à l'utilisation

Dissection

- Endormir l'animal avec un excès d'halothane vétérinaire④
- Inciser le bas de l'abdomen, au niveau de l'utérus et sortir les sacs vitellins
- Prélever l'utérus gravide
- Chaque déciduale, une fois disséquée est rincée au PBS afin d'enlever l'excès de sang
- Sortir les embryons du placenta et les maintenir à 37°C
- Couper la tête
- Incision transversale puis dégagement du cerveau. Le maintenir dans du PBS-glucose 30%
- Dans le milieu MSS (*tableau n°3*), couper le cervelet et séparer les deux hémisphères cérébraux, enlever les méninges, les bulbes olfactifs et le cortex puis récupérer l'hippocampe
- Couper l'hippocampe en petits morceaux à l'aide de petits ciseaux et les grouper dans un tube de 15 mL. Laisser décanter puis aspirer le milieu
- Incuber en présence d'accutase⑤ (1 mL d'accutase + 2 mL MSS + filtration) : 4 min, à température ambiante et sous agitation lente et douce
- Laisser décanter 1 min puis aspirer l'accutase
- Incuber avec 4 mL de la solution d'arrêt DNase I⑥ (4 mL MSS + 100 µL SVF + 40 µL DNase I + filtrationà 0,2µm) : 10 min, dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide (5% CO_2/ 95% air)
- Dissociation mécanique douce à la seringue (2 mL), aiguille (0,45X12 mm), si nécessaire changer de tube en laissant les plus gros morceaux au fond
- Centrifuger : 700 *g*, 5 min à température ambiante
- Laver 2 fois les culots cellulaires avec 5 mL de PBS-glucose, dissocier et centrifuger à 700 *g*, 5 min à température ambiante
- Resuspendre délicatement le culot cellulaire dans le milieu M2 (*tableau n°3*)
- Estimer la densité cellulaire de la suspension par comptage sur une cellule de Thoma
- Les plaques sont ensemencées à une densité cellulaire de $1{,}5.10^5$ cellules par puits de 1,9 cm^2 de surface dans du milieu M2
- Changement de milieu : au deuxième et troisième jour de culture en remplaçant le milieu par le milieu M2 frais enrichi en hormones

Milieu de culture de base MSS	Milieu M2
- Milieu de Eagle modifié selon Dulbecco et milieu de Ham F12⑦ (50:50) dépourvu de L- glutamine - Glucose⑧ : 30 g/L - Bicarbonate de sodium⑧ : 7,5 g/L - L-glutamine⑧ : 30 mg/L - Streptomycine⑧ : 25mg/L - Pénicilline⑧ : 25mg/L - Tampon Hepes⑧ : 240g/L pH 7,4	- 90% MSS - Apo-transférine⑧: 100 mg/L - Insuline bovine⑧ : 5 mM - Progestérone⑧: 10 nM - Putrescine ⑧: 100 mM - Sélénium⑧: 30 nM

Tableau 4 : Composition du milieu de culture

① Poly-DL-ornithine 150 µg/mL : (filtration 0,2 µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
② PBS-Glucose 30% : PBS 1X (Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France), D-Glucose (Sigma-Aldrich ; St Louis, USA)
③ Lamelles de verre, diamètre 14mm, stérilisées : CML, Nemours, France
④ Halothane vétérinaire, (2-Bromo-2-chloro-1, 1,1-trifluoroéthane) : Belamont, Mundipharma
⑤ Accutase : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑥ DNase I: Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑦ DMEM/F12 : Gibco/ Invitrogen ; Cergy Pontoise, France
⑧ Produits pour la culture cellulaire provenant de chez : Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche 7

Protocol animal

- Les animaux ont été traités selon les recommandations du *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* (NIH, MD, 1985).
- Espèce utilisée : rats Wistar Han IGS
- Provenance des animaux : Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France
- Poids à l'arrivée : 180-210 g
- Age à l'arrivée : 2 mois
- Acclimatation : 2 semaines
- Environnement: conditions standard d'élevage dans une animalerie qui consrve un température ambiante 22-23°C avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12h, 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, 2 groupes de rates ont

été créés selon le régime alimentaire fourni :

Groupes	Régime
Témoin	Standard①
Carencé	Carencé②

- Accouplement : Après un mois d'adaptation les rates sont mises en présence des mâles.
- Après 24h, réaliser un frottis vaginal qui témoignera du jour exact de l'accouplement (J0) :
  - Utiliser un coton tige imbibé de sérum physiologique
  - Etaler le prélèvement sur une lame
  - Observer la lame au microscope
  - Si le test est positif, considérer le jour J0 de gestation et retirer le mâle de la Cage
  - Si le test est négatif, laisser la rate en présence du mâle et recommencer la manipulation après 24h

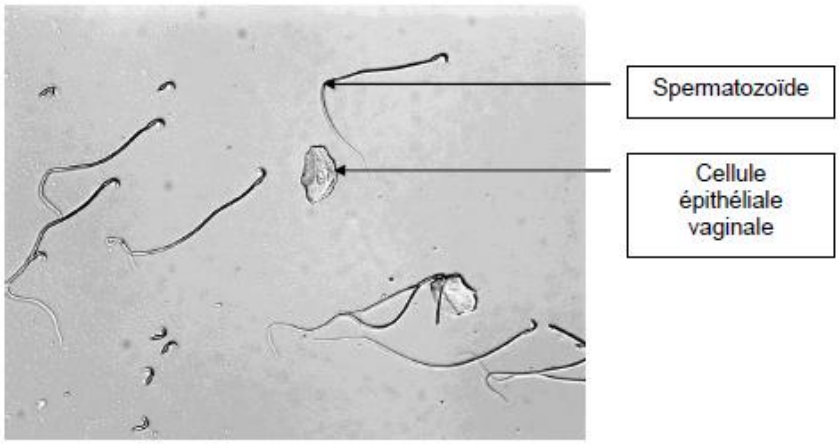


Figure 2 : Exemple de photo montrant un test positif

- Gestation : compter 20 jours à partir de J0 et sacrifier les mères afin de prélever les organes ainsi que les embryons (fiche 8)

N.B : Pour les études complémentaires sur les rats à J21 (correspond à la date de sévrage) et les rats J450 (Vieilissement), le protocole animal se poursuit jusqu'à naissance des ratons. Dans les 24 heures après la délivrance, la portée est réduite à dix individus pour la standarisation de l'étude. Pour les animaux concernés, la carence est maintenue jusqu'au moment du sevrage (21 jours postnatals) à travers l'allaitement maternel ; au-delà, une alimentation standard est donnée aux animaux.

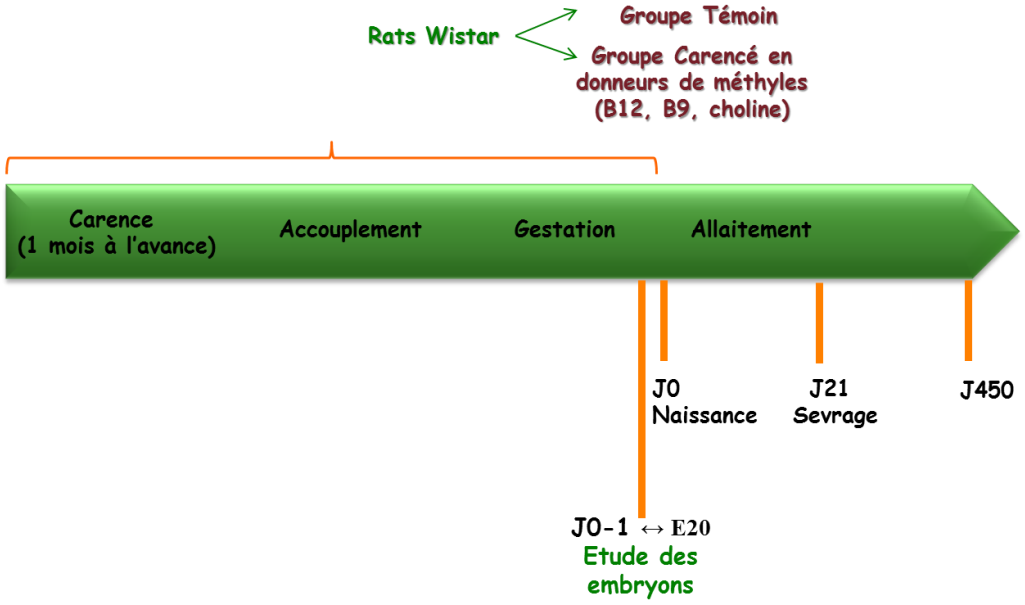


Figure 3 : Représentation schématique du protocole animal élaboré au laboratoire.

①Régime alimentaire normal : SAFE, Augy, France
vitamine B12 (0,04 mg/kg), folates (0,9 mg/kg), choline (2100 mg/kg)
②Régime carencé, Special Diet Service, Saint- Gratien, France
vitamine B12 (0 µg/kg), folates (0,01 mg/kg), choline (0,06 mg/kg)

Fiche 8

Prélèvements des échantillons

Protocole embryonnaire :

- A 20 jours de gestation, anesthésier les rates gestantes avec un excès d'isoflurane①
- Effectuer un prélèvement sanguin intracardiaque à l'aide d'une seringue héparinée② pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine
- Recueillir le sang dans des tubes③ contenant 50 µL d'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique)
- Centrifuger à 3000 g pendant 20 min à 4°C pour récupérer le plasma
- Récupérer les embryons dans l'utérus des rates, chaque embryon étant isolé dans des sacs amniotiques indépendants et possédant un placenta individuel (qui sera prélevé)
- Examiner les embryons et l'utérus afin de déceler les éventuelles anomalies embryonnaires (avortons, malformations foetales, mort *in utero*…)
- Placer les embryons sur la glace et disséquer chaque embryon afin de récupérer les organes (**Cerveau**, cœur, estomac, foie, rein, …)
- Le cerveau a été rapidement collecté. Pour la standarisation de l'étude, la portée s'est limitée à 10 individus :
  - Les six premiers servant de microdissections régionales (prélèvement Cervelet, Cortex, Hippocampe et Reste) destinées aux analyses biochimiques et de biologie moléculaire (dosage tissulaire, extractions d'ARN, d'ADN et de protéines..) ont été congelés dans de l'azote liquide puis placés à -80°C
  - Les 3 suivants ont été fixés entiers dans le paraformaldéhyde 5%④ (pour les analyses d'immunohistochimie et de colorations histologiques
  - Un embryon fixé entier dans le paraformaldéhyde 5% pour l'analyse des embryons (in-toto) ou pour la coloration des cytosquelettes

Protocole post-natal :

Certaines portées ont été sacrifiées à l'âge de 21 jours ou de 450 jours. Pour ceux-ci chaque rat est anesthésié avec un excès d'isoflurane puis sacrifié. Les mêmes prélèvements intracardiaques ont été effectués pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, B12 et homocystéine. Pour les animaux destinés à être sacrifié à 450 jours, de précédants prélèvement sanguins à la queue ont été réalisés en cinétique (205 et 330 jours) afin d'analyser les mêmes paramètres biochimiques.

- Le cerveau a été rapidement collecté et sectionné dans son axe sagittal en deux hémisphères :
  - Les demi-sphères destinées au protocole d'immunofluorescence et de colorations histologiques ont été fixés dans le paraformaldéhyde 4%
  - Les fragments de l'autre demi-cerveau après dissections régionales ont été congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C

①Isoflurane, Baxter
②Seringues traitées avec de l"héparine, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
③Tubes héparinés, Dutscher
④Paraformaldéhyde, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Dosages Biochimiques

Fiche 9

Extraction des protéines cytosoliques

La préparation se fait en maintenant les échantillons à 4°C

- Entretenir les cellules dans des boites de Pétri① de 145 mm de diamètre
- Lorsque les cellules sont à « confluence » rincer 2 fois les boîtes avec 15 mL de PBS② froid
- Gratter les cellules et transférer dans des microtubes
- Rincer 2 fois avec du PBS
- Sécher le culot cellulaire
  - ➔ Possibilité de congélation des boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction
- Reprendre des culots dans un tampon hypotonique préparé extemporanément③ contenant 2% de cocktail inhibiteur de protéases④
- Lyser les cellules à l'aide d'un sonicateur⑤ à sonde, pendant 1 min en mode pulsé, microtype (*dutty cycle* 30%) LIMIT 7 en maintenant les échantillons dans la glace
- Centrifuger 30 min à 20000 g à 4°C
- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche 30)

① Plastiques à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
②PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France
③(PBS 0,1% et protéase inhibitor cocktail 2%) soit (500mL PBS 1x et 4,4mL H2O miliQ _ PBS 0,1%) + (100mL Protéase cocktail)
④ Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑤*Cell sonifier disruptor,* Branson®

Fiche 10

Dosage vitamine B12/B9

Technique radioisotopique, SimulTRAC-SNB①

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

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

- Extraire les échantillons protéiques à partir des cultures cellulaires comme décrit dans la Fiche 9

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

  Les étalons de vitamine B12 et folates étant dilués dans de la serumalbumine, du chlorure de sodium et des agents stabilisateur de conservation

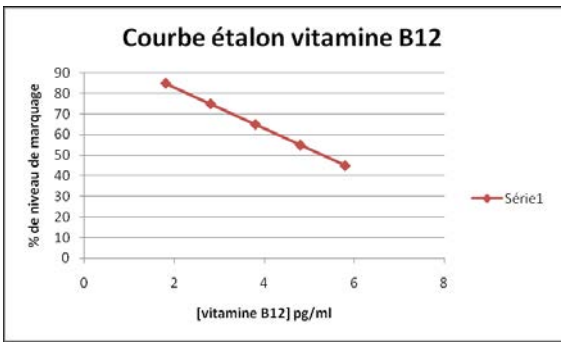
- Déposer 200 µL d'homogénat protéique ou de milieu de culture dans un tube à hémolyse
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT②, agiter
- Incuber à température ambiante pendant 15 min
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction, vortexer
- Incuber à température ambiante pendant 15 min
- Ajouter 1000 µL de réactif de liaison SimulTRAC-SNB, agiter
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 60 min, à l'abri de la lumière
- Centrifuger pendant 10 min à 1000 g
- Eliminer le surnageant
- Compter la radioactivité du culot à l'aide d'un compteur gamma③

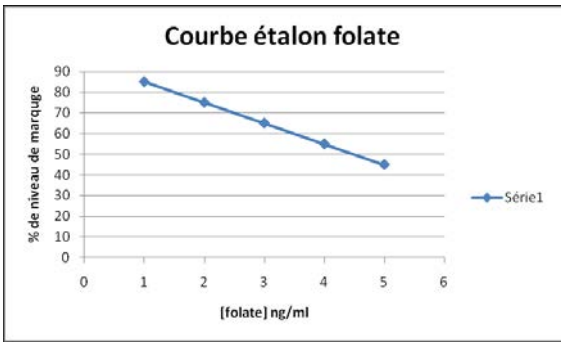
Calcul des résultats

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

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

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





- La concentration de la vitamine B12 ou en folates dans la 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

Fiche 11

Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique

Principe : L'homocystéine liée aux protéines est quantifiée après libération par ajout d'un réducteur, et ceci à partir de 50 µL mélange protéique (Fiche 9). Les protéines sont précipitées au méthanol. Les concentrations plasmatiques en homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique sont ensuite mesurées par une technique de chromatographie liquide 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 en plasma et à ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante.

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

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

	Homocystine ① (MM 268,4)	**Homocystine** d8③ (98%)	**MMA**② (118.09 ; >99%)	**MMA** d3④ (98%)	**Acide succinique** (118.09 ; >99%)	**Acide succinique** d6 (MM 124.13 ; 98%)
Poudre (mg) *	13.27	13.8	11.809	12.356	11.809	12.666
HCl 0.1 N *(T° amb, hormones)*	50 mL	50 mL				
	Vortexer, soniquer					
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL				
DTT	132.7 mg	132.7 mg				
HCl 0,1 N	qsp 100 ml					
H_2O Milli Q			100 mL	100 mL	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	1 mM	1 mM
Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à – 20°C.						

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

- **Préparer 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
Ac Succinique	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078

- **Préparer le mélange de standards internes :**
  150 µL de **HCYd4** à 1 mmol/L
  150 µL d'**ac succinique d6** à 1 mmol/L
  10 µL de **MMA d3** à 2 mmol/L
  4,5 ml de DTT② 200 mmol/L

- **Préparation des contrôles d'homocystéine :**
  Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilizé⑤
  Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusque dissolution totale. Aliquoter à 200 µL et conserver à -20°C

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

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

- Préparation des extraits protéiques selon la procédure décrite précédemment (fiche 9)
- Ultra soniquer pour dilution complète, conserver à -80°C
- 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 :

	Double blanc	**Standards S0**	**Standards S1 à S8**	**Contrôles (pool, levels 1 & 2)**	**Patients**
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 minutes, 10 min

- Reprendre 100 µL de surnageant dans un godet de 1,5 ml (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMSMS) par 400 µL d'H_2O 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

❖ **Méthodes :**

- Lancement de la méthode LCMSMS 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 & acide succinique et présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle)
  - Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

① DL Homocystine, acide succinique, 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 et acide succinique d6
⑤ Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyphylizé (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

Fiche 12

Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR

Principe : La MTR est une enzyme cytoplasmique de 135 kDa contenant du zinc et qui catalyse la réaction suivante : L'enzyme peut être spontanément inactivée au cours de la réaction à cause d'une oxydation du Cobalt (I) en Cobalt (II). La réactivation par reméthylation réductrice est catalysée par la Méthionine synthase réductase (MTRR, EC 1.16.1.8) et demande l'utilisation de S-adénosylméthionine.

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau milli-Q désoxygénée (sous flux d'azote gazeux durant 30 minutes) et le mélange réactionnel est maintenu sous un flux d'azote durant toute la préparation. Le méthyltétrahydrofolate (MeTHF) et l'hydroxocobalamine (OH-B12) étant photolabiles, ils sont conservés dans des tubes noirs.

- La réaction est réalisée dans un **volume final de 100 µL** contenant :

Vol réac : 100 µL	C réaction	C stock	Volume
Protéines	**~500 µg**	~20 µg/µL	25 µL
$K_2H/KH_2(PO_4)$ pH 7,2	**100 mM**	1 M	10 µL
DTT① (H_2O)	**25 mM**	580 mM	4.3 µL
Na/Ascorbate① (H_2O)	**25 mM**	720 mM	3.5 µL
SAM① (H_2O)	**20 µM**	2 mM	1 µL
Methyl-B12② (H_2O)	**50 µM**	5 mM	1 µL
Homocystéine① (HCl 1N)	**5 mM**	500 mM	1 µL
MeTHF① (DTT 10 mM)	**0,225 mM**	22,5 mM	1 µL
[^{14}C]MeTHF③ (DTT 10 mM)	**25 µM**	2,5 mM	1 µL
H_2O qsp 100 µL			52.2 µL

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme
- Arrêt de la réaction en chauffant les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace
- Centrifuger à 12.000 *g* pendant 10 min à 4°C
- Equilibrer les colonnes④ par des lavages successifs (4x5 mL d'HCl 0,5 N), puis un autre lavage de 5x2 mL d'eau milli-Q
- Charger les colonnes avec l'échantillon (100µL) puis rincer le gel avec 3x1 mL d'eau milli-Q

- La radioactivité est comptée dans des tubes en Polyéthylène⑤ en mélangeant 1 volume d'éluat à 4 volumes de Pico-Fluor™⑥
- La [$^{14}CH_3$] méthionine produite a été mesurée sur un analyseur⑦ TRI-CARB, 1900CA
- Eluer le [^{14}C] méthyl-tétrahydrofolate en régénérant les colonnes avec 4x5mL d'acide chlorhydrique

Calcul : La radioactivité spécifique (Rs) est mesurée par comptage d'un aliquote de [^{14}C] méthyl-tétrahydrofolate et calculée selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Radioactivité totale pour un échantillon (cpm)} \times 10^9}{\text{Concentration totale en folate (M)} \times \text{volume réactionnel (L)}}$$

Rs est exprimée en cpm / nmol de groupement méthyl et permet le calcul de l'activité spécifique de l'enzyme qui est exprimée en nmol/h/mg de protéines.

Une cinétique sur 4 temps est réalisée pour chaque échantillon, une droite de régression est réalisée, avec affichage de l'équation de la droite du type y = ax + b et du R^2. La pente (exprimée en nmol de HCHO formée / mg de protéine) est alors utilisée pour calculer l'activité enzymatique de la MTHFR dans l'échantillon considéré (exprimée en nmol de HCHO formée / mg de protéine / h).

① DTT(H_2O), Na/Ascorbate(H_2O), SAM(H_2O), MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
② Methyl-B12(H_2O) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
③ [^{14}C]MeTHF : GE Healthcare
④ Colonne AG1x8, résine cationique échangeuse d'anions Cl^- : Bio-Rad Laboratories, (Marnes-la-Coquette, France)
⑤ Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20mL : Packard Biosciences, Etats-Unis
⑥ PicoFluor : agent de scintillation (Packard Biosciences, (Etats-Unis). Colonnes AG 1-X8 :BioRad Laboratories
⑦ Analyseur TRI-CARB, 1990CA : Packard Biosciences, Etats-Unis

Fiche 13

Mesure de l'activité de la Méthylènetétrahydrofolate Réductase, MTHFR

Principe : La MTHFR est un homotétramère de ~77kDa par sous unité qui peut être inhibée allostériquement par la S-adénosylméthionine.

Bien que la réduction du Méthylènetétrahydrofolate (CH_2-THF) en Méthyltétrahydrofolate (CH_3-THF) soit irréversible, on utilisera les propriétés de la MTHFR qui est capable *in-vitro*, de catalyser la réaction inverse en présence de Ménadione :

MéthylTHF + ménadione bisulfite → MéthylèneTHF + ménadione réduit

La radioactivité contenue dans la phase organique (supérieure) correspond au CH_2-THF produit par la réaction enzymatique.

- La réaction est réalisée dans un **volume final de 200 µL** contenant :

	Concentration réaction	Concentration stock	*Volume*	**Volume réactionnel par échantillon : 200 µL**
Protéines			*40 µL*	40 µL
Tampon phosphate potassium pH 6,3	**180 mM**	1,8 M	*20 µL*	*Mix 160 µL*
Ménadione (K3)①	**3,6 mM**	90 mM	***8 µL***	
EDTA①	**1,4 mM**	0,5 M	*0,56 µL*	
Ascorbate①	**7,2 mM**	720 mM	*2 µL*	
FAD①	**178 µM**	17,8 mM	*2 µL*	
MeTHF①	**50 µM**	22,5 mM	*0,44 µL*	
[^{14}C]MeTHF②	**50 µM**	2,5 mM	***2 µL***	
H_2O qsp 160 µL			*125 µL*	

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme.
- Chauffer les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace.
- Un mélange contenant du formaldéhyde, du dimédone et de l'acétate de sodium est ajouté dans les proportions détaillées dans le tableau de la page suivante :

	Concentration réaction	Concentration stock	*Volume réactionnel par échantillon*
Formaldéhyde①	20,6 mM	1 M	*10 µL*
Dimédone①	103,1 mM	0,25 M	*200 µL*
Acétate de sodium①	463,9 mM	3 M	*75 µL*

- Vortexer le mélange pendant 10s
- Chauffer à 95°C durant 15min (les tubes sont percés et maintenus sous une hotte aspirante durant la réaction)
- Les tubes sont refroidis dans la glace 10 min
- Ajouter dans chaque tube 1mL de toluène③ (sous une hotte aspirante)
- Vortex pendant 30 s
- Centrifuger à 1000 *g* pendant 5 min à température ambiante
- La phase organique (supérieure) contient le [^{14}C] provenant du produit final de la réaction : le méthylènetetrahydrofolates
- Ajouter chaque phase à 4 mL de Pico-Fluor™④ dans des tubes en polyéthylène⑤ avant de compter la radioactivité du [^{14}C] contenu dans chaque phase sur un compteur béta⑥

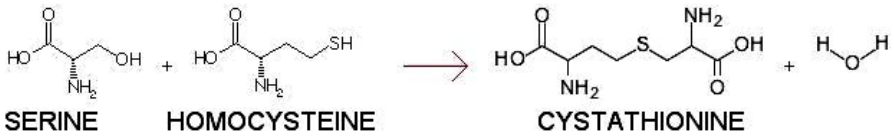
<u>Calcul :</u> une droite de régression est réalisée, avec affichage de l'équation de la droite du type y = ax + b et du R^2. La pente (exprimée en nmol de HCHO formée / mg de protéine) est alors utilisée pour calculer l'activité enzymatique de la MTHFR dans l'échantillon considéré (exprimée en nmol de HCHO formée / mg de protéine / h).

① Ménadione bisulfite, EDTA, ascorbate, FAD, MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
② [^{14}C]MeTHF : GE Healthcare, (91898 Orsay Cedex, France)
③ Toluène : VWR International, 94126 Fontenay sous bois, France
④ Picofluor : Pico-Fluor™ peut être remplacé par de l'Ultima Gold non toxique pour l'environnement
⑤ Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20 mL ; Packard Biosciences, (Etats-Unis)
⑥ Analyseur TRI-CARB, 1990CA ; Packard Biosciences, (Etats-Unis)

Fiche 14

Mesure de l'activité enzymatique de la cystathionine-β-synthase (CBS)

Principe : La CBS (EC 4.2.1.22) est une enzyme cytosolique composée de 4 sous unités de 63 kDa. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



La mesure d'activité de la CBS est basée sur la condensation de l'homocystéine et d'une sérine radiomarquée en cystathionine radiomarquée. La séparation des deux éléments radiomarqués est obtenue après un passage sur une colonne chromatographique échangeuse de cations. La fraction éluée (contenant la cystathionine) est alors comptée.

- La réaction est réalisée dans un **volume final de 100 µL** contenant

Volume réac : 100µL	C réaction	C stock	Volume
Protéines	**~ 400 µg**	~20 g/L	~20 µL
Tris-HCl pH 8.6	**50 mM**	2 M	2,5 µL
PLP① (HCl 1N)	**1 mM**	100 mM	1 µL
Sérine② (H_2O)	**5 mM**	100 mM	5 µL
[^{14}C]Sérine③	**0,05 µCi**	50 µCi/mL	1 µL
D, L Homocystéine④ (HCl 1N)	15 mM	500 mM	3 µL
H_2O qsp 100 µL			67,5 µL

- Incuber à 37°C pendant 20, 40,60 ou 80 min dans un bloc chauffant thermostaté (dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme
- Arrêt de la réaction en chauffant à 95°C pendant 5min
- Refroidir à 4°C dans de la glace
- Le pH est diminué en ajoutant 50 µL d'acide formique (98%) et 350 µL de tampons A⑤
- Centrifuger les tubes à 12.000 *g* pendant 10 min à 4°C
- Eliminer le culot

- Déposer le surnageant sur une colonne⑥ PolyPrep Chromatography Columns préalablement équilibrée en ions Li^+ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
- La [^{14}C] Sérine en excès dans l'échantillon est éliminée en lavant le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL de tampon A.
- La [^{14}C] cystathionine produite lors de la réaction est éluée en lavant le gel avec 2 x 3 mL de tampon B⑦
- La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 3 mL d'éluat et 15 mL de liquide de scintillation⑧

  Compter la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA

① PLP : (Sigma-Aldrich, St Louis, France), pyridoxal 5'-phosphate, (vitamine B_6) dissout à 100 mM dans HCl 1N. La solution est stockée à –20°C dans des tubes noirs car le PLP est photosensible
② D, L Sérine : (Sigma, S4375, (±)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) dissout à 100mM dans H_2O
③ L-[U-^{14}C] Sérine : (Amersham Pharmacia Biotech, CFB.72, (S)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) à 50µCi/mL et 155mCi/mmol, soit 322µM.
④ D, L Homocystéine (Hcy) : (Sigma, H4628, 2-Amino-4-mercaptobutyric acid) dissout à 500mM dans HCl 1N. La solution est désoxygénée en passant un flux d'azote gazeux durant 30min, et stockée par aliquotes à –20°C
⑤ Tampons A : Ac. Maléique 25 mM, pH 1,8 et LiCl 200 mM
⑥ Colonne PolyPrep Chromatography Columns, 731-1550 de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad Laboratories) contenant 1 mL de résine Dowex 50WX2-200 (Sigma) préalablement équilibrée en ions Li^+ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
⑦ Tampon B : Acétate de sodium 50 mM, pH 5,2, LiCl 800 mM
⑧ Liquide de scintillation : Hionic-Fluor, Packard Bioscience
⑨ Compteur à scintillation TriCarb 1900CA ; Packard Bioscience, Etats-Unis

Fiche 15

Mesure de la concentration des métabolites SAM et SAH à partir d'homogénats cellulaires

- Extraction des protéines comme décrit dans la (*Fiche n°9*)
- Supplémenter les échantillons avec 5% d'acide perchlorique① à raispn de 5 µl pour 100 µl d'échantillon (ou de standard)
- Centrifuger à 20.000 x *g* à 4°C pendant 20 min
- Filtrer les surnageants sur un filtre② de 0,45 µm
- Injecter 60 µL dans des inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé③
- Placer les échantillons dans l'appareil à HPLC constitué d'une pompe à haute pression④ et d'une colonne contenant de la silice de 5 µm de granulométrie comportant de greffons hydrophobes (18 carbones)⑤ maintenu à 30°C dans un four à colonne⑥. Maintenir le débit de la phase mobile (50 mmol/L de phosphate sodium (pH 3.2), 10 mmol/L d'heptane sulfonate et d'acétonitrile (10 à 20% de 0 à 20 minutes)) à valeur constante de 0,75 mL/min.
- Mesurer l'absorbance de SAM et SAH avec un détecteur à UV à 254 nm (maximum d'absorbance des purines par un spectrophotomètre UV-visible⑦.

Calcul : L'ordre d'élution des différents métabolites est la SAH puis la SAM. En parallèle, des standards contenant différentes concentrations de SAH et SAM⑧ (8- 6- 4- 2- 1 et 0,5µM) sont passés pour obtenir une gamme étalon réalisée en mesurant l'aire sous le pic en fonction de la concentration de standards. Ceci permettra de déterminer la concentration des échantillons selon une droite d"équation y=ax+b

① Acide perchlorique 60% : BDH, VWR International, 94126 Fontenay sous bois, France
② Filtre PVDF de 4 mm de diamètre et de porosité 0,45 µm : Nalgène, 67172 Brumath, France
③ Injecteur d'échantillon automatisé, AS100, TSP
④ Pompe à haute pression, SpectraSystem, P1000XR, TSP
⑤ Colonne K5OD2QS25, 250x4 mm, Lichrospher (Interchim)
⑥ Four à colonne, Waters
⑦ Spectrophotomètre, SpectraSeries UV100, TSP
⑧ Standards SAM et SAH, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Caractérisation phénotypique / Marquages immunofluorescents

NB : Manipulations de marquages immunologiques pour animaux

Pour tous les protocoles de marquages cytochimiques (Fiche 23, 24, 27), les mêmes protocoles ont été entretenus sur le modèle animal.

L'étape d'ensemencement des cellules est remplacée par une étape de déparaffinage.

Les solutions de bloquage sont adaptées aux coupes animales (BSA 10% au lieu de 1%) et les volumes sont adaptés pour recouvrir la surface de la coupe entourée à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™ (voir 75µL pour une coupe embryonnaire et 100 à 150 µL pour une coupe de J21 ou J450).

Le montage des lames se fait au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C).

Fiche 16

Préparation des lames et coupe des demi-cerveaux au cryostat

1. Inclusion des lames en verre

- Dissoudre de la gélatine porcine (Sigma)① au bain marie et chauffer entre 40 et 45°C (ne pas dépasser 45°C) pour former une solution de gélatine à 0,8%
- Laisser refroidir jusqu'à environ 35°C
- Mettre les lames à bords rodés (Menzel-Glaser) sur un portoir et faire 2 allers-retours dans la gélatine diluée
- Laisser sécher les lames pendant 24 heures à T°C ambiante ou dans une étuve à 37°C

2. Coupe des cerveaux au cryostat

- Régler la température à l'intérieur du cryostat à environ -24°C et du porte-objet à -26°C
- Inclure le demi-cerveau dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4%②
- Attendre que la carboxyméthylcellulose se soit solidifié avant de commencer à couper
- Faire des coupes dans l'axe sagittal du cerveau de 16µm d'épaisseur (20µm d'épaisseur pour les coupes utilisées pour le marquage de l'acétylcholinestérase)
- Stocker les coupes sur lame à -80°C

① Solution de gélatine porcine 0,8%: 8g de gélatine porcine dans 1L d'eau distillée
② Solution de carboxyméthylcellulose à 4%: 4g de carboxyméthylcellulose dans 100ml d'eau distillée

Fiche 17

Coloration pour visualisation des cytosquelettes et mesure morphologique

Principe : L'âge osseux, qui fait partie de l'âge physique, correspond à différents stades du développement du squelette. Plus précisément, sachant que la maturation du squelette passe par la transformation du cartilage en os, il est possible d'objectiver les stades de l'ossification grâce aux examens de coloration squelettique. Autrement dit, c'est le nombre et la taille de chaque point cartilagineux devenant de l'os qui permet de mettre en évidence la possibilité de retard d'ossification, certaines malformations du squelette, présence d'un spina bifida.

La coloration se fait sur les embryons de rats prélevés au 20ème jour de la gestation. Ceux-ci sont éviscérés et conservés. L'examen squelettique des foetus est de préférence réalisé en rouge pour les os (rouge d'alizarine) et en bleu pour les cartilages (bleu alcian).

Protocole coloration des os et du cartilage au rouge Alizarine et bleu alcian

- Enlever la peau et le maximum de viscères
- Fixer le squelette dans de l'éthanol 95% pendant 24h
- Colorer dans 80ml d'éthanol 95% + 20 ml d'acide acétique + 100 mg de bleu alcian (1%) pendant 48h (voir 72h). La coloration au bleu alcian est spécifique du cartilage
- Déshydrater dans de l'éthanol 95% pendant 24h
- Mettre le squelette dans du KOH à 2%① jusqu'à ce que les os soient visibles (environ 48 heures)
- Colorer le squelette dans 75mg de rouge alizarine (0,12%) dilué dans 1L de KOH à 1% pendant 24h
- Décolorer pendant 1 à 2 semaines dans 20% glycérol / 1% KOH②. Enlever les tissus inutiles (changer la solution toutes les semaines)
- Transférer dans 20% glycérol/20% éthanol pendant 1 semaine
- Transférer dans 20% glycérol/50%③ éthanol pendant 24h
- Garder le squelette dans une solution 87% glycérol
- Mesurer la longueur des fémurs par en utilisant du *Cell analysis software*④

① 2% KOH → 40g de KOH dans 2l d'eau distillée
② 20% glycérol / 1 % KOH → 200ml de glycérol 87% avec 500ml de KOH 2% et compléter jusqu'à 1L avec de l'eau distillée
③ 20% glycérol / 50% éthanol → 200ml de glycérol 87% avec 500ml d'éthanol 96% et compléter jusqu'à 1L avec de l'eau distillée
④ *Cell analysis software,* Olympus, France

Fiche 18

Mesure de l'épaisseur des couches des régions cérébrales

Coloration Histologique A La Thionine

Principe : la thionine, également connu sous le nom d'acétate de thionine ou violet de Lauth, est un colorant fortement métachromatique, utilisé pour la coloration des mucopolysaccharides acides. Il est également utilisé comme un colorant nucléaire commun et peut être utilisé pour la révélation de la substance de Nissl dans les cellules nerveuses du système nerveux central.

Déparaffinage

- Plonger les lames dans une solution d'Histo-Clear™① 2x3min
- Réhydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool de 100° (2x3min), 95° (1x3min), 70° (1x3min) et 50° (1x3min)
- Rincer dans de l'eau distillée pendant 5 minutes
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™

Coloration

- Colorer les coupes dans une solution de thionine② entre 7 et 10 minutes
- Faire deux rinçages de quelques secondes dans de l'eau distillée
- Déshydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool (5 min chacun) de 70° et 100°
- Plonger les lames dans une solution d'Histo-Clear™ pendant au moins 3 minutes
- Montage d'une lamelle à l'Eukitt™
- Observer les coupes au microscope en lumière blanche

NB : La coloration peut aussi se faire au DAPI③ à la place de la thionine. Pour ceci, la coloration des coupes se fait par incubation de 20 secondes avec une solution de DAPI diluée au 0.5 µg/mL

① HISTOCLEAR : National Diagnostics, USA
②Solution de thionine (Sigma) (1,5mol/L) : Pour 100ml→ 150mg de sel d'acétate de thionine
992mg d'acétate de potassium.3H2O
575µl d'acide acétique glaciale
Qsp 100ml avec de l'eau distillée
③DAPI : Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate, Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous Bois, France

Fiche 19

Comptage des cellules vivantes (en prolifération) par méthode d'exclusion au Bleu Trypan

- Ensemencer des plaques 24 puits avec $1,5.10^5$ cellules par puits
- Incuber 24 h à 33°C en atmosphère humide 5% CO_2/ 95% air
- Rincer 2 fois avec du PBS① stérile
- Trypsiner② les tapis cellulaires
- Prélever 200 µL de l'homogénat cellulaire dans un tube à essai
- Introduire 500 µL de la solution de Bleu trypan③ 0,4% (p/v) et 300 µL de milieu de culture
- Homogénéiser doucement et incuber 15 minutes à température ambiante
- Déposer une goutte du mélange entre lame et lamelle de l'hématimètre④
- Compter les cellules au microscope inversé à contraste de phase
- Faire la moyenne des 2 grilles
- Les cellules bleues correspondent aux cellules mortes
- Déterminer le pourcentage de cellules vivantes reflétant le nombre de cellules en prolifération, en tenant compte de la dilution (Dilution 5)

❖ **Remarque :**

- Il est important de vérifier lors du comptage que le nombre de cellules associées en amas n'excède pas 10% du total sans quoi il est indispensable de recommencer l'opération pour permettre une dissociation des amas. La différence de nombres de cellules entre deux chambres ne doit pas non plus excéder les 10%.
- De manière identique si moins de 200 ou plus de 500 cellules sont dénombrées, la mise en contact avec le bleu trypan est à recommencer avec un facteur de dilution approprié.

Comptage des cellules : nombre moyen de cellules par chambre x facteur de dilution x 10^4 (comptage sur 10 carrés) pour un hématimètre de Thoma

Nombre de cellules totales : nombre de cellules / mL x volume d'origine de la suspension cellulaire

① PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
② Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
③ Solution Bleu trypan : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
④ Cellule de Thoma ou Mallassez : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

Fiche 20

Test de migration cellulaire

- Ensemencer des plaques 6 puits① avec 5.10^5 cellules par puits
- Incuber 24 h à 33°C en atmosphère humide 5% CO_2/ 95% air
- 24 h plus tard, induire une plaie en ligne droite au milieu du puit à l'aide d'un embout de pipette
- Rincer les cellules 1 fois au PBS② afin de lisser le bord de la rayure
- Enlever l'excès des cellules à l'aide d'une spatule en plastique
- Visualiser la migration au microscope et mesurer, à l'aide de photographies prises chaque jour, la distance moyenne de migration en utilisant le *Cell analysis software*③

- ①Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
- ②PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

③ Microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France

Fiche 21

Marquage immunocytochimique : technique MitoCapture™

(Perte du potentiel membranaire mitochondrial)

- Ensemencer 3.10^5 cellules sur des lamelles en verre① traitées à la poly-L-lysine②
- Chauffer le tampon d'incubation du kit à 37°C
- Rincer les lamelles 2 fois avec le tampon
- Mélanger le tampon avec le réactif couplé au fluorochrome : 1/1000ème
- Bien homogénéiser la solution et maintenir à l'abri de la lumière
- Introduire 200 µL dans chaque puits
- Incuber 20 min à 37°C
- Rincer 2 fois avec le tampon d'incubation
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage③
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser immédiatement les lames au microscope à fluorescence④

« MitoCapture Apoptosis detection Kit » : Calbiochem, VWR International, France
① Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldrich (St Louis, USA)
② Poly-L-lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 20µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
③ Liquide de montage, Vecta Mount AQ ; Clinisciences, Montrouge, France
④ Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France

Fiche 22

Test de viabilité cellulaire ATPLite

Principe : Le test de viabilité cellulaire est une méthode homogène de détermination du nombre de cellules viables en culture basée sur la titration de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) intracellulaire présent qui signale une activité métabolique des cellules . En effet, l'ATP est une molécule synthétisée de façon constante par les cellules vivantes, une diminution de la production de cette molécule permet de mettre en évidence une mort cellulaire.

La bioluminescence naturelle de l'ATP est donc utilisée comme marqueur de titration de la viabilité cellulaire. Un seul réactif appliqué directement sur la suspension cellulaire va permettre de lyser les cellules puis de générer un signal luminescent proportionnel à la quantité d'ATP. Nous avons utilisé le kit CellTiter-Glo ™ Luminescent Cell Viability Assay①.

- Les cellules sont préalablement ensemencées avec 10^5 cellules par puits sur des plaques blanches② de 96 puits préalablement traitées avec de la poly-L-lysine③ 15 µg/mL
- Etablir une gamme étalon de densités cellulaires décroissantes : 100000, 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781, 390, 195, 97, 0 cellules par puits
- Introduire dans chaque puits 200 µL de réactif ATPLite①
- Agiter la plaque pendant 2 min, à l'abri de la lumière
- Maintenir 10 min à température ambiante et à l'obscurité
- Lire la plaque en mode luminescence sur le lecteur de plaques④

① Kit ATPLite, CellTiter-GloTMLuminescent Cell Viability Assay: Promega, Charbonnières, France
② Plaques 96 puits blanches, stériles : PerkinElmer ; Courtaboeuf cedex, France
③ Poly-L-lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 20µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
④ Lecteur de plaques Victor3 Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 23

Marquage immunocytochimique : Marquage à l'Apostain

Anticorps anti-ADNsb/Apostain®

- Ensemencer 3.10^5 cellules sur des lamelles en verre① traitées à la poly-L-Lysine
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS②
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde③ à 4%
- Incubation 30 min dans du méthanol④ (80% dans PBS) à température ambiante
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Incubation dans de la *saponine*⑤ (0,2 g/L dans PBS) pendant 20 min et à température ambiante
- Rincer 1 fois avec du PBS à température ambiante
- Incubation dans formamide⑥ (50% dans l'eau) à 56°C, pendant 20 min et au bain-marie
- Incubation 2 fois pendant 5 min dans PBS froid (maintenir la plaque sur un lit de glace)
- Ajouter la solution de BSA⑦ à 1% et incuber à 37°C pendant 20 min
- Introduire 200 µL avec l'anticorps anti-ADNsb/Apostain®, au 1/10ème dans PBS-BSA 1%, sous agitation), 30 min à 37°C
  Incubation avec 200 µL *d'anticorps secondaire* Anti-IgM, au 1/500ème dans PBS-BSA 1% pendant 30 min à température ambiante, sous agitation lente et à l'abri de la lumière
- Lavage 3 fois 5 min au PBS sous agitation
- Rincer 2 fois avec une solution de Triton 0,05% ⑧
- Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI ⑨ (5 µg/mL)
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Rincer 1 fois avec de l'eau
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage⑩
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser les lames au microscope à fluorescence

Apostain F7-26 Anticorps monoclonal anti-ADNsb/Apostain®, AbCys SA, France
① Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldrich
② PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
③ Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans de l'eau : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
④ Méthanol (80% dans PBS), Carlo Erba réactifs (France)
⑤ Saponine : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑥ Formamide (50% dans de l'eau), Carlo Erba réactifs (France)
⑦ BSA, Bovin Serum Albumin : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑧ Triton X-100 : solution à 0,05% dans du PBS, BDH, VWR international, France
⑨ DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous bois, France
⑩ Liquide de montage, Vecta Mount AQ ; Clinisciences, Montrouge, France
Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France

Fiche 24

Détection de l'apoptose par marquage à l'*ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit*

Principe : l'*ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit* détecte les cellules apoptotiques in situ par la méthode TUNEL. Les fragments d'ADN sont étiquetés avec un nucléotide directement marqué par une fluorescéine. La méthode permet de détecter les cellules apoptotiques par modification de l'ADN génomique utilisant une transférase terminale de déoxynucléotide.

- Ensemencer 3.10^5 cellules sur des lamelles① en verre traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS②
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde③ à 1%
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Perméabilisation membranaire : incubation 5 min à -20°C dans un mélange Ethanol : acide acétique 2 :1 pré-refroidi. Ne pas laisser sécher
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Incuber au moins 10 secondes avec 75µL/5cm^2 du tampon d'équilibration
- Ajouter l'enzyme TdT (TTerminal Deoxunucletidyl tranferase) à concentration de 55µL/5cm^2
- Incuber 1h à 37°C dans une chambre humide
- Ajouter le *Working Strength Stop/Wash Buffer*
- Agiter pour 15 secondes puis incuber 10 minutes à température ambiante
- Rincer 3 fois 1 min avec du PBS
- Appliquer 65µL/5cm^2 du Anti-Digoxigenin Conjugate
- Incuber 30 min à température ambiante dans une chambre humide en évitant l'exposition à la lumière
- Rincer 4 fois 2 min au PBS
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage④ contenant 0,5-1,0 µg/mL du Propidium Iodide ou DAPI⑤
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière et à -20°C en cas de besoin de stockage
- Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence

« l'*ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit*» : Chemicon international, Millipore, Guyancourt, France

① Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldriche

② PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France sans $CaCl_2$, ni $MgCl_2$ ou PBS 10X préparé → 12,1g de Na2HPO4, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

③ Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans du PBS 1X : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

④ Liquide de montage, Aqua-polymont : Polysciences, France

⑤ DAPI : Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate, Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous Bois, France

Fiche 25

Marquage immunohistochimique

Déparaffiner les lames :

- Plonger les lames dans une solution d'Histo-Clear™① 2x3min
- Réhydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool de 100° (2x3min), 95° (1x3min), 70° (1x3min) et 50° (1x3min)
- Rincer dans de l'eau distillée pendant 5 minutes
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Rincer les lames dans un bain de PBS②1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce (facultatif)
- Incuber les coupes dans un bain de Triton③à 0,1% afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10 min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Ré-entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200µl d'une solution de BSA④à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 100µl d'anticorps secondaire (dilution 1/2000° dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si un seul anticorps primaire si deux 200µl et laisser incuber pendant 1h à l'obscurité dans une chambre humide à température ambiante
- Après cette étape mettre les lames dans du papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière
- Laver les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min sous agitation douce
- Déposer environ 200µl de DAPI⑤ (dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incuber de 20s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C
- Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence⑥

①Histo-Clear™: National diagnostics USA
②PBS 10X → 12,1g de Na2HPO4 ; 7H20, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KCl Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée
③Triton 0,1%→ Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X
④BSA 10%→ 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X
⑤DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous-bois, France
⑥Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France ou microscope confocal ; *Nikon Instruments*, Champigny sur Marne Cedex, France

Fiche 26

Marquage immunocytochimique

- Ensemencer 3.10^5 cellules sur des lamelles① en verre traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS②
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde③ à 4%
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Perméabilisation membranaire : 2 fois 10 min avec une solution de Triton 0,1% (Triton X-100④/ PBS)
- Rincer 3 fois 5 min avec du PBS
- Incuber 1h à température ambiante avec une solution de BSA⑤ à 1%
- Incuber avec l'anticorps primaire, à 4°C, toute une nuit et sous agitation lente
- Rincer 3 fois avec une solution de Triton 0,05%
- Incuber 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire, à l'abri de la lumière et sous agitation lente
- Rincer 2 fois avec une solution de PBS/Triton 0,05%
- Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI⑥
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Rincer 1 fois avec de l'eau
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage⑦
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence⑧

① Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldriche

② PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France sans $CaCl_2$, ni $MgCl_2$ ou PBS 10X préparé → 12,1g de Na2HPO4, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

③ Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans du PBS 1X : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

④ Triton X-100 : BDH, VWR international, France

⑤ BSA, Bovin Serum Albumin : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑥ DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous Bois, France

⑦ Liquide de montage, Aqua-polymont : Polysciences, France

⑧ Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France ou microscope confocal ; *Nikon Instruments*, Champigny sur Marne Cedex, France

	Anticorps (anti-)	Source	Dilution	Fournisseurs
Anticorps Primaires	Apostain	Souris	1/100	AbCys (France)
	BrdU	Souris ou Mouton	1/100	Oncogene (Etats-Unis) Calbiochem, VWR International, (France)
	Homocystéine	Lapin	1/200	Chemicon International (Etats-Unis)
	NeuroD	Chèvre	1/300	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
	NeuN	Souris	1/200	Chemicon International (Etats-Unis)
	NF68	Lapin	1/300	USBiological (Massachusetts, MA)
	PSD-95	Lapin	1/200	Abcam, Paris (France)
	Synaptotagmine	Souris	1/50	Synaptic System, Goettingen, (Allemagne)
	VGLUT2	Souris	1/200	Chemicon International (Etats-Unis)
	Synapsine I	Lapin	1/100	Calbiochem, VWR International
	Synapsine II	Lapin	1/100	Abcam, Paris (France)
	α-tubuline	Lapin	1/200	Millipore (Etats-Unis)
	α-tubuline acétylée	Souris	1/200	Abcam, Paris (France
	ß-tubuline	Souris	1/200	Abcam, Paris (France
	Kinésine	Souris	1/200	Millipore (Etats-Unis)
	Dynéine	Souris	1/200	Millipore (Etats-Unis)
	MAP2	Lapin	1/200	Millipore (Etats-Unis)
	Actine	Chèvre	1/200	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
	MAP1a	Souris	1/200	Millipore (Etats-Unis)
	MAP4	Lapin	1/200	Millipore (Etats-Unis)
	Tau	Chèvre	1/200	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
	Stat3	Lapin	1/200	Cell signalling, Ozyme (France)
	pStat3 Tyr	Souris	1/100	Cell signalling, Ozyme (France)
	pStat3 Ser	Souris	1/100	Enzo life sciences (France)

Tableau 5 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps secondaires	(AlexaFluor 488)	Chèvre	1/1000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	(AlexaFluor 488)	Lapin	1/1000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	(AlexaFluor 488)	Mouton	1/1000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	(AlexaFluor 488)	Souris	1/1000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	(AlexaFluor 555)	Chèvre	1/750	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	(AlexaFluor 555)	Lapin	1/750	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
	(AlexaFluor 555)	Souris	1/750	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)

Tableau 6: Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Fiche 27

Duolink

Principe : Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier des protéines individuelles, des modifications post-traductionnelles ou des interactions protéiques dans des échantillons cellulaires et tissulaires. Les réactifs Duolink sont basés sur le PLA® (*Proximity Ligation Assay*). Lorsque les sondes PLA sont à proximité (28Å), les brins d'ADN peuvent interagir et se lier grâce à un ajout ultérieur d'oligonucléotides et d'une ligase. Ils sont ensuite amplifiés plusieurs centaines de fois à l'aide d'une polymérase. L'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes met en évidence le produit final. Le signal de chaque paire de sondes PLA détectées est visualisé comme un spot fluorescent individuel.

Protocole

- Ensemencer 3.10^5 cellules sur des lamelles① en verre traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS②
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde③ à 4%
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Perméabilisation membranaire : 2 fois 10 min avec une solution de Triton 0,1% (Triton X-100④/ PBS) à température ambiante
- Rincer 3 fois 5 min avec du PBS
- Incuber 1h à température ambiante avec une solution de BSA⑤ à 1% ou avec la solution du bloquant fourni dans le kit
- Incuber avec l'anticorps primaire dilué dans la solution du bloquant utilisé, à 4°C, toute une nuit et sous agitation lente

Sondes PLA

- Rincer 3 fois 5 min avec du Tampon A⑥
- Diluer au 5è les deux sondes PLA⑦ dans du diluent pour anticorps (*Nous avons 80 µL de volume réactionnel par puits. Il faut donc 16 µL de sonde **PLA MOINS**, 16 µL de sonde **PLA PLUS** (choisi selon l'espèce de l'anticorps) dans 48 µL de diluent pour anticorps par puits*)
- Ajouter la solution de sondes PLA
- Incuber les lamelles 1h à 37°C dans une chambre humide préchauffée

Ligation

- Rincer 3 fois 5 min avec du Tampon A
- Diluer au 5è le tampon de ligation dans de l'eau ultra pure et mélanger *(Pour 80 µL de volume réactionnel par puits, il faut 16 µL de solution mère Ligase 5x et 62 µL d'eau ultra pure)*
- Ajouter la ligase diluée au 1/40 à la solution de ligation de la 1ère étape et vortexer (*2 µL de ligase à 78 µL de solution de ligation)*
- Ajouter la solution Ligation-Ligase sur les lamelles
- Incuber les lamelles 30 min à 37°c dans une chambre humide préchauffée

NB : Le réactif suivant est sensible à la lumière. A partir de cette étape, il faut donc travailler à l'obscurité ou sous une lumière rouge

Amplification

- Diluer au 5^{è} la solution d'amplification dans de l'eau ultra pure et mélanger (*Pour 80 µL de volume réactionnel, il faut 16µL de solution mère Amplification 5x et 63µL d'eau ultra pure)*
- Rincer 2 fois 2 min avec du Tampon A
- Ajouter la polymérase diluée au 1/80 à la solution d'amplification de la 1ère étape et vortexer (*1 µL de polymérase à 79 µL de solution d'amplification)*
- Ajouter la solution Amplification -Polymérase sur les lamelles
- Incuber les lamelles 100 min (1h40) à 37°c dans une chambre humide préchauffée

Coloration des noyaux

- Rincer 2 fois 10 min avec du tampon B⑧
- Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI⑨
- Rincer 2 fois 10 min avec du tampon A
- Rincer 1 fois avec de l'eau
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage⑩
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence et compter les spots

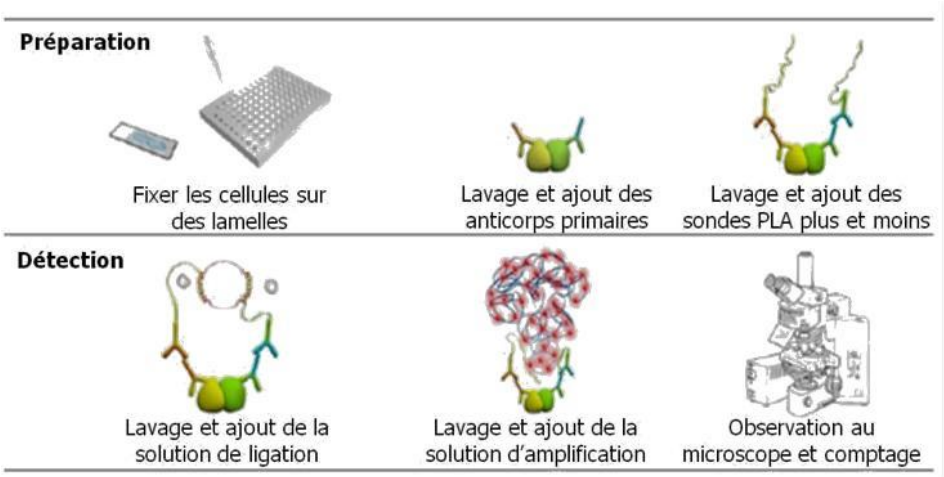


Figure 4 : Schéma récapitulatif du protocole de Duolink

« Duolink kit » : Olink Bioscience, Arlanda, Suède

① Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldriche

② PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France sans $CaCl_2$, ni $MgCl_2$ ou PBS 10X préparé → 12,1g de Na2HPO4, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

③ Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans du PBS 1X : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

④ Triton X-100 : BDH, VWR international, France

⑤ BSA, Bovin Serum Albumin : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑥ Tampon A : Dissoudre 8.8g NaCl, 1.2g tris base et 0.5 mL Tween 20 dans 800 mL d'eau ultra-pure. Ajuster le pH à 7,4 en utilisant HCl

⑦ PLA probes : Mouse, Rabbit, Goat MINUS ou PLUS, Kit Duolink Detection reagent Orange (Olink Bioscience, Suède)

⑧ Tampon de lavage B : Dans 500 ml d'eau MilliQ dissoudre 5,84g de NaCl ; 4,24g de Tris base et 26g de Tris HCl. Ajuster le pH à 7,5 par ajout d'HCl et compléter à 1 litre avec de l'eau MilliQ. Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm et stocker à 4°C

⑨ DAPI : Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate, Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous Bois, France

⑩ Liquide de montage, Aqua-polymont : Polysciences, France

Quantification ARN / protéines

Fiche 28

Extraction des protéines cytosoliques cellulaires pour l'étude par Western-Blot

L'extraction se fait en maintenant les échantillons à 4°C.

- Entretien des cellules dans des boites de Pétri① de 100 mm de diamètre
- Lorsque les cellules sont à confluence rincer 3 fois le tapis cellulaire avec 5 mL de PBS② froid
- Aspirer soigneusement le dernier rinçage pour bien assécher les flasques
  - ➔ Possibilité de congélation des boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction
- Introduire 500 µL de tampon RIPA③ par boîte et maintenir sur glace pendant 10 min
- Gratter les cellules au policeman et transférer dans des microtubes
- Effectuer 3 cycles de congélation/ décongélation (Azote liquide/ bain marie à 37°C)
- Centrifuger 30 min à 20 000 tours par min à 4°C
- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche 30)
- Stocker les protéines à 80°C

① Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
② PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
③ Tampon de lyse RIPA : NaCl 140 mM, sodium deoxycholate 0,5% (w/v), Nonidet P-40 1% (v/v), 0,1% (w/v) SDS, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, Meylan, France

Fiche 29

Extraction des protéines à partir de tissu cérébral

L'extraction des protéines se fait en condition dénaturante à partir des microdissections de cerveau, en travaillant toujours sur glace

NB : Travailler toujours sur de la glace

- Préparer du tampon de lyse RIPA① (Radioimmunoprecipitation Assay)
- Mettre le volume correspondant de tampon RIPA froid selon la microstructure

Microstructures	Cervelet	Cortex	mésencéphale	« Reste du cerveau »
Volume de tampon RIPA à ajouter (µl)	150	250	250	300

- Incuber 10 minutes dans la glace
- Homogénéiser avec une seringue (10 à 20 allers-retours)
- Effectuer 3 cycles de congélation-décongélation (azote-bain marie à 37°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 30)
- Stocker les protéines à 80°C

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

Fiche 30

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

Principe : La méthode BCA est une méthode de dosage colorimétrique de concentrations 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 permettent le dosage colorimétrique des protéines.

- Préparer une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL, en triple) à partir d'une solution stock de BSA① (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 ou 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 travail④ 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 plaques⑤ à 570 nm
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite
- La concentration en protéines est déterminée à partir de l'équation de droite de la courbe étalon

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

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

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

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

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

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

Fiche 31

Western Blotting

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

a- Préparation des gels

- Passer les plaques de verre à l'alcool et fixer l'ensemble sur le socle de coulage
- Couler le gel de séparation① selon le tableau 7 entre les plaques de verre (Prévoir 10mL de solution par gel) puis recouvrir la surface avec de l'isopropanol
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante (le temps de polymérisation est en fonction de la température ambiante)
- Retirer l'isopropanol, rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée, tout en s'assurant par la suite à l'élimination de toute traces d'eau
- Couler « en excès » le gel de concentration selon le tableau 7
- Positionner le peigne en Téflon® en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser à nouveau 15 min. La hauteur du gel de concentration est de 1 cm à partir du bas des puits de dépôt
- Retirer le peigne et rincer soigneusement chaque puits avec une pissette d'eau distillée afin de supprimer l'acrylamide non polymérisé. Eliminer l'eau restant dans les puits
- Former le réservoir de tampon cathodique en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes en forme de U
- Remplir ce réservoir central avec du tampon de migration② et contrôler l'étanchéité

b- Préparation des échantillons

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

- 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 et les marqueurs de poids moléculaire④

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 puis 120 V (~25 mA) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel
- 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 : 12% (p/v) acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Carl Roth, Allemagne), tampon Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05% (v/v) ; Euromedex (France) et SDS 0,1% (Bio-Rad Laboratories)

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,* Biorad

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

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

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

Fiche 31 (2)

2- Coloration des protéines après électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Coloration au bleu de Coomassie® R250

- Dissoudre 2 g de bleu de Coomassie® R250① dans 200 mL d'eau distillée et agiter pendant 5 à 10 min
- Filtrer la solution stock de colorant à 1% (p/v) sur filtre 0,45 µm et la stocker à température ambiante
- Pour la coloration d'un gel, préparer 50 mL une solution finale à 25% (p/v) en mélangeant 12,5 mL de solution stock à 5 mL d'acide acétique et à 25 mL de méthanol
- Incuber 15 à 20 min sous agitation légère et à température ambiante
- Vider la solution de colorant et décolorer le gel avec un mélange méthanol / acide acétique / eau distillée (4:1:5, v/v/v) renouvelé régulièrement

① Bleu de Coomassie® R250 : Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France)

Fiche 31 (3)

3- Transfert des protéines sur membrane de PVDF

a- Préparation du transfert

- Couper la membrane PVDF① ou en nitrocellulose② à la dimension du gel : 7x8,5 cm
- Immerger uniquement la membrane PVDF dans du méthanol (perméabilisation de la membrane), puis les tremper en même temps que les papiers filtre dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Démonter l'appareil de migration et tremper le gel d'électrophorèse pendant 5 min dans le tampon de transfert③

b- i- Electro-transfert semi-sec

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
  - un papier filtre Whatman® 3MM④
  - la membrane
  - le gel de polyacrylamide
  - un papier filtre Whatman® 3MM
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau
- Eponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil⑤sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10 V pendant 45 à 60 min

b- ii- 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
  - la membrane de PVDF
  - le gel de polyacrylamide
  - un papier filtre
  - éponge
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique sur le sandwich
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle et refermer l'appareil
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert
- Brancher l'appareil⑥ sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 350 mA pendant 45min

Fiche 31 (4)

c- Fin et vérification du transfert

- Démonter le sandwich et récupérer la membrane puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S⑦ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

d- Blocage

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane dans du tampon de blocage⑧ pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente

A noter que suivant les anticorps, la solution de blocage peut être être faite soit avec de la BSA 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 polyvinylidene 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 semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories)
⑥ Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories)
⑦ Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
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

Fiche 31 (5)

4- Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase

- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (tableau 8) dans du tampon de blocage① pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane 4 fois 10 min avec le tampon de lavage②, sous agitation forte
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase (tableau 9) pendant 1 h à température ambiante, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane 4 fois 10 min avec le tampon de lavage, sous agitation forte
- L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence③
- Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique
- Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel, pour la durée indiquée (1 à 5 min) puis sécher la membrane
- Disposer la membrane entre 2 films plastique
- Révélation des bandes protéiques en utilisant un système détecteur Fusion-FX7④
- Pour une première révélation, utiliser l'option « auto-exposure » (calcul automatique de la durée d'exposition) puis réajuster le temps d'exposition si nécessaire.

①Tampon de blocage : Tampon TBST et 5% de lait en poudre écrémé ou de la BSA, 5mL par membrane
②Tampon de lavage : TBS contenant Tween® 20 à 0,05% (v/v)
③ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense
④ Fusion Fx7, Vilber Lourmat, France

Anticorps (anti-)	Source	Dilution	Fournisseurs
Bax	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
BCl-2	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
BCl-XL	Lapin	1/1500	Cell Signaling Technology, (France)
Caspase 3 Clivée, Asp175	Souris	1/3000	Cell Signaling Technology, (France)
Caspase 9 Clivée, Asp353	Lapin	1/3000	Cell Signaling Technology, (France)
CDK2	Chèvre	1/3000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
Cycline E	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
PP2A sous-unité C et déméthyle PP2A	Souris	1/1000	Cell Signaling Technology, (France)
Phospho-Akt	Souris	1/1000	Oncogene (Etats-Unis)
Phospho-ERK1/2, Thr202/Tyr204	Lapin	1/3000	Cell Signaling Technology, (France)
Phospho-MAPKinase -p38a Thr^{108}/Tyr^{182}	Souris	1/1000	Chemicon International (Etats-Unis)
phospho-SAPK/JNK Thr^{183}/Tyr^{185}	Lapin	1/500	Cell Signaling Technology, (France)
Phosphor-Src	Lapin	1/1000	Cell Signaling Technology, (France)
GAPDH	Souris	1/1000	Abcam, Paris (France)
MTHFR	Souris	1/3000	Interchim, VWR International (France)
MTR	Chèvre	1/500	Abcam, Paris (France)
Homocystéine	Lapin	1/750	Chemicon International (Etats-Unis)
α-tubuline	Lapin	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
α-tubuline acétylée	Souris	1/1000	Abcam, Paris (France
ß-tubuline	Souris	1/1000	Abcam, Paris (France
Kinésine	Souris	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
Dynéine	Souris	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
MAP2	Lapin	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
MAP1a	Souris	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
MAP4	Lapin	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
Tau	Chèvre	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
Phospho-Tau	Lapin	1/1000	Millipore (Etats-Unis)
Stat3	Lapin	1/1000	Cell signalling, Ozyme (France)
pStat3 Tyr	Souris	1/1000	Cell signalling, Ozyme (France)
pStat3 Ser	Souris	1/250	Enzo life sciences (France)

Dll	Sheep	1/200	LS bio (France)
Notch 1	Lapin	1/500	Cell signalling, Ozyme (France)
Hes 1	Souris	1/200	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
Mash 1	Lapin	1/000	Abcam, Paris (France
Trim 71	Chèvre	1/1000	LS bio (France)

Tableau 8 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps secondaires	*Horseradish peroxydase-conjugated anti-*	Chèvre	1/5000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
		Lapin	1/5000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
		Souris	1/5000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)

<u>Tableau 9</u>: Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Fiche 32

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

Fiche 33

Co-Immunoprécipitation (*kit Pierce Co-immunoprécipitation*)

❖ Préparation des colonnes (immobilisation de l'anticorps)

NB : le protocole est fait pour coupler de 10 à 75µg d'anticorps *affinity-purified* dans une solution d'amines libre et de protéines couplées. Echelonner ce protocole à vos besoins (cf Tableau ci-dessous). Les dilutions sont faites à l'eau ultra pure.

Quantité d'Anticorps (µg)	Coupling Resin (µl)	Volume de lavage (µl)	Tampon d'élution (µl)
75-250	50 (100)	300	75-100
10-75	25 (50)	200	50-75
≤ 10	10 (20)	200	50

- Equilibrer l'*AminoLink Coupling Resin* et les réactifs à température ambiante
- Préparer 2mL de *Coupling buffer* 1X pour chaque réaction de Co-IP
- Agiter doucement la bouteille d'*AminoLink Plus Coupling Resin* pour obtenir une suspension homogène. Utiliser un cône coupé et ajouter 50µL de « *resin slurry* » dans la colonne. Placer la colonne dans un microtube à centrifuger et centrifuger à 1000g pendant 1min. Jeter le surnageant
- Lavage : -200µL de *Coupling buffer* 1X
  -.centrifuger à 1000 g pendant 1min
  - jeter le surnageant
  } X2
- Eliminer l'excès de liquide (tapoter sur un papier absorbant). Insérer le bouchon inférieur
- Préparer 10-75µg d'anticorps. Ajuster le volume à 200µL avec de l'eau ultra pure et du *coupling buffer* 20x dilué au final 1x (10µL de *coupling buffer* 20x + V Ac + H20 UP qsp 200µL). Déposer la solution directement sur la colonne
- Ajouter 3µL de *sodium cyanoborahydre /* 200µL de volume de réaction (sous la hotte)
- Fermer le tube avec le bouchon à vis. Incuber avec agitation à température ambiante pendant 90 à 120 min. Veillez à ce que la résine reste bien en suspension pendant l'incubation
- Enlever et conserver le bouchon inférieur. Desserrer le bouchon à vis. Placer la colonne dans un tube collecteur et centrifuger. Conserver le surnageant pour vérifier le couplage de l'Ac
- Ajouter 200µL de Tp de couplage 1x
  Centrifuger
  Jeter le surnageant
  } X 2
- Ajouter 200µL de *quenching buffer* sur la colonne. Centrifuger et Jeter le surnageant
- Mettre le bouchon inferieur (Au préalable, tapoter sur un papier absorbant pour éliminer l'excédent du liquide).
  Ajouter 200µL de *quenching buffer* sur la résine

- Ajouter 3µL de *sodium cyanoborahydre* (sous la hotte). Fermer avec le bouchon à vis
- Incuber 15 min sous agitation douce ou en remuant de temps en temps
- Enlever le bouchon inférieur, et desserrer le bouchon à vis. Placer la colonne sur un tube collecteur. Centrifuger et Jeter le surnageant
- Enlever le bouchon à vis. Laver la résine :
  Ajouter 200µL de *coupling buffer*
  Centrifuger après chaque lavage } X 2
- Laver la résine avec 150µL de solution de lavage
  Centrifuger après chaque lavage. } X 6
- Soit faire la lyse des cellules pour l'immunoprécipitation
  Soit faire les étapes suivantes pour la conservation des colonnes

❖ Lyse des cellules (protocole pour cellules adhérantes, ex : H19-7)

- Retirer le milieu de culture
- Laver les cellules avec du PBS stérile 1x
- Ajouter le tampon de lyse et lavage (voir tableau ci-dessous) sur les cellules
- Incuber 5 min sur glace en mixant de temps en temps
-

Taille de la plaque/Surface	Volume de *IP Lysis/Wash Buffer*
100 × 100 mm	500-1,000 µl
100 × 60 mm	250-500 µl
6-*well plate*	200-400 µl par puit
24-*well plate*	100-200 µl par puit

- Transférer le lysat dans un microtube
- Centrifuger 10min a 13 000g
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube pour déterminer la concentration en protéine

❖ Co Immunoprécipitation

Toute la manipulation se fait à 4°C (Sauf indication contraire). Les temps d'incubation dépendent des protéines de l'anticorps utilisé et de l'affinité de l'anticorps. Les lysats peuvent êtres pré-nettoyés avec une résine de contrôle pour diminuer les liaisons non spécifiques. Le protocole utilise du tampon *IP lyse/wash* pour coupler et nettoyer l'immuno-complexe.
Le dulbecco's PBS 20x modifié est fourni dans le kit comme un tampon *binding/wash*. Utiliser se tampon pour des complexes susceptibles dêtre altérés par des détergents. Pour chaque Co-IP préparer 2mL de Dublecco's PBS modifié 1x dilué dans de l'eau ultra pure.

- Mélanger les protéines cibles et « proies » (si séparées) et préparer un contrôle
- Diluer les protéines et le contrôle dans du tampon *Ip lysis/wash* ou un autre tampon qui convienne. Le volume final recommandé est de 100-500µL par colonne
- Laver la résine avec 200µL de tampon IP lysis /wash directement sur la colonne contenant l'anticorps couplé à la résine.

- Centrifuger et Jeter le surnageant (tapoter sur un papier absorbant). Insérer le bouchon inférieur.
- Ajouter l'échantillon avec les protéines et les contrôles sur les résines correspondantes. Mettre le bouchon et incuber sous agitation douce 1-2h à température ambiante ou la nuit à 4°C

Le lendemain :

- Enlever le bouchon inférieur, desserrer le bouchon à vis et placer la colonne sur un tube collecteur. Centrifuger
- Enlever le bouchon à vis, placer la colonne dans un nouveau tube
  Ajouter 200µL d'*IP Lysis/ Wash buffer*
  Centrifuger. } X3

Note : Evaluer le nombre de lavage (A280, SDS PAGE, kit BCA) pour chaque Co-IP. Il ne doit plus y avoir de protéine dans le dernier lavage. Faire autant de lavage que nécessaire.

Lavage optionnel : Pour améliorer l'élution, effectuer un lavage supplémentaire avec 100µL de *conditioning buffer* 1X. Ce tampon contient peu de sels et du tampon minimum ; donc tester le « *flow-through* » pour confirmer que le complexe protéine cible et proie est intact.

❖ Elution de la Co-IP

Note : Si la protéine et/ou l'anticorps est sensible à un pH bas, utiliser un système pour neutralise le pH. Pour des dosages enzymatiques ou fonctionnels, ajouter 5µL de Tris1M pH 9,5, dans le tube de collecteur, pour neutraliser le pH du tampon d'élution pendant la centrifugation.

- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur. Ajouter 10µL de tampon d'élution et centrifuger
- Laisser la colonne dans le tube et ajouter 50µL de tampon d'élution.
  Incuber 5 min à température ambiante. La colonne ne doit pas être fermée ou agitée

Note : Pour concentrer plus l'éluât, utiliser moins de tampon d'élution, cependant le rendement global peut être réduit.

- Centrifuger le tube et collecter l'éluât.
- Doser les protéines (Fiche 30). Refaire des élution (étapes D1-D3) si nécessaire. Doser chaque éluât séparément pour être sûr que la protéine est complètement éluée

❖ Re-géneration et stockage de la résine

- Ajouter 100µL de *coupling buffer* 1X sur la colonne.
  Centrifuger
  Jeter le surnageant } X2
- Replacer le bouchon inférieur sur la colonne (Tapoter au préalable sur papier absorbant). Ajouter 200µL de *coupling buffer* 1X sur la colonne. Replacer le bouchon

à vis. Emballer le bas de la colonne avec du film cellophane pour éviter que la colonne sèche.

- Stocker à 4°C. Pour un stockage supérieur à 2 semaines ajouter de *sodium azide* à une concentration finale de 0,02%.

❖ Préparation de l'échantillon pour l'analyse sur gel SDS-PAGE

- Equilibrer le « *lane marker sample buffer 5X* » à température ambiante. Agiter doucement le *sample buffer* par 5-10 retournements. Pour un gel en condition réductrice, ajouter du DTT 1M (diothiothréitol) au *sample buffer* 5X pour obtenir une concentration finale de 100mM
- Ajouter du *sample buffer* 5X à l'échantillon pour obtenir une concentration finale 1X (par exemple 5µL de *sample buffer* pour 20µL d'échantillon)
- Chauffer l'échantillon à 95-100°C pendant environ 5min. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante avant de déposer sur le gel

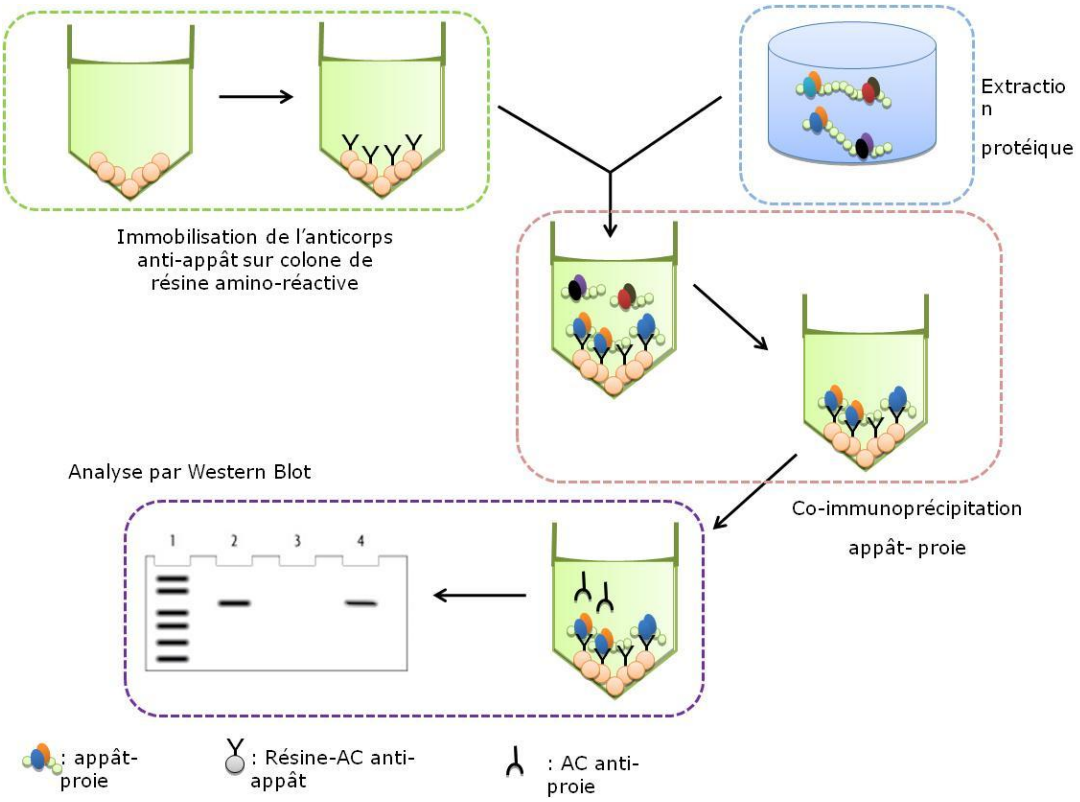


Figure 5 : Schéma représentatif du protocole de Co-immunoprécipitation

① *Pierce Co-immunoprécipitation kit*, Thermo Scientific, Illinois, USA

Fiche 34

Spectrométrie de masse

- Entretien des cellules dans des boites de Pétri① de 100 mm de diamètre
- Lorsque les cellules sont à confluence rincer 2 fois les boîtes avec 5 mL de PBS② froid et récupérer les cellules dans du tampon de lyse pour Co-IP
- Doser les extraits protéiques (fiche 30). Pour la spectrométrie de masse, il nous faut 500 µL d'échantillon
- Co-immunoprécipiter les extraits protéiques à analyser comme mentionné précédemment avec le kit « *Pierce Co-immunoprécipitation*③ » (fiche 33)

NB : 1- L'élution se fait dans un tampon hydroxde d'ammonium 0,5M NH_4OH compatible avec la spectrométrie de masse

2- Pour la spectrométrie de masse, les protéines de la lignée H19-7 ont été immunoprécipitées en présence de l'anticorps de l'homocystéine.

Analyse par spectrométrie de masse (SM en nano-LC-MS/MS)

- Les peptides tryptiques ont été obtenus à partir de protéines immunoprécipitées te décrit par Ren et al. (2009)
- Séparation chromatographique en utilisant un système de nano-chromatographie (*Easy nLC, Proxeon*) connecté en ligne à un spectromètre de masse *LTQ Velos Orbitrap* (ThermoFisher). Les conditions de séparation sont décrit en détail Ren et al. (2009)
- Acquisition des spectres sur l'analyseur *Orbitrap* en mode haute résolution.

① Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
② PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
③ *Pierce Co-immunoprécipitation kit*, Thermo Scientific, Illinois, USA
④ Les échantillons ont été envoyé à l'institut Monot-Paris et l'analyse a été faite en Collaboration avec l'équipe du Dr. Jean-Michel Camadro

Fiche 35

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

Ce kit est utilisé pour extraire les ARN servant à la RT-PCR semi-quantitative. Avec la procédure RNeasy toutes les molécules d'ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides sont isolées. Par conséquent les ARNr 5,8S ; 5S, et les ARNt, sont exclus (15-20% des ARN totaux). Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C.

➢ Avant de commencer :
- Préparer l'éthanol à 70%
- Ajouter 10 µl de β-mercaptoéthanol② pour 1 mL de tampon RLT.
  - Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100% au tampon RPE comme indiqué sur la bouteille③

- Lyser les cellules poussant sur des plaques de diamètre <6 cm avec 350 µL RLT/β-Mercaptoéthanol (600 µL pour les plaques de 100 mm de diamètre) directement dans la plaque de culture après avoir aspiré le milieu
- Récupérer le lysat cellulaire dans un tube de 1,5 mL④ en s'assurant qu'il n'y a pas d'amas cellulaire
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free

  NB : Ici, les échantillons peuvent être placés à –80°C et être utilisés après plusieurs mois. Pour traiter les lysats congelés, décongeler les échantillons pendant 15-20 min à 37°C dans un bain-marie pour diluer les sels. Si du matériel insoluble est visible, centrifuger pendant 5 min à 3000-5000 *g*. Transférer le surnageant dans un nouveau tube

- Transférer le lysat sur une mini-colonne à élimination d'ADN génomique placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 30 s à ≥8000 g. Récupérer l'éluat et jeter la colone
- Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (RNase-free) et bien mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger
- Transférer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat.

  NB : Si le volume excède 700 µl, charger les échantillons successivement en gardant la même colonne et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation

- Ajouter 700 µL de tampon RW1 sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g pour laver. Jeter l'éluat
- Laver avec 500 µL de tampon RPE la colonne et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g. Jeter l'éluat
- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à ≥8000 g. Jeter l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et recentrifuger 1 min à vitesse maximale pour sécher la membrane

NB : Enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement. S'assurer que le tube est bien vide.

- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL d'eau RNase-free sur la membrane. Centrifuger 1min à ≥8000 g pour éluer l'ARN.
- Si le taux d'ARN attendu est >30 µg, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau. Eluer dans le même tube collecteur
- Doser les ARN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons (fiche 37)
- Aliquoter les ARN par 1 µg (et 500 ng pour le dépôt sur gel d'agarose (fiche 38) et conserver à -80°C

① Rneasy Mini Kit : Qiagen, Courtabœuf, France
② Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 µl de β-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.
③ Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE
④ Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France

Fiche 36

Extraction des ARN avec le kit RNeasy®① Lipid Tissue Mini kit à partir des tissus

Ce kit est conçu et optimisé pour extraire les ARN totaux de 100 mg de tissu riche en lipide comme le cerveau ou le tissu adipeux. Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C, sauf si indiqué autrement.

➢ Avant de commencer :
- Préparer l'éthanol à 70%
- Ajouter 10 µl de β-mercaptoéthanol② pour 1 mL de tampon RLT.
- Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100% au tampon RPE comme indiqué sur la bouteille③.

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder 100 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C
- Placer les tissus broyés dans un tube de 2ml et ajouter 1 ml de Qiazol④ (sous la hotte) et homogénéiser en faisant passer le lysat 10 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free
- Laisser reposer 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 200µl de chloroforme, secouer vigoureusement et laisser à température ambiante pendant 2-3 minutes
- Centrifuger pendant à 12000g 15 minutes, à 4°C
- Transférer le surnageant dans un tube collecteur de 2 mL (on retrouve 3 phases dans le tube et la première correspond aux ARN)
- Ajouter 600µl d'éthanol à 70% (mélanger par aspiration-refoulement avec une pipette)
- Transférer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat.

  NB : Le volume excédant 700 µl, charger les échantillons successivement en gardant la même colonne et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation

- Pour le traitement à la DNase, déposer 350 µL de tampon RW1 sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g pour laver. Jeter l'éluat.
- Préparer le volume nécessaire de DNase I à savoir 10 µL de solution stock DNase I aliquotée⑤ à 70 µl de tampon RDD. Mélanger doucement par inversion du tube.
- Déposer 80 µl préparés par colone, et incuber sur la paillasse pendant 15 min (20-30°C).
- Laver avec 350 µL de tampon RW1, et centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Laver avec 500 µL de tampon RPE④la colonne et centrifuger à ≥8000 g. Jeter l'éluat.

- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à ≥8000 g. Jeter l'éluat
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et recentrifuger 1 min à vitesse maximale pour sécher la membrane

NB : Enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement. S'assurer que le tube est bien vide.

- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL du tampon d'élution. Centrifuger 1min à ≥8000 g pour éluer l'ARN.
- Si le taux d'ARN attendu est >30 µg, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau. Eluer dans le même tube collecteur
- Doser les ARN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons (fiche 37)
- Aliquoter les ARN par 1 µg (et 500 ng pour le dépôt sur gel d"agarose – fiche 38) et conserver à -80°C.

① Rneasy Mini Kit : Qiagen, Courtabœuf, France
② Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 µl de β-Mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.
③ Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE
④ Qiazol lepsis reagent™ (Qiagen, Courtaboeuf,France)
⑤ DNase set Qiagen. Diluer la DNase I solide (1500 Kunitz unités) dans 550 µl d'eau fournie. La DNase I est particulièrement sensible à la dénaturation physique. Il faut mixer seulement en inversant doucement les tubes. Ne pas mélanger au vortex. Préparer des aliquots de 10 µl.

Fiche 37

Quantification des ARN ou ADN

- Prendre une cuve en quartz propre dans laquelle on dépose 60µl (volume minimum pour lire une DO) d'eau Milli-Q afin de faire le blanc
- Diluer l'ARN dans de l'eau à un 1/30ème soit 2µl d'ARN/ADN dans 58µl d'eau Milli-Q
- Lire l'absorbance à 230, 260 et 280 nm avec à un spectrophotomètre①

NB : Pour avoir une bonne estimation de la concentration, la DO doit être comprise entre 0,1 et 1 unité de DO (si on se situe en dehors de cet intervalle, il faut diluer ou concentrer les échantillons)

Le ratio A_{260} / A_{280} est également calculé pour vérifier la pureté de la solution. Celui-ci doit être compris entre 1,8 et 2. Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN ou ADN.

De même, le ratio A_{260}/A_{230} est mesuré. Un ratio supérieur à 2,1 indique une contamination par des produits organiques.

- Calculer la concentration en ARN/ADN à partir de la valeur mesurée à 260nm, sachant qu'une concentration d'ARN/ADN de 40 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO. Ne pas oublier de multiplier le résultat trouvé par la dilution choisie

  $$[ARN] = 40\ \mu g/mL \times A_{260}\ nm \times \text{facteur de dilution}$$
- Aliquoter les ARN à 1 µg/tube

① Spectrophotomètre Biophotometer, Eppendorf

Fiche 38

Analyse qualitative de l'ARN/ADN sur gel d'agarose

- Peser l'agarose① afin de préparer un gel à 0,8-1% (p/v (g/mL)) selon la taille des ADN étudiés
- Dissoudre l'agarose dans du tampon TBE 1X② (50 mL pour 8 échantillons ou 80 mL pour 15/20 échantillons) par chauffage au four à micro-ondes jusqu'au début d'ébullition puis laisser refroidir à ~50°C sur la paillasse

  NB : Ne pas faire bouillir le mélange pour éviter le risque de prjections

- Après refroidissement, ajouter du bromure d'éthidium (BET)③ à une concentration finale de 0,5 µg/mL (1 ou 2 gouttes) et homogénéiser
- Verser délicatement la solution chaude d'agarose dans le support de gel où le peigne en téflon est préalablement positionné, et laisser polymériser pendant 15 min à température ambiante.
- Retirer le peigne et la plaque de son support puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse④ horizontale remplie avec du tampon TBE 1X
- Déposer dans les puits du gel, 500 ng de produits PCR (qsp 10 µL avec de l'eau Milli-Q) mélangés à 2 µL de solution de dépôt⑤ ainsi que des marqueurs de taille ⑥
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu
- Faire migrer l'ADN sous une tension constante de 80 V (petit gel) ou 130 V (grand gel) pendant 50 min (18 V/cm)
- L'ARN contenu dans le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS⑦

  NB : Pour le test d'ARN, deux bandes correspondant aux ARNr 28S et 18S sont alors visibles sur le gel, par contre, si les ARN sons dégradés, un smear est alors observé

① Agarose standard, Euromedex
② Tampon TBE 10X : Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH 8,0)
③ Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio
④Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad)
⑤ Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
⑥ ϕX174 RF DNA/*Hae*III Fragments : 72-1353 pb (11 bandes) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)
- pUC18/MspI : 26-501 (12 bandes) ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
- 100 bp DNA Ladder : 100-1000 pb (11 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- 1 kb DNA Ladder : 250-10000 pb (14 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
- SmartLadder : 200-10000 pb (14 bandes) marqueur de quantification (Eurogentec)

⑦Image MasterTM VDS, Pharmacia Biotech

Fiche 39

Transcription inverse des ARN (RT)

Cette méthode consiste en une rétrotranscription des ARN en utilisant le kit QuantiTect Reverve Transcription de Qiagen①. Elle consiste en une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse). Le protocole est optimisé pour 10 pg à 1 µg d'ARN.

NB : Toutes les étapes doivent être réalisées dans la glace pour éviter la dégradation des ARN.

Contenu du kit :

1- Tampon *gDNA Wipeout*, 7x : Pour l'élimination de l'ADN génomique.
2- *Quantiscript Reverse Transcriptase* : Pour l'utilisation de la RT-PCR en deux étapes. Contient un mélange des produits *Qiagen Omniscript Reverse Transcriptase* et *Sensiscript Reverse Transcriptase*, deux enzymes hétérodimériques exprimées chez E.coli., des inhibiteurs des RNases.
3- *Quantiscript RT Buffer*, 5x : Pour l'optimisation de la reverse transcription, contient Mg^{2+} et dNTPs.
4- *RT Primer Mix* : Mélange d'oligo-dT et de *random primers* dissouts dans l'eau.
5- *RNase-Free* Water : Eau ultrapure.

NB : Avant de commencer, dissoudre éventuellement les précipités qui peuvent se former dans le tampon gDNA Wipeout en vortexant ou en chauffant rapidement à 37°C jusqu'à disparition des précipités.

Avant de commencer, décongeler les échantillons et le contenu du kit dans de la glace (sauf l'enzyme RT qu'il faut sortir au dernier moment)

Elimination de l'ADN génomique :

- Dans un microtube de 0,2 mL stérile, préparer un volume d'ARN équivalent à 1 µg d'échantillon qsp 12 µL d'eau RNase free
- Ajouter 2µl de tampon gDNA Wipeout® par tube d'ARN
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger rapidement
- Incuber 9 minutes à 42°C au thermocycleur② et placer les tubes immédiatement sur glace

Transciption inverse :

- Préparer le mélange réactionnel selon le tableau suivant :

Réactifs	Volume/tube
Tampon Quantiscript RT 5x	4 µL
RT Primer MIix	1 µL
Quantiscript RT	1 µL

- Préparer un mélange réactionnel selon le nombre de tube (compter 10% d'excès pour les erreurs de pipetage)
- Ajouter 6 µL du mix / tube d'ARN traité à la gDNA Wipeout
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement

- Préparer 2 tubes control négatif et positif, tel que :
  Control négatif (RT sans ARN) : Remplacer les 14 µL d'ARN par 14 µL d'H2O
  Control positif (RT sans enzyme) : Remplacer les 1 µL de « Quantiscript RT » par 1 µL d'H2O, voir 15 µL H2O au total

- Placer dans le thermocycleur préchauffé
- Sélectionner le programme RT suivant :
  Segment 1 : 42°C 15 min

  Segment 2 : 95°C 3 min
- Mettre les tubes sur glace
- Aliquoter et conserver le ADNc produit à -20°C

① Quantitect® Reverse Transcription Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France
② Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf cedex

Fiche 40

PCR semi-quantitative en temps réel par utilisation du KIT Quantitect™ SYBR® Green PCR①

La technique de RT-PCR *(Reverse transcription- Polymerase Chain Reaction)* sert à étudier l'expression des gènes par détection de l'accumulation des ARNm. Cette technique consiste à extraire les ARN totaux des tissus à analyser (fiche 35-36) et de les copier *in vitro* en ADNc complémentaire) simple brin (fiche 39). Les ADNc obtenus servent de matrice pour la réaction de polymérisation en chaîne qui suit et qui met en œuvre une ADN polymérase. Un fragment de l'ADNc cible est ainsi multiplié en utilisant un couple d'amorces spécifiques à la séquence de l'ARN d'intérêt. La quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle est mesurée en temps réel grâce à un marqueur fluorescent.

- Préparer le mélange réactionnel à l'abri de la lumière, selon le tableau suivant :

Amplification	Concentration finale
2x QuantiTect SYBR Green PCR②	1X
amorce S 10µM	0,5 µM
amorce AS 10µM	0,5 µM
$MgCl_2$ stock 25mM② SYN I	2,5 à 5mM (selon la mise au point)
ADNc dilué (1/10,1/100, …)	-
H_2O RNase free	qsp 20 µL

- Transférer 19 µL par capillaire③
- Ajouter 1 µL de la dilution d'ADNc soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme

NB : Vérifier qu'il y a le même volume dans chaque capillaire

- Insérer les capillaires dans le LightCycler④ et régler le bloc thermostaté selon un programme commencant par lancer le programme selon une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 15 min, suivie d'une étape d'amplification de 30 cycles, à température variable selon les gènes étudiés et les amorces utilisées (voir tableau 10 pour les conditions). A la fin, ajouter une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 min suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5 s
- Les capillaires peuvent ensuite être conservés à -4°C pour la visualisation des ADN sur gel dagarose

- Analyser les résultats grâce au logiciel de quantification RelQuant⑤ après avoir vérifié que le pic de la courbe de fusion correspond bien à la taille de l'amplicon sur gel (Fiche 38)

3. Calcul et Interprétation des résultats

- Utiliser le logiciel RelQuant software après avoir vérifié que le pic de la courbe de fusion correspond bien à la taille de l'amplicon sur gel.
- Les résultats seront exprimés en unité arbitraire.

① Capillaires : Roche Diagnostic (Meylan, France)
② Kit Quantitect™ SYBR® Green PCR Qiagen (Courtabœuf, France)
③ Ligth cycler : appareil thermocycler à fluorescence Roche Diagnostic (Meylan, France)
④ Mesure de la fluorescence en acquisition unique
⑤ RelQuant : Roche Diagnostic (Manheim ,Allemagne)

Les oligonucléotides ont été synthétisés par le laboratoire commun de biologie moléculaire de l'hôpital de Brabois, Nancy. Les oligonucléotides ont été choisis à l'aide du programme Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse internet, http://www.genome.wi.mit.edu.

Gène	Amorces	Conditions Animaux	Conditions Cellules
Stat3	Sens : 5'-GAAGAGTGCCTTCGTGGT-3’ Anti-sens : 5'- AGCAACCTGACTTTTGTGG-3’	0,5µM/56°C	1µM/56°C
PolII	Sens : 5’-GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC-3’ Anti-sens : 5’- GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG-3’	0,75µM/ 56°C / 3,5mM $MgCl_2$	1µM/ 56°C / 3,5mM $MgCl_2$

Tableau 10 : Séquences des amorces sens et anti-sens permettant d’amplifier les cDNA d’intérêts aux températures d’hybridation et conditions d’amplification sur le LightCycler correspondantes.

Fiche 41

Screening de l'expression des gènes par « *RT² Profiler PCR Arrays – SABiosciences Kit* ①»

Principe : L'analyse quantitative de l'expression des ARNm est réalisée avec le kit « *RT² Profiler PCR Arrays - SABiosciences*» qui permet l'analyse de l'expression d'un panel de gènes associés à plus de 100 voies biologiques spécifiques. Les « *RT ² Assays primer qPCR* » correspondent à des amorces pour PCR quantitative expérimentalement testées et optimisées pour l'analyse de l'expression génique. Notre étude a été effectuée sur une plaque contenant 84 gènes impliqués dans les voies métaboliques de la neurogenèse et les cellules souches neuronales - « *Rat Neurogenesis and Neural Stem Cells* ». Dans un premier temps, l'expression de 5 gènes de référence est étudiée, et les données sont confrontées à celles obtenues avec les gènes d'intérêts. La plaque contient des puits pour le contrôle de contamination par l'ADNg et un contrôle de l'efficacité.

RT pPCR :

La transcription inverse est réalisée à l'aide du *RT² First Strand Kit*① en suivant la même procédure décrite dans la fiche # 39. Ce kit a été optimisé pour la réaction d'amplification en chaîne avec le kit RT² Profiler PCR Arrays. Il contient une étape d'élimination d'ADNg et un contrôle d'ARN externe pou s'assurer de la fiabilité des résultats.1 µg d'ARN totaux extraits (fiche 35,36) est d'abord mélangé au tampon d'élimination d'ADNg puis la synthèse d'ADNc est réalisée grâce à un bloc thermostaté (techne) à l'aide de la transcriptase inverse et un mix contenant les amorces et le tampon de rétro-transcription.

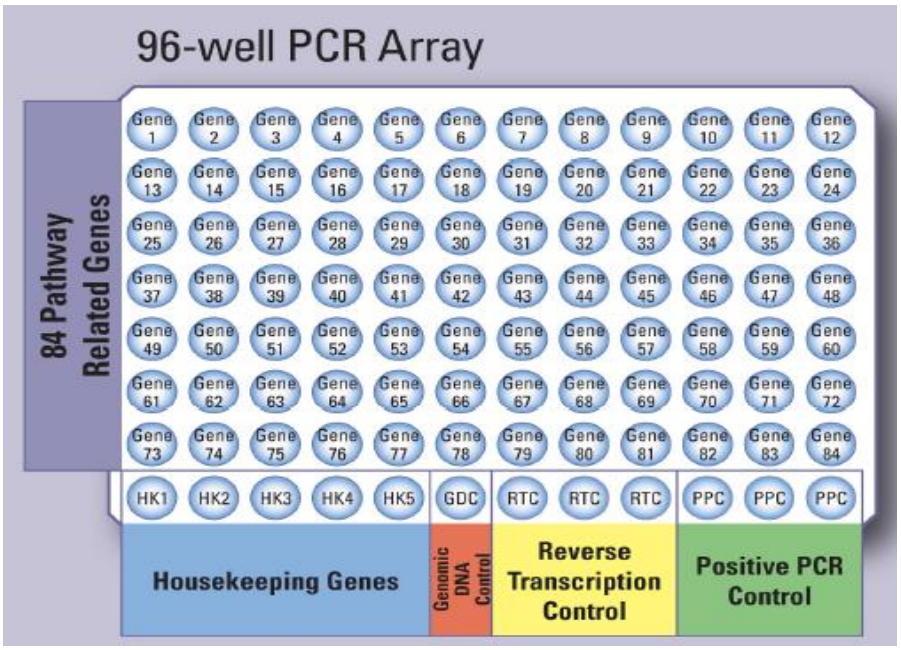
Les ADNc obtenus sont ensuite mélangés à 91 µL d'eau RNase free (Volume final de 111 µL) et conservés à -20ºC.

Réaction d'amplification :

- Dans un tube 5mL stérile, mélanger les composants du mix

2x RT^2 SYBR Green Mastermix	1350 µL
ADNc issu de la réaction dé transcription inverse	102 µL
Eau RNase-free	1248 µL
Volume total	2700 µL

- Ajouter 25 µL du composant du mix dans chaque puits de la plaque avec les amorces des gènes déjà fixées



<u>Figure 6</u> : Exemple repréentatif du contenu des puits d'une *PCR array*

- Mettre un film adhésif transparent et autocollant sur la plaque
- Centrifuger brièvement (1 min à 1000g) pour éliminer les bulles d'air
- Programmer le bloc thermostaté② pour 10 min d'activation de la polymérase puis 40 cycles de deux étapes: 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 60 sec③
- Analyser les résultats à l'aide du fichier excel d'analyse fourni *SABiosciences PCR Array Data Analysis Template*

① *RT² Profiler PCR Arrays Kit*, *RT² First Strand Kit,* SABiosciences, Courtabœuf, France
② *Roche LightCycler 480*
③ Ces conditions ont été optimisées par le fournisseur, permettant de réaliser une amplification linéaire de la quantité d'amplicons de tous les gènes.

Fiche 42

Extraction d'ADN par QIAamp® DNA Mini extraction kit①

Ce kit est conçu et optimisé pour extraire les ADN totaux purifié à partir de différents extraits cellulaires, tissulaires ou du sang et autres fluides du corps. L'ADN purifié en utilisant ce kit mesure jusqu'à 50kb avec une présence majoritaire des fragments à 20-30kb. Cette longueur d'ADN est facilement dénaturée durant le cyclage thermique pour une amplification à haute efficacité. Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C, sauf si indiqué autrement.

➢ Avant de commencer :
- Préchauffer 2 bain-marie à 56°C et à 70°C
- Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100% au tampon AW1 et AW2 comme indiqué sur la bouteille

Pour les tissus

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder 25 mg de tissu puis conserver le reste à -80°C
- Placer les tissus broyés dans un tube de 1,5ml② et ajouter 180 µLdu tampon ATL fourni dans le kit
- Ajouter 20 µL de la protéinase K et vortexer
- Incuber à 56°C jusqu'à lyse totale de l'échantillon (1 à 3 heures). Vortexer 2 à 3 fois durant l'incubation. Centrifuger brièvement
- Ajouter 200 µL du tampon AL, vortexer pour 15 sec et incuber 10 min à 70°C. Centrifuger brièvement

Pour les cellules

- Récupérer un lysat cellulaire à partir de cellules ensemencées (2.10^6) sur des plaques de diamètre <6 cm② dans un tube de 1,5 mL et ajouter du PBS③
- Ajouter 20 µL de la protéinase K et vortexer pour s'assurer qu'il n'y a pas d'amas cellulaire
- Ajouter 200 µL du tampon AL, vortexer pour 15 sec et incuber 10 min à 56°C. Centrifuger brièvement

- Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100%), vortexer pour 15 sec et centrifuger brièvement
- Transférer le produit de la dernière étape sur une mini-colonne QIAamp Mini placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 1 min à 6000 g. Jeter l'éluat.
- Ajouter 500 µL de tampon AW1 sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 1 min à 6000 g. Jeter l'éluat
- Ajouter 500 µL de tampon AW2 sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 3 min à 20000 g. Jeter l'éluat.

- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et recentrifuger 1 min à vitesse maximale pour sécher la membrane

  NB : Enlever délicatement la colonne du tube pour éviter tout contact entre la membrane et le produit d'écoulement. S'assurer que le tube est bien vide.

- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 200 µL du tampon AE ou de l'eau RNase-free
- Incuber 1 min à température ambiante et centrifuger 1 min à 6000 g
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 200 µL du tampon AE ou de l'eau RNase-free
- Incuber 5 min à température ambiante et centrifuger 1 min à 6000

  NB : Une incubation de 5 min de la mini-colonne avec le tampon AE permet d'améliorer le rendement en ADN.

- Doser les ADN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons (fiche 37). Si les ADN sont dilués, procéder à une re-concentration des ADN
- Aliquoter les ADN par 1 µg (et 500 ng pour le dépôt sur gel d'agarose (fiche 38) et conserver à -80°C

Re-concentration des ADN

- Ajouter sur l'extrait d'ADN :
  - 2,5 volume d'éthanol 100% froid
  - 1/10 d'acétate de sodium (3M pH 5,2)
  - 1µL de glycogène
- Vortexer et incuber 10 min sur carboglace
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm. L'ADN doit être culoté au fond du tube
- Retirer le liquide et Laver à l'éthanol 70% froid (200 à 250µL)
- Centrifuger 10 min à 13 rpm
- Sécher les culots puis re-suspendre dans le volume d'H2O adéquat

① **QIAamp® DNA Mini extraction kit**: Qiagen, Courtabœuf, France
② Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France
③PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche 43

Méthylation d'ADN par *Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit®*

Principe : Le *Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit* permet la quantification de la méthylation de l'ADN global. Dans ce kit, l'ADN est immobilisé dans les puits traités pour avoir une haute affinité à l'ADN. La fraction méthylée de l'ADN est reconnue par un anticorps 5-méthylcytosine et quantifiée par une réaction type Elisa. La quantité d'ADN méthylée esi proportionnelle à l'intensité de la densité optique.

Solution fournis avec le kit
GU1 (10X Wash Buffer, solution de lavage)
GU2 (DNA Binding Solution, solution de liaison à l'ADN)
GU3 (Methylated DNA Control, 100 µg/ml, Contrôle de méthylation d'ADN)
GU4 (Block Solution, solution de blockage)
GU5 (Capture Antibody, 1 mg/ml, Anticorps de reconnaissance)
GU6 (Detecting Antibody, 400 µg/ml, Anticorps de détection)
GU7 (Enhancer solution, solution d'activation)
GU8(Developing Solution, solution de révélation)
GU9 (Stop Solution, solution d'arrêt)
Negative control DNA (50µg/µl)

Quantification de la méthylation

- Extraction classique d'ADN
- Déterminer le nombre de puits nécessaires (laisser le reste dans le sac noir hermétique à 4°C)
- Diluer **GM1** dans de l'eau distillée (ph7.2-7.5) (1mL **GM1** + 9ml d'eau) (*prévoir 2mL de GM1 1x par puits)*
- Déposer 28µL de **GM2** dans chaque puits, puis 2µl (100 à 200ng) d'ADN dans les puits des échantillons

NB : En parallèle des échantillons, des témoins doivent être préparés comme suit :

- Témoin positif + gamme : Diluer **GM3** de 0.2 à 10ng/µL avec GM2. Ajouter 28µl de **GM2** dans chaque puits puis ajouter 20µl de chaque dilution de **GM3**
- Blanc : ajouter 28µL de **GM2** + 2µL de contrôle négatif

Préparation de la gamme :

[ADN] ng/µL	Numéro de dilution		Solution GM2 (µl)
0.2		2µl dilution D1	8 µl
0.5		5µl dilution D1	5 µl
1	D1	2µl dilution D10	18 µl
2		2µL dilution D10	8 µl
5		5µl dilution D10	5 µl
10	D10	2 µl solution mère	18 µl

- Homogénéiser chaque puits au moment du dépôt par refoulement
- Agiter la plaque pour que la solution recouvre le fond du puits
- Incuber à l'abri de l'humidité 40 min à 37°c puis 35 à 40 min a 60°C pour évaporer la solution

NB : Si la solution n'est pas entièrement évaporée, elle peut être recueillie avec une P10 ou P20 sur le bord du puits. S'assurer que les puits soit bien secs. Si ce n'est pas le cas, prolonger l'incubation à 60°c pendant 5 à 10 min pour sécher les puits.

- Ajouter 150µl de **GM4** dans chaque puits.
- Incuber 30 min à 37°C puis aspirer le liquide
- Laver 3 fois 150µl de **GM1** 1x
- Diluer **GM5** au 1/1000 avec **GM1** 1x (cf : 1µg/mL). Ajouter 50µl de **GM5** dilué dans chaque puits
- Incuber 1h à température ambiante
- Aspirer le liquid et Laver 4 fois 150µl avec du **GM1** 1x
- Diluer **GM6** au 1/5000 à 1/10 000 avec **GM1** 1x. Ajouter 50µl de **GM6** dilué dans chaque puits
- Incuber 30 min à température ambiante
- Aspirer le liquide et Laver 5 fois 150µl de **GM1** 1x
- Diluer **GM7** au 1/5000 au 1/10 000 avec **GM1** 1x. Ajouter 50µl de **GM7** dans chaque puits
- Incuber 30 min à température ambiante
- Aspirer le liquide et Laver 5 fois 150µL de **GM1** 1x
- Ajouter 100µl de **GM8** dans chaque puits
- Incuber 1-5 min à l'abri de la lumière. Suivre la coloration dans les puits contenant les échantillons et les puits contrôles pour avoir une coloration bleu moyenne
- Ajouter 50µL de **GM9** dans chaque puits pour stopper la réaction enzymatique

NB : Les puits de la gamme les plus concentrés doivent être bleu moyen. Après ajout de la solution **GM9** la couleur vire au jaune

- Lire l'absorbance à 450 nm dans les 2 à 15 min
- Calculer le pourcentage de méthylation

Calcul : Pour un calcul simplifié de la méthylation d'ADN utilisé la formule suivante (pour 10 ng du contrôl positif et 100 ng d'échantillon d'ADN)

$$Methylation\ \% = \frac{(Sample\ OD - Negative\ Control\ OD) / X^*}{(Positive\ Control\ OD - Negative\ Control\ OD) \times 10}$$

Pour un calcul plus précis, tracer la droite montrant les valeurs de la densité optique DO en fonction de la quantité GM3 et déterminer la pente en DO/ng. Calculer la quantité d'ADN méthylé suivant la formule suivante :

$$Methylated\ DNA\ (ng) = \frac{Sample\ OD - Negative\ Control}{Slope} \times 100\%$$

$$Methylation\ \% = \frac{Methylated\ DNA\ Amount / X^*}{Sample\ DNA\ Amount\ Added} \times 100\%$$

*X contenant en GC selon l'espèce (ex, le contenant en GC est de 41% dans l'ADN génomique humain, 42% pour les rats et les souris, 35% pour la A.thaliana, 38% pour les levures, ..)

① *Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit*, Epigentek, Euromedex, Mundolsheim, France

Etudes des microARN

Fiche 44

Hybridation *in situ* par *miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)*①

Principe : L'hybridation in situ permet l'observation des miRs par complémentarité de séquence grâce à l'utilisation de sondes "froides", spécifiques des miRs d'intérêts, marquées en 3' et 5' par une molécule de digoxygénine (DIG), et une sonde contrôle spécifique du SnoRNA U6 marquée uniquement en 5'. Le marquage est mis en évidence par un anticorps Iaire anti-DIG de Souris puis reconnu par un anticorps IIaire « anti-souris » spécifique au premier et conjugué à un fluorochrome qui émet dans le vert (λ excitation = 490 nm, λ émission = 520 nm).

Préparation du mélange d'hybridation

- Diluer la solution Hybridation Buffer 1X à 1:1 avec de l'eau RNase free (tampon d'hybridation)
- Dénaturer les sondes LNA™ 4 min à 90°C
- Vortexer et mélanger au tampon d'hybridation pour avoir une concentration finale de 1nM pour les cellules et 0,5nM pour les tissus

Déparaffinage (pour tissus)

- Plonger les lames dans une solution d'Histo-Clear™② 2x3min
- Réhydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool de 100° (2x3min), 95° (1x3min), 70° (1x3min) et 50° (1x3min)
- Rincer dans de l'eau distillée pendant 5 minutes
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™

Ensemencement des cellules (Culture cellulaire)

- Ensemencer 3.10^5 cellules sur des lamelles en verre traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde③ à 1%
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS

Protocole d'hybridation in situ

- Mélanger la protéinase K à la solution tampon de protéinase K. Déposer 300µL du mélange obtenu par lamelle. La concentration de protéinase K doit être optimisée selon le type cellulaire ou tissu étudié. Après la mise au point, on a procédé aux concentrations suivantes : 5µL/10mL pour les tissus, 7µL/10mL pour les cellules
- Incuber 10 min à 37°C
- Rincer 2 fois 5 min au PBS
- Déshydrater les coupes ou cellules fixées dans des bains successifs d'alcool de 50° (1x3min), 70° (1x3min), 95° (1x3min), et 100° (2x3min). Laisser sécher 15 min à température ambiante
- Couvrir chaque section avec une lame en verre stérile. Eviter la formation de bulles d'air

- Déposer 25µL du mélange d'hybridation contenant les sondes dirigées contre les séquences de microARN cibles④ et laisser incuber 1 heure à 55°C
- Enlever la lame en verre et traiter à des rinçages successifs à 55°C par des solutions de SSC à différentes concentrations 5xSSC (1x5min), 1xSSC (2x5min), 0,2xSSC (2x5min) et une dernière étape à température ambiante 0,2xSSC (1x5min)
- Rinçer rapidement au PBS puis réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™. Attention à ne pas sécher les coupes
- Blocker avec une solution Denhardt 1x, 15 min à température ambiante dans une chambre humide
- Déposer le réactif anti-DIG⑤ (anticorps primaire) dilué au 1 :800 dans la solution de blockage contenant 2% su sérum de mouton. Incuber 1 heure à température ambiante
- Rincer 3 fois 3 min au PBS-T
- Incuber 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire⑥ dilué au 1 :2000
- Rincer 2 fois avec une solution de PBS-T
- Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI⑦
- Rincer 2 fois 5 min à l'eau RNase-free
- Déshydrater dans des bains successifs d'alcool de 50° (1x3min), 70° (1x3min), 95° (1x3min), et 100° (2x3min). Laisser sécher 15 min à température ambiante
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage⑧
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence⑨

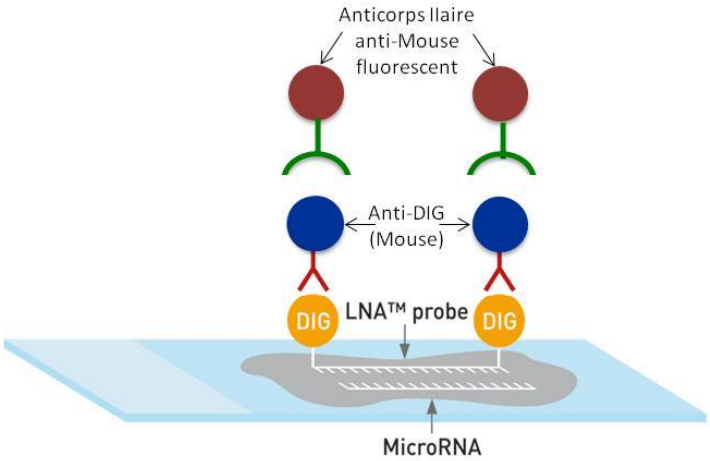


Figure 6 : Schéma repréentatif du protocole d'hybridation *in situ*

①miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit, Exiqon. Dans le kit, le tampon d'hybridation et la solution de la protéinase K sont fournis
②Histo-Clear™ : National diagnostics USA
③ Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans du PBS 1X : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
④Sonde LNA™ marquée au DIG, Exiquon, GGCATTCACCGCGTGCCTTA pour la cible rno-miR-124, Ref 88066-15, CACGAATTTGCGTGTCATCCTT pour le contrôle SnoRNA-U6, Ref 99002-15
⑤Anti-Digoxigenin, Mouse monoclonal antibody unconjugated, clone 1.71.256, Roche
⑥Anticorps Anti-Mouse, Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse, Invitrogène
⑦ DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous Bois, France
⑧ Liquide de montage, Aqua-polymont : Polysciences, France
⑨ Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France ou microscope confocal ; *Nikon Instruments*, Champigny sur Marne Cedex, France

Solution	Volume	Composition	Note
Solution stock de protéinase K (20mg/mL)	600µL	600µL de Tris-HCl 10mM pH7,5	12,114g/10mL
Protéinase K Buffer	1L	5mL Tris-HCl, pH 7,4 2mL 0,5M EDTA 0,5mL NaCl 5M	1,21g/10mL 1,46g/10mL 0,58g/2mL
Hybridation Buffer 1X	30 mL	15 mL 2X ISH Buffer 15 mL Rnase free water	
20X SSC	1L	150 nM NaCl 15 nM Citrate de Sodium, pH 7,4	175,3g 88,2g
5X SSC	1L	250 mL 20X SSC 750 mL eau milliQ	
1X SSC	1L	50 mL 20X SSC 950 mL eau milliQ	
0,2X SSC	1L	10 mL 20X SSC 990 mL eau milliQ	
Solution de blocage Denhardt 50X	1L	1% Ficoll 1% polyvinylpyrolidone 1% BSA (Bovine Serum Albumine)	1g/100mL Utilisation à 1X.
PBS 10X	1L	12,1g phosphate disodique 80g chlorure de sodium 2g monopotassium phosphate 2g chlorure de potassium, pH 7,4	Utilisation à 1X
PBS-T	1L	1mL Tween-20 1L de PBS 1X	

NB : Toutes les poudres utilisées sont solubilisées dans de l'eau milliQ (Rnase free water). Toutes les solutions de riniçage et d'hydratation doivent être autoclaver.

<u>Tableau 11</u>: Compositions des solutions utilisées pour l'hybridation in situ.

Fiche 45

Extraction de microARN par *mirVana™ miRNA Isolation Kit*①

Principe : Les miARN sont des petits ARN non codants de 15 à 30 nucléotides. Le mirVana™ miRNA Isolation Kit a été conçu pour la purification de ces ARN de petites tailles. Le kit consiste en une extraction en phase organique suivie de l'immobilization de l'ARN sur des filtres à microfibres en verre pour une meilleure purification.

- ➢ Avant de commencer :
- Préparer l'éthanol à 70%
- Ajouter 21mL d'éthanol 100% à la solution de lavage 1 (miRNA Wash Solution 1)
- Ajouter 40mL d'éthanol 100% à la solution de lavage 2/3 (miRNA Wash Solution 2/3)

I. Préparation de l'échantillon (travailler sur glace)

Pour tissus

- Peser ou estimer le poids de l'échantillon (0,5-250mg)
- Lyser avec 10 fois le volume (1g/10mL) avec le tampon de lyse *lysis/binding solution*
- Récupérer le lysat tissulaire dans un tube de 1,5 mL et homogéniser en passant le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free jusqu'à l'obtention d'un lysat tissulaire homogène

Pour cellules

- Lyser les cellules (10^2-10^7 cellules) poussant sur des plaques② de diamètre <6 cm avec 300 µL du tampon de lyse *lysis/binding solution* directement dans la plaque de culture après avoir aspiré le milieu et laver 1 fois au PBS③
- Récupérer le lysat cellulaire dans un tube de 1,5 mL④ en s'assurant qu'il n'y a pas d'amas cellulaire
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free jusqu'à l'obtention d'un lysat homogène

II. Extraction des miARN

- Ajouter 1/10 volume de miRNA Homogenate Additive au lysat, bien mélanger et laisser reposer 10 min sur glace
- Ajouter 1 volume d'acide phénole⑤/chloroforme⑥, vortexer 30 à 60 secondes
- Centrifuger pendant 5 min à 10000 g à température ambiante pour séparer phase aqueuse et organique
- Récupérer la phase acqueuse dans un nouveau tube de collection. Noter le volume prélevé
- Ajouter 1,25 volume d'éthanol 100% à la phase acqueuse et mélanger doucement
- Transférer le mélange obtenu dans les filtres « Cartridge » à microbibres en verre placés dans des nouveaux tubes collecteurs
- Centrifuger pendant 15 s à 10000 g. Jeter l'éluat et répéter jusqu'à infiltration de tous le mix lysat/éthanol dans les filtres

NB : Si le volume excède 700 µl, charger les échantillons successivement en gardant la même colonne et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation

- Ajouter 700 µL de miRNA Wash solution1 aux filtres cartridge, et centrifuger pendant 5 à 10 s à 10000 g pour laver. Jeter l'éluat
- Ajouter 500 µL de miRNA Wash solution2/3 aux filtres cartridge, et centrifuger pendant 5 à 10 s à 10000 g pour laver. Jeter l'éluat (Répéter 2 fois)
- Recentrifuger 1 min à vitesse maximale pour sécher la membrane et éliminer les fluides résiduels
- Transférer le filtre dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et ajouter 100µL de la solution d'élution (eau RNase-free). Centrifuger pendant 20 à 30 s à 10000 g. Récupérer l'éluat contenant les ARNs
- Doser les ARN afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons (fiche 37)
- Aliquoter les ARN par 1 µg (et 500 ng pour le dépôt sur gel d'agarose (fiche 38) et conserver à -80°C

① *mirVana*™ *miRNA Isolation Kit*, lifetechnologies.
② Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France
③PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco/Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
④ Plastiques stériles à usage unique : BD Falcon, Dutscher, Brumath, France
⑤ Phénol équilibré dans du Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0)
⑥ Chloroforme : BDH, VWR International, France

Fiche 46

PCR semi-quantitative en temps réel par utilisation du KIT *Taqman®* *MicroRNA Assays*

Principe : *Taqman® MicroRNA Assays* sont conçus pour détecter et quantifier avec précision les quantités de microARNs matures. Cette méthode se caractérise par une quantification hautement sensitive (détection jusqu'à 1 à 10 ng d'ARNs totaux) et spécifique (détection de la forme mature uniquement sans les précurseurs, avec une discrimination à une base près.
Cette méthode consiste en premier en une rétrotranscription des ARNs en utilisant le kit *Taqman® MicroRNA Reverse Transcription kit*① suivie d'une étape d'amplification en PCR en présence de l'*AmpliTaq® Gold DNA polymerase* qui permet l'amplification des ADNc cibles en utilisant des amorces séquences-spécifiques adaptés pour le kit *Taqman® MicroRNA Assay*②. Cette technique permet la détection d'un sugnal fluorescent générés par clivage des sondes Taqman.

Transcription inverse

- Dans un microtube de 0,2 mL stérile, préparer un volume d'ARN équivalent à 10 ng d'échantillon qsp 5 µL d'eau RNase free
- Préparer le mélange réactionnel selon le tableau suivant :

Réactifs	Volume/tube
100mM dNTPs	0,15 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1 µL
10x Reverse Transcription buffer	1,5 µL
RNase inhibitor, 20U/µL	0,19 µL
Nuclease free water	4,16 µL

- Préparer un mélange réactionnel selon le nombre de tube (compter 10% d'excès pour les erreurs de pipetage) et placer sur glace
- Ajouter 7 µL du mix / tube d'ARN qsp 5µL d'eau
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement

- Préparer 2 tubes control négatif et positif, tel que :
  Control négatif (RT sans ARN) : Remplacer les 5 µL d'ARN par 5 µL d'H2O
  Control positif (RT sans enzyme) : Remplacer les 1 µL de « MultiScribe™ Reverse Transcriptase» par 1 µL d'H2O

- Ajouter 3 µL des *RT primer*/tube
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Incuber les tubes 5min sur glace

- Placer dans le thermocycleur préchauffé
- Sélectionner le programme RT suivant :

Segment 1 : 16°C 30 min

Segment 2 : 42°C 30 min

Segment 3 : 85°C 5 min

Segment 4 : 4°C ∞

- Mettre les tubes sur glace
- Aliquoter et conserver le ADNc produit à -20°C ou procéder directement à l'étap suivante

Amplification par PCR

NB : Les thermocycleur traditionnels ne pouvant pas détecter et enregistrer les signaux florescents, l'amplification en chaîne doit impérativement être performée avec un système de PCR en temps réel

- Préparer le mélange réactionnel à l'abri de la lumière, selon le tableau suivant :

Réactif	Volume
Taqman 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG[a]	10µL
Nuclease-free water	7,67µL

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Ajouter 17,67µL du mix à 1 µL du mix Taqman MicroRNA Assay contenant les amorces du miR d'intérêt ou de référence③
- Ajouter 1,33µL du produit de la réaction de transcription inverse par tube
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Dans les puits d'une plaque 96 puits④, mettre 20 µL de mix.
- Mettre un film adhésif transparent et autocollant⑤ sur la plaque et centrifuger brièvement.pour éliminer les bulles d'air
- Programmer le bloc thermostaté⑥ pour 40 cycles de deux étapes: l'activation de l'enzyme *AmpliTaq® Gold DNA polymerase* à 95°C pendant 10 min, et la PCR en elle-même : 95°C pendant 15 sec (dénaturation) et 60°C pendant 60 sec (hybridation et élongation)

① *Taqman® MicroRNA Reverse Transcription kit,* Applied Biosystems

② *Taqman® MicroRNA Assay,* Applied Biosystems

③ Sonde, Applied Biosystems, GGCATTCACCGCGTGCCTTA pour la cible rno-miR-124, Ref 001182, CACGAATTTGCGTGTCATCCTT pour le contrôle SnoRNA-U6, Ref 001973

④ ABI PRISM® *96-Well Optical reaction plate,* Applied Biosystems

⑤ ABI PRISM® *Optical Adhesive Covers,* Applied Biosystems

⑥ *Step One Plus thermocycler*, Applied Biosystems

Etudes comportementales

Fiche 47

HOMING

Principe : Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et de mémoire olfactivo-hippocampo-dépendantes chez les jeunes individus avant le sevrage. Il est basé sur les aptitudes des individus (essentiellement les rongeurs de laboratoire) à reconnaître et suivre les informations environnementales afin de retrouver leur environnement maternel habituel. Le parcours est caractérisé par un couloir de progression composé par un labyrinthe en T. A l'une des extrémités (base du T), la zone de départ est déterminée alors qu'aux autres extrémités du T (droite et gauche), deux zones d'arrivée ou de « sortie » du labyrinthe sont définies. Dans chacune de ces zones d'arrivée est déposé une quantité équivalente de litière soit fraîche, soit provenant de la cage maternelle d'élevage des jeunes individus testés. La répartition des deux type de litière est aléatoire (droite ou gauche en fonction des passages). Ce test est généralement effectué pendant la phase d'allaitement à partir du moment où l'activité exploratoire des individus commence à se développer (à partir de 5 jours post-natal).

1. Procédure

- Le dispositif est un labyrinthe en T présentant un couloir de 9 cm de large et 30 cm de hauteur et dont la longueur de la barre « verticale du T » est de 46 cm et de la « barre horizontale du T » est de 60 cm.
- Les individus sont testés un à un aux jours 5, 7 9, 11 et 14 après la naissance. Au moment du test, chaque zone d'arrivée reçoit la même quantité de litière soit fraiche, soit appartenant à la boite d'élevage de l'individu testé.
- Chaque individu est déposé dans le bras de départ et il est laissé libre de ces mouvements pendant un temps maximum de 5 minutes.
- Le labyrinthe est débarrassé de la litière et nettoyé à l'alcool 50-70% entre chaque rat.
- Les paramètres enregistrés sont la latence d'entrée dans le compartiment contenant la litière connue (entrée avec les quatre pattes dans le compartiment) et le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans le bras contenant la litière fraîche ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »). Si l'animal n'a pas rejoint le compartiment contenant la litière connue dans le temps imparti, il est retiré après 5 min (maximum de temps attribué).

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type pour le temps de latence et les erreurs en fonction des groupes expérimentaux. Un pourcentage d'échec peut être calculé avec les individus qui n'ont pas rejoint la litière connue dans le temps imparti. Plus le nombre total d'erreurs et la latence de sortie sont importants, moins les performances mnésiques sont importantes. Si une différence n'apparait que pour la latence de sortie, il convient d'effectuer un test d'activité locomotrice pour vérifier que les individus ne présentent pas de trouble locomoteur qui serait perturbateur pour l'analyse mnésique de ce test. Les structures cérébrales impliquées sont essentiellement le tractus olfactif, le cortex olfactif et l'hippocampe.

Fiche 48

LABYRINTHE EN MULTI-T

Principe : Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes. Il est basé sur les aptitudes des individus (essentiellement les rongeurs de laboratoire) à mémoriser un parcours dans lequel ils naviguent en fonction de repèrent environnementaux (non contrôlés par l'expérimentateur). Le parcours est caractérisé par un couloir de progression composé par l'enchainement linéaire de plusieurs labyrinthes en T « empilés » (en général 3 à 5) successivement et décalés les uns par rapport aux autres pour construire le parcours global. A l'une des extrémités, la zone de départ est déterminée alors qu'à l'autre extrémité, la zone d'arrivée ou de « sortie » du labyrinthe est définie. Ce parcours défini donc un tracé « idéal » dans lequel les individus ont une utilisation optimale de leurs ressources et des accès en « cul-de-sac » dans lesquels les individus perdent de l'efficacité comportementale. Afin de conserver une motivation optimale homogène chez tous les individus d'une étude, il est nécessaire de délivrer une récompense alimentaire aux animaux dès leur arrivée dans la zone de sortie du labyrinthe. Pour cela trois méthodes ; (i) soit les animaux sont préalablement (plusieurs semaines avant le test) habitués à recevoir une petite quantité (< une noisette par jour) de lait concentré sucré ou chocolat ou céréale sucré en flocon, (ii) soit les animaux sont maintenus à 90% de leur poids habituel deux semaines avant le test, (iii) soit les animaux sont mis à jeun 24 à 48 heures (en fonction de l'âge) avant chaque test. Dans ces deux derniers cas, les animaux reçoivent une croquette de leur aliment habituel lors de leur arrivée en zone de sortie et la termine dans leur cage d'élevage. Ce test peut être effectué à tous les âges à partir du moment où l'activité exploratoire des individus est bien développée (en général légèrement avant le sevrage chez les rongeurs).

1. Procédure

- Le dispositif est un labyrinthe constitué par l'assemblage successif de 5 modules en T identiques présentant chacun un couloir de 9 cm de large et 30 cm de hauteur et dont la longueur de la barre « verticale du T » est de 46 cm et de la « barre horizontale du T » est de 60 cm.
- Pour cette phase du test, les animaux sont mis à jeun 24 heures avant le début du test et passent dans le labyrinthe 1 fois par jour et cela pendant 5 jours consécutifs entre le 14 ème et le 18 ème jour post-natal. Les individus sont testés un à un.
- Au moment du test, chaque individu est déposé dans le bras de départ et il est laissé libre de ces mouvements. Leur motivation est renforcée à chaque essai, en leur permettant de manger un bouchon de nourriture dans la zone d'arrivée du labyrinthe.
- Les couloirs du labyrinthe sont nettoyés à l'alcool 70% entre chaque rat.

- Les paramètres enregistrés sont le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière ») et la latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée). Cette phase constitue la phase d'acquisition du parcours dite « d'apprentissage ».
- Par la suite, un test de réutilisation de l'acquisition dit « test de mémoire » peut être réalisé, par un seul passage dans le même dispositif, chaque mois (30 jours entre chaque essai – durée qui peut varier selon l'expérimentateur). Les mêmes paramètres que précédemment sont mesurés.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le nombre total d'erreurs et la latence de sortie sont importants, moins les performances mnésiques sont importantes. Si une différence n'apparait que pour la latence de sortie, il convient d'effectuer un test d'activité locomotrice pour vérifier que les individus ne présentent pas de trouble locomoteur qui serait perturbateur pour l'analyse mnésique de ce test.

Publications/Communications

Liste de publications

1- Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124.

Kerek R, Geoffroy A, Bison A, Martin N, Akchiche N, Pourié G, Helle D, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL.

Cell Death Dis. 2013 Aug 8;4:e755. doi: 10.1038/cddis.2013.278.

2- Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells.

Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, **Kerek R**, Martin N, Pourié G, Koziel V, Helle D, Alberto JM, Ortiou S, Camadro JM, Léger T, Guéant JL, Daval JL.

FASEB J. 2012 Oct;26(10):3980-92. doi: 10.1096/fj.12-205757. Epub 2012 Jun 19.

Participations à des congrès

Communications orales :

1- Kerek Racha, Geoffroy Andréa, Guéant Jean-Louis, Bossenmeyer-Pourié Carine, Daval Jean-Luc
Early Methyl Donor Deficiency Associated With Alteration Of The Mir-124 And Stat3 Signaling Pathways Impairs Embryonic Brain Development
9th International Homocysteine and One-Carbon Metabolism Conference, Dublin, Irlande, 8-12 septembre 2013

2- Kerek Racha, Nassila Akchiche, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
Impact d'une carence en folates sur la régulation épigénétique de la différenciation neuronale
Journée de la FR 3209 « Epigénétique, épigénomique et génomique intégrative », Nancy, 7 juin 2013

3- Kerek Racha, Geoffroy Andréa, Guéant Jean-Louis, Bossenmeyer-Pourié Carine, Daval Jean-Luc
Conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement du cerveau embryonnaire : Implication des voies miR-124 et Stat3
VIII ème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 24 mai 2013

4- Racha Kerek, Nassila Akchiche, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval, Carine Bossenmeyer-Pourié
Folate deficiency impairs hippocampal progenitor differentiation and synaptic plasticity
Colloque fondateur de la SF-DOHAD : Société francophone pour la recherche et l'éducation sur les origines développementales, environnementales et épigénétiques de la santé et des maladies, Paris, 8-9 novembre 2012

5- Kerek R., Pourié C., Akchiche N., Martin N., Helle D., Camadro J-M., Guéant J-L., Daval J-L.
Conséquences d'une carence en folates sur la différenciation neuronale et la plasticité synaptique: Homocystéinylation de protéines associées au cytosquelette
VII ème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 2 mars 2012

Communications affichées :

1- Kerek R, Bossenmeyer-Pourié C, Geoffroy A, Bison A, Guéant JL, Daval JL
Early methyl donor deficiency associated with alteration of the miR-124 and Stat3 signaling pathways impairs normal embryonic brain development
11e Colloque de la Société des Neurosciences (SN), Lyon, 21-23 mai 2013
Lauréat pour soutien des jeunes chercheurs de la SN française pour participation au congrès

2- Racha Kerek, Carine Pourié, Andréa Geoffroy, Anaïs Bison, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval
Early methyl donor deficiency associated with alteration of the Stat3 signaling pathways impairs normal embryonic brain development
Vitamin B12 symposium: 20-22 Septembre, 2012, Nancy, France

3- Racha Kerek, Nassila Akchiche, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval, Carine Bossenmeyer-Pourié
Folate deficiency impairs hippocampal progenitor differentiation and synaptic plasticity
Clinical Epigenetics Society (CLEPSO) International Meeting: 9-10 Mars, 2012, Homburg/Saar, Germany

4- Kerek R, Akchiche N, Daval JL, Guéant JL, BossenmeyerPourié C
Consequences of folate deficiency on neuronal differentiation and synaptic plasticity: Involvement of cytoskeletal proteins
10e Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, 26-29 mai 2011

5- Kerek R, Akchiche N, Daval JL, Guéant JL, BossenmeyerPourié C
Conséquences d'une carence en folates sur la différenciation neuronale et la plasticité synaptique : Implication des protéines du cytosquelette
VI ème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 17 décembre 2010
Prix de la meilleure présentation affichée

Résumé

Les donneurs de méthyles (B12 et folates) régulent le cycle des monocarbones qui joue un rôle primordial dans les régulations épigénétiques/épigénomiques par méthylation. Une carence en donneurs de méthyles produit un retard de croissance intra-utérine et favorise les anomalies du développement, principalement du système nerveux central. De plus, des taux élevés d'homocystéine associés à une telle carence constituent un facteur de risque pour diverses pathologies neurodégénératives. Nous avons étudié les conséquences d'une carence péri-conceptionnelle et gestationnelle sur le développement cérébral embryonnaire de rats Wistar. L'étude morphométrique a montré un retard de croissance des embryons carencés qui affectait également le cerveau, avec une atrophie de structures telles que l'hippocampe, le cortex et la zone subventriculaire. En raison de la forte sensibilité de l'hippocampe, les effets de la carence ont par ailleurs été étudiés sur un modèle cellulaire de progéniteurs neuronaux hippocampiques. L'utilisation de ces deux modèles a permis de montrer *in vivo* et *in vitro* la régulation négative par la carence de la voie Stat3, qui influence prolifération et survie, via une régulation épigénomique post-transcriptionnelle impliquant miR-124. La dérégulation du programme neurogénique impliquant les histones désacétylases affecte la différenciation cellulaire. Par ailleurs, nous avons démontré que la carence en donneurs de méthyles était associée à une modification post-traductionnelle correspondant à une N-homocystéinylation irreversible de protéines neuronales, en particulier associées au cytosquelette. Cette modification induit l'agrégation des protéines, phénomène impliqué dans de nombreuses maladies neurodégénératives. La combinaison de ces différents mécanismes apporte un éclairage nouveau sur les défauts de développement et les troubles cognitifs associés à une carence précoce en donneurs de méthyles, soulignant l'importance de la « programmation fœtale » dans la survenue de certaines pathologies neurologiques.

Mots clés : Folates, Vitamine B12, Homocystéine, Programme neurogénique, Epigénétique, Maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives.

Summary

Methyl donors (B12 and folate) regulate the one-carbon cycle that plays an important role in the epigenetic/epigenomic regulations by methylation. Methyl donor deficiency (MDD) leads to intrauterine growth retardation and promotes neurodevelopmental abnormalities. Also, high levels of homocysteine associated with such a deficiency are a risk factor for various neurodegenerative diseases. We have studied the consequences of a periconceptional and gestational deficiency on the development of the embryonic brain of Wistar rats. Morphometric studies showed retardation in the development of deficient embryos which also affected the brain, with an atrophy of some structures including hippocampus, cortex and subventricular zone. Given the high sensitivity of the hippocampus, the effects of MDD have been additionally studied in a cellular model of hippocampal neuronal progenitors. Using these two models, we showed both *in vivo* and *in vitro* the downregulation of Stat3 pathway regulating cell proliferation and survival, through an epigenomic post-transcriptional process involving miR-124. Disruption of the neurogenic program implying histone deacetylases was shown to alter cell differentiation. Furthermore, we showed that methyl donor deficiency was associated with a post-translational modification corresponding to an irreversible N-homocysteinylation of neuronal proteins, especially those associated with the cytoskeleton. Such a process leads to protein aggregation, a phenomenon involved in many neurodegenerative diseases. The combination of these different mechanisms provides new insights into developmental defects and cognitive impairment associated with an early MDD, highlighting the importance of "fetal programming" in the occurrence of some neurological diseases.

Keywords: Folate , Vitamin B12, Homocysteine, Neurogenic program , Epigenetics, Neurodevelopmental and neurodegenerative diseases.