



HAL
open science

Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation cellulaire, la survie et la neuroplasticité: approches mécanistiques in vitro sur des lignées neuronales

Nassila Akchiche

► **To cite this version:**

Nassila Akchiche. Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation cellulaire, la survie et la neuroplasticité: approches mécanistiques in vitro sur des lignées neuronales. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT: 2009NAN10122 . tel-01748296

HAL Id: tel-01748296

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748296v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

UFR de Médecine

Ecole doctorale Biologie Santé Environnement

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Mention : Biologie cellulaire – Nutrition

Par

Nassila AKCHICHE

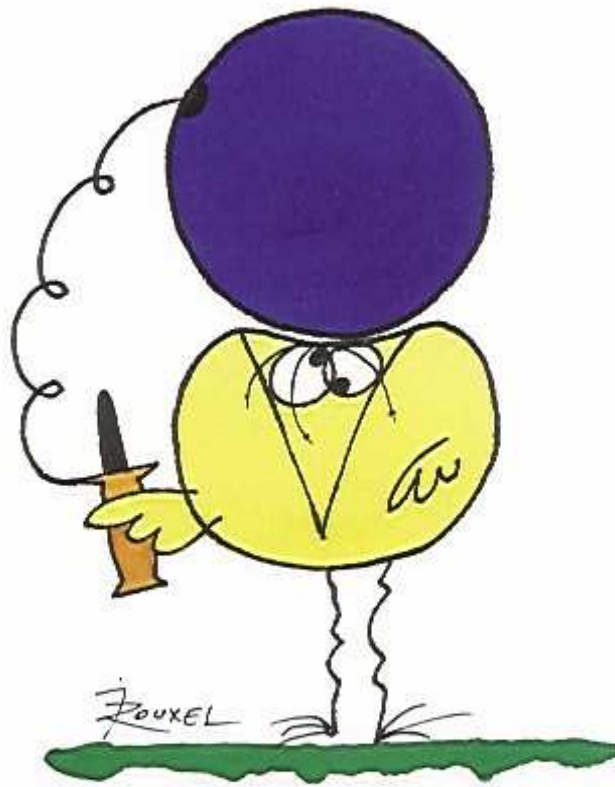
Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation cellulaire, la survie et la neuroplasticité: approches mécanistiques *in vitro* sur des lignées neuronales

Le 09 Novembre 2009

Membres du jury :

Rapporteurs :	Tobias HEVOR	Professeur des Universités, Orléans
	Bernard SABLONNIERE	PU-PH, Lille 2
Examineurs :	William ROSTENE	Directeur de Recherche, Inserm U968, Paris
	Jean-Luc DAVAL	Directeur de Recherche, Inserm U954, Nancy I (Directeur de thèse)
	Jean-Louis GUEANT	PU-PH, Nancy I
	Carine BOSSENMEYER-POURIÉ	Maître de Conférences, Nancy I (Co-encadrant)

Les devises Shadok



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

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
AVANT-PROPOS	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
<u>Chapitre I</u> : Donneurs de groupements méthyles et homocystéine	11
I. Métabolisme de l’homocystéine.....	11
I.1. La voie de méthylation (cycle de la méthionine)	13
I.1.1. Homocystéine et potentiel de méthylation.....	13
I.1.2. Rapport SAM/SAH : point de contrôle du métabolisme de l’homocystéine.....	14
I.2. La voie de transsulfuration	14
II. L’homocystéine circulante	15
II.1. Les différentes formes physicochimiques de l’homocystéine circulante	15
II.2. Facteurs favorisant une hyperhomocytéinémie	17
II.2.1. Les facteurs environnementaux	17
II.2.2. Les facteurs nutritionnels.....	18
II.2.2.1. Les folates (vitamine B9).....	20
II.2.2.2. La vitamine B12	22
II.2.2.3. La vitamine B6	25
II.2.3. Les facteurs génétiques	26
II.2.3.1. Polymorphismes du gène MTHFR : <i>C677T, A1298C, T1317C</i>	27
II.2.3.2. Polymorphismes des gènes MTR : <i>A2756G</i> et MTRR : <i>A66G</i>	28
II.2.3.3. Polymorphismes du gène CBS : <i>T383C, G919A</i>	28
II.2.3.4. Polymorphismes du gène TCN : <i>C776G</i>	28
III. Pathologies associées à l’homocystéine	29
III.1. Homocystéine et dysfonction vasculaire	29
III.1.1. Homocystéine et diminution de la fonction de thromborésistance endothéliale	29
III.1.2. Homocystéine et lésions endothéliales	29
III.2. Homocystéine et insulino-résistance	30
III.3. Homocystéine et stéatose	31
III.4. Homocystéine et pathologies du développement	31
III.4.1. Pathologies gravidiques	31
III.4.2. Pathologies développementales	32
III.5. Homocystéine et pathologies liées au vieillissement cérébral.....	33
III.5.1. Maladie d’Alzheimer	33
III.5.2. Maladie de Parkinson	34

CHAPITRE II : Développement cérébral et pathologies associées à l'homocystéine	35
I. Développement du SNC et cellules souches neurales	35
I.1. Généralités sur le développement du système nerveux	35
I.2. Précurseurs neuronaux et gliaux au cours du développement du SNC	38
I.3. Mise en place des lignages cellulaires à partir du SNC	39
I.4. Maturation cérébrale : différenciation des cellules souches nerveuses fœtales humaines	41
I.5. Cellules souches neurales adultes	42
I.6. Plasticité des cellules souches neurales	44
I.6.1. Potentialité des CSN pour la régénération du SNC	44
I.6.2. Les greffes de CSN fœtales humaines	45
I.7. Modèles d'études	46
I.7.1. Cellules du cordon ombilical	46
I.7.2. Neurosphères	47
I.7.3. Lignée H19-7/IGF-IR	48
I.7.4. Cellules issues de neuroblastomes	49
II. Pathologies du développement du cerveau en lien avec l'homocystéine	50
II.1. Effets cellulaires de l'homocystéine	50
II.1.1. Stress oxydant	50
II.1.2. Apoptose	51
II.1.2.1. La voie extrinsèque des récepteurs de mort	51
II.1.2.2. La voie intrinsèque mitochondriale	55
II.1.2.3. La voie du réticulum endoplasmique	63
II.2. Pathologies cérébrales au cours du développement	65
II.2.1. Malformations du tube neural : le <i>spina bifida</i>	66
II.2.2. Les fentes labio-maxilo-palatines	67
III. Voies de signalisation mises en jeu	69
III.1. Le cycle cellulaire	69
III.1.1. Généralités	69
III.1.2. Complexes Cyclines/Cdk	69
III.1.3. Régulateurs de la progression du cycle cellulaire	71
III.1.3.1. Les protéines p16, p21, p27, p53	71
III.1.3.2. La protéine PP2A	72
III.2. Régulation de la survie cellulaire	74
III.2.1. PI3Kinase/AKT	74
III.2.2. MAPKinases	76
III.2.2.1. ERK 1/2	77
III.2.2.2. La voie de signalisation JNK et p38	81
III.2.3. Le récepteur p75 ^{NTR}	82
IV. Modèles expérimentaux d'étude de l'homocystéine	84
IV.1. Modèles génétiques	84
IV.1.1. Modèles de souris CBS knockout	85
IV.1.2. Autres modèles de souris transgéniques impliquant le cycle de reméthylation	87
IV.2. Modèles nutritionnels	88
IV.2.1. Modèles nutritionnels déficients en précurseurs méthylés	89
IV.2.2. Modèles nutritionnels conduisant à une hyperhomocystéinémie	89
IV.2.3. Modèles combinés cbs+/- et régimes hyperhomocystéinémiant	91
IV.2.4. Modèles <i>Folbp1</i> ^{+/-} et <i>Folbp1</i> ^{-/-}	91

OBJECTIFS DE L'ETUDE	92
RESULTATS	94
<u>1^{ère} PARTIE</u> : Etude du devenir des progéniteurs de l'hippocampe H19-7 Différenciation et intégration neuronale : analyse des voies de signalisation impliquées	94
I. Objectifs de l'étude.....	94
II. Publication #1.....	94
III. Synthèse de la publication.....	95
<u>2^{ème} PARTIE</u> : Etude d'un déficit en folate sur la prolifération, la différenciation et la plasticité synaptique des progéniteurs neuronaux de l'hippocampe.....	98
I. Objectifs de l'étude.....	98
II. Publication #2.....	98
III. Synthèse de la publication.....	131
<u>3^{ème} PARTIE</u> : Effets d'une carence en vitamine B12 obtenue par transfection stable de la protéine chimère Transcobalmine II-Oléosine sur la prolifération et la différenciation des cellules de neuroblastome NIE-115	135
I. Objectifs de l'étude.....	135
II. Publication #3.....	138
III. Synthèse de la publication.....	166
CONCLUSION ET PERSPECTIVE	168
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	176
FICHES TECHNIQUES	195
Fiche 1 : Lignée H19-7/IGF-IR - Conditions de culture	195
Fiche 2 : Lignée NIE-115- Conditions de culture.....	196
Fiche 3 : Cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat (E19)	197
Fiche 4 : Cultures primaires de neurones de cortex d'embryons de rats (E19)	199
Fiche 5 : Décongélation des lignées	200
Fiche 6 : Repiquage des lignées.....	201
Fiche 7 : Congélation des lignées	202
Fiche 8 : Détection des cellules en mitose par incorporation du BrdU	203
Fiche 9 : Co-cultures : ensemencement de la lignée H19-7/IGF-IR sur des cultures primaires issues de l'hippocampe ou du cortex de rats	204
Fiche 10 : Test de viabilité cellulaire : méthode d'exclusion au Bleu Trypan	205
Fiche 11 : Test de viabilité cellulaire (Réduction mitochondriale du MTT)	206

Fiche 12 : Test de viabilité cellulaire ATPLite.....	207
Fiche 13 : Test de viabilité cellulaire ATPLite en présence d'inhibiteurs	208
Fiche 14 : Marquage immunocytochimique	209
Fiche 15 : Marquage immunocytochimique : technique MitoCapture™	212
Fiche 16 : Marquage immunocytochimique : Marquage à l'Apostain Anticorps anti-ADNsb/Apostain®	213
Fiche 17 : Extraction des protéines cytosoliques pour l'étude par Western-Blot.....	214
Fiche 18 : Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)	215
Fiche 19 : Electrophorèse analytique des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)	216
Fiche 20 : Coloration des protéines après électrophorèse sur gel de polyacrylamide	218
Fiche 21 : Transfert des protéines sur membrane de PVDF	219
Fiche 22 : Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase	221
Fiche 23 : Extraction des ARN par le TRIZOL.....	223
Fiche 24 : Extraction des ARN avec le Kit RNeasy® avec traitement à la Dnase I	224
Fiche 25 : Quantification des ADN ou ARN	225
Fiche 26 : Transcription inverse des ARN (RT).....	226
Fiche 27 : RT-PCR semi-quantitative en temps réel	227
Fiche 28 : Analyse qualitative de l'ADN sur gel d'agarose	231
Fiche 29 : Extraction des protéines cytosoliques.....	232
Fiche 30 : Dosage vitamine B12/B9	233
Fiche 31 : Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique	234
Fiche 32 : Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR.....	236
Fiche 33 : Mesure de l'activité de la Méthylènetétrahydrofolate Réductase, MTHFR.....	237
Fiche 34 : Mesure de l'activité enzymatique de la cystathionine-β-synthase (CBS).....	239
Fiche 35 : Mesure de la concentration des métabolites SAM et SAH à partir d'homogénats cellulaires	240
Fiche 36 : Choix du plasmide de clonage	243
Fiche 37 : Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	244
Fiche 38 : Purification des produits PCR.....	246
Fiche 39 : Coupure de l'ADN par une enzyme de restriction	247
Fiche 40 : Extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique des ADN.....	248
Fiche 41 : Ligature de fragments de restriction dans le vecteur pcDNA3.....	249
Fiche 42 : Transformation des bactéries	250
Fiche 43 : Sélection des bactéries transformées par le plasmide recombinant.....	251
Fiche 44 : Méthode pour isoler rapidement l'ADN plasmidique pour le criblage de clones bactériens	252
Fiche 45 : Purification de petites quantités d'ADN plasmidique par un Mini-kit.....	253
Fiche 46 : Purification de grandes quantités d'ADN plasmidique avec un Midi-kit ou un Maxi-kit	254
Fiche 47 : Séquençage automatique de l'ADN par technique fluorescente	255
Fiche 48 : Mise en souche de culture bactérienne	256
Fiche 49 : Transfection transitoire de cellules NIE-115 par le pcDNA3-TCII-oléosine, pcDNA3-oléosine-TCII, avec l'Exgen	257
Fiche 50 : Détection de l'activité lactase in situ avec le X-Fuc comme substrat.....	258
Fiche 51 : Dosage et détection de l'activité β-galactosidase	259
Fiche 52 : Liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée à partir de cellules	260
Fiche 53 : Transfection stable de cellules NIE-115 par le pcDNA3-TCII-oléosine, pcDNA3-oléosine-TCII, avec l'Exgen	261
Fiche 54 : Isolement des clones par anneaux de clonage	

TRAVAUX ET PUBLICATIONS	263
PARTICIPATIONS AUX CONGRES.....	264
COMMUNICATIONS ORALES	264
COMMUNICATIONS AFFICHEES.....	264

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Métabolisme de l'homocystéine	12
Figure 2 : Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain	16
Figure 3 : Cycle des folates	21
Figure 4 : Structure de la vitamine B12 ou cobalamine	22
Figure 5 : Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine pour lequels des polymorphismes associés à une hyperhomocystéinémie ont été décrits.....	27
Figure 6 : Neurulation de l'embryon de mammifère.....	36
Figure 7 : Schéma des vésicules cérébrales.....	37
Figure 8 : Représentation théorique de la production des différents lignages à partir des cellules souches neurales	40
Figure 9 : Organisation de la couche sous-granulaire (SGL) dans le gyrus denté de l'hippocampe adulte	43
Figure 10 : La voie extrinsèque de l'apoptose ou voie des récepteurs de mort	53
Figure 11 : La formation de l'Apoptosome et son inactivation	57
Figure 12 : Les principales caspases impliquées dans l'apoptose.....	58
Figure 13 : La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale.....	60
Figure 14 : Structure des membres de la famille Bcl-2	63
Figure 15 : Contrôle du cycle cellulaire par les cyclines et Cdk.....	70
Figure 16 : La voie de signalisation Raf/MAPK.....	81
Figure 17 : Niveau d'Hcy plasmatique chez les souris CBS KO âgées de 21 jours	86
Tableau 1 : Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine.....	17
Tableau 2 : Facteurs favorisant une hyperhomocystéine	18

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AdoCbl	Adénosylcobalamine
AdoMet	Sulfonium AdénosylMéthionine
ANC	Apports nutritionnels conseillés
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	BiCinchoninic Acid
BET	Bromure d'éthydiium
BHMT	Bétaïne-Homocystéine méthyltransférase
bp	<i>base pair</i> - paire de base
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumine de sérum bovin
Cbl	Cobalamine ou vitamine B12
Cbl(I), (II), (III)	Cobalamine au degré d'oxydation (I), (II) ou (III)
CBS	Cystathionine-β-synthase
Ci	Curie
CNCbl	Cyanocobalamine
CoA	Coenzyme-A
cpm	coups par minute
CSN	Cellule souche neuronale
Da	Dalton
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate réductase
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i> - ADN méthyltransférase
DTT	Dithiotréitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FAD	Flavine adéninedinucléotide oxydé
FADH₂	Flavine adéninedinucléotide réduit
FI	Facteur intrinsèque
FMN	Flavine mononucléotide oxydé
FMNH₂	Flavine mononucléotide réduite
GSH	Glutathion réduit
GSH total	Glutathion total
GSK-3β	<i>Glycogen synthase kinase-3</i>
GSSG	Glutathion oxydé
Hcy	Homocystéine
hHcy	Hyperhomocystéinémie
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> - Chromatographie liquide à haute performance
kDa	Kilo Dalton
Ki	Constante d'inhibition
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAT	Méthionine adénosyltransférase
MeCbl	Méthylcobalamine
MéthylèneTHF	Méthylènetétrahydrofolate
MéthylTHF	Méthyltétrahydrofolate
MMA	<i>Methylmalonic acid</i> - Acide méthylmalonique
MMCoA	Méthylmalonylcoenzyme A
MTHFR	Méthylènetétrahydrofolate réductase

MTR	Méthionine synthase
MTRR	Méthionine synthase réductase
NAD⁺	Nicotinamide adéninedinucléotide oxydé
NADH,H⁺	Nicotinamide adéninedinucléotide réduite
NADP	Nicotinamide adéninedinucléotide phosphate oxydé
NADPH,H⁺	Nicotinamide adéninedinucléotide phosphate réduite
NMDA	N-Méthyl-D-aspartate
OHcbl	Hydroxocobalamine
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEMT	Phosphatidyléanolamine méthyltransférase
PI3-K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PLP	Phosphate de pyridoxal (vitamine B6)
PP2A	Protein phosphatase 2A
PSD95	<i>Post-Synaptic Density protein 95</i>
Qsp	Quantité Suffisante Pour
RE	Réticulum endoplasmique
RFC	Récepteur cellulaire aux folates
RIA	<i>Radioimmuno assay</i>
RNase	Ribonucléase
ROS	<i>Reactive oxigen species</i>
RT	<i>Reverse transcription</i> - Transcription inverse
SAH	Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine
SAHH	Sulfonium-adénosyl-L-homocystéine hydrolase
SAM	Sulfonium-adénosyl-L-méthionine
SDS	Sodium dodécylsulfate
SNC	System nerveux central
SOD	Superoxide dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TC II	Transcobalamine II
THF	Tétrahydrofolate
Western blot	Détection des protéines par immuno-empreinte
ZSV	Zone sub-ventriculaire
$\Delta\Psi_m$	Potentiel mitochondrial

AVANT-PROPOS

Les carences en folates (vitamine B9) et en vitamine B12 font partie des priorités affichées par l'OMS dans la prise en charge en santé publique des carences nutritionnelles. En effet, cette organisation tente de sensibiliser l'opinion publique sur les méfaits d'une carence vitaminique, notamment au cours de la période sensible que représente le développement. De façon générale, un défaut de l'apport en vitamine B12 ou en folates engendre une élévation de l'homocystéine, acide aminé qui s'avère toxique pour les cellules lorsqu'il est présent en trop grande quantité. De nombreuses études sont venues documenter le fait qu'une élévation des taux d'homocystéine est associée à la survenue de diverses pathologies au niveau cardiovasculaire (athérosclérose, accident vasculaire, anémie...), du système nerveux central (maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, troubles psychiatriques...), ou encore du système digestif (stéatose hépatique, maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)...).

Au cours de la grossesse, un taux élevé d'homocystéine favorise chez la mère des anomalies du placenta ou le risque de thrombose artério-veineuse, et chez l'enfant des risques de prématurité, de retard de croissance, et de malformations neurologiques.

C'est en 1962, que Carlson et Neil ont publié des travaux établissant un lien entre une anomalie du métabolisme des folates, des cobalamines (substrats monocarbonés), de l'homocystéine et une diminution des performances intellectuelles, des signes de démence ainsi que des troubles neurologiques.

Les vitamines B9 et B12 jouent un rôle essentiel dans l'hématopoïèse, les divisions cellulaires ainsi que dans la mise en place et l'intégrité du système nerveux central (SNC), en raison de leur rôle capital dans la synthèse et la méthylation de l'ADN. Les folates revêtent une importance particulière dans le développement du fœtus. Des études cliniques ont confirmé la relation entre des états marginaux de folates chez la femme et l'occurrence d'avortement spontané et de malformations du tube neural (*Neural tube Defect :NTD*). Une diminution du risque de survenue de ces anomalies a été observée suite à une supplémentation en folates pendant la période périconceptionnelle.

Si les travaux réalisés *in vivo* ont fourni des résultats précieux quant à la physiopathologie de la carence nutritionnelle, notamment au cours du développement, et plus particulièrement du développement cérébral, ces modèles n'apparaissent cependant pas toujours adaptés pour l'étude des mécanismes impliqués, notamment en raison de la complexité intrinsèque du cerveau *in situ* et de la diversité des phénotypes cellulaires qui présentent des susceptibilités variables à leur environnement. Afin d'explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la

réponse des neurones centraux à la carence en vitamine B12 et en folates, il nous est donc paru indispensable de mettre en place des modèles pertinents.

Nous avons de ce fait développé deux modèles cellulaires originaux. Compte tenu de la forte sensibilité de l'hippocampe à l'accumulation de l'homocystéine, nous avons été incités à choisir une lignée de progéniteurs neuronaux issus de l'hippocampe d'embryons de rat, la lignée H19-7 IGF-IR. Après avoir caractérisé ce modèle, qui présente l'intérêt de ne pas être originaire de cellules transformées, nous avons étudié les conséquences d'une carence en folate. L'obtention d'une déficience sévère en vitamine B12 étant particulièrement difficile, le second modèle correspond à un projet innovant visant à préciser les mécanismes par lesquels la déficience en vitamine B12 (Cobalamine) affecte les neurones à l'aide d'un outil produisant une déplétion en cobalamine dans une lignée cellulaire issue de neuroblastome de souris, la lignée NIE-115. Ainsi, les cellules ont été modifiées par transfection stable d'une protéine chimère contenant le transporteur plasmatique de la vitamine B12, la transcobalamine II, et une protéine d'ancrage membranaire, afin de séquestrer la vitamine B12.

Chapitre I : Donneurs de groupements méthyles et homocystéine

I. Métabolisme cellulaire de l'homocystéine

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré non protéinogénique, formé au niveau intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le catabolisme de l'homocystéine se produit principalement dans le foie et dans les reins par deux voies: la voie de la reméthylation et la voie de la transsulfuration.

D'un point de vue métabolique, l'homocystéine est le substrat de plusieurs enzymes qui peuvent modifier la balance redox intracellulaire (Glutathion-homocystine oxydoréductase, Paraoxonase), enclencher son catabolisme (Cystathionine β -synthase) ou au contraire l'utiliser comme précurseur de la méthionine (Méthionine synthase et Bétaïne-homocystéine méthyltransférase) (Figure 1)

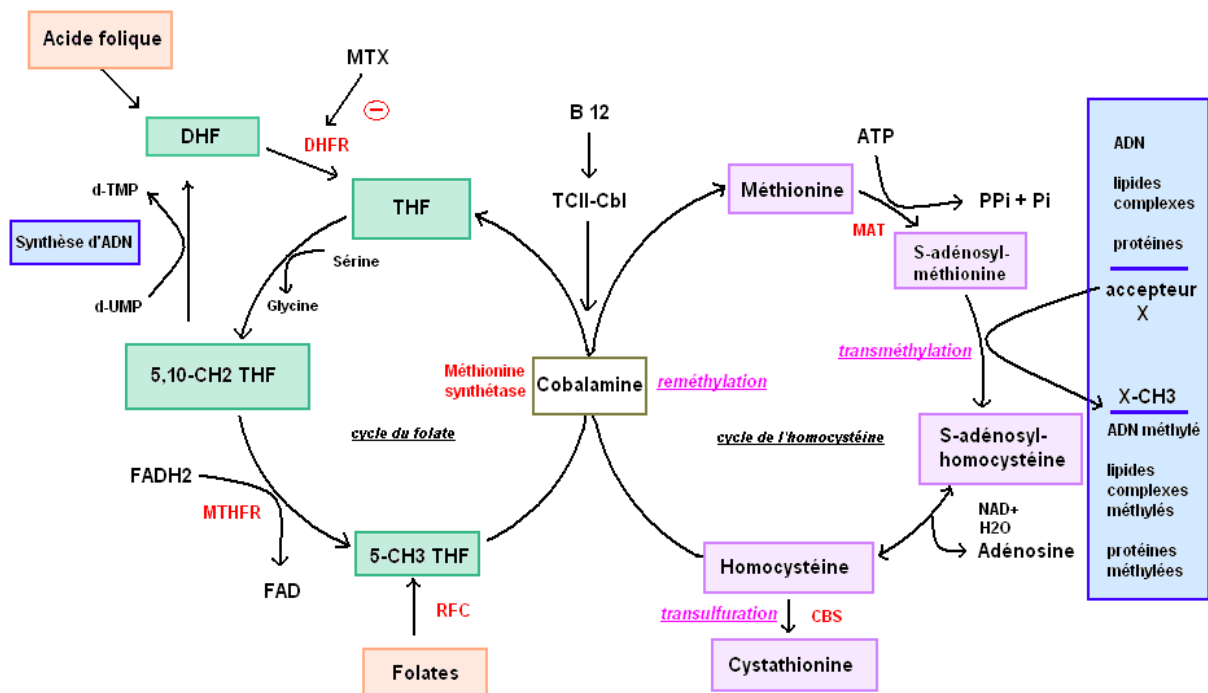


Figure 1 : Métabolisme de l'homocystéine

CBS : Cystathionine β -synthase, **MAT** : Méthionine adénosyl-transférase, **THF** : Tétrahydrofolate, **DHF** : Dihydrofolate, **MTX** : Méthotrexate, **MTHFR** : Méthylène tétrahydrofolate réductase, **DHFR** : Dihydrofolate réductase, **RFC** : Reduced Folate Carrier, **TCII-Cbl** : Trans-CobalamineII-Cobalamine, **5-CH3 THF** : 5-Méthyltétrahydrofolate, **ATP** : Adénosine Tri-Phosphate, **FAD** : Flavine-Adénine-Dinucléotide, **d-UMP** : désoxy-uracidylnucléotide, **d-TMP** : désoxy-thymidine monophosphate

La reméthylation de l'homocystéine pour former de la méthionine est catalysée par une enzyme ubiquitaire: la méthionine synthase (MTR, E.C.2.1.1.13) dont le cofacteur est la vitamine B12. La méthylène tétra-hydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la synthèse du méthyltétrahydrofolate, qui est le donneur de groupements méthyles de la réaction précédente.

Cette enzyme utilise la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme cofacteur. Comme la méthionine synthase, la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT, E.C.2.1.1.5) catalyse la reméthylation de l'homocystéine en méthionine, mais en utilisant la bétaine, et non le méthyltétrahydrofolate comme donneur de méthyle. La bétaine provient de l'alimentation, comme les fruits de mer et les céréales ou l'oxydation de la choline. La BHMT est moins importante que la MTR car la BHMT n'est exprimée chez l'homme qu'au niveau du foie et du rein (Sunden et al. 1997).

La méthionine adénosyl transférase (MAT, E.C.2.5.1.6) catalyse la synthèse de S-adenosyl-méthionine (SAM) à partir d'ATP et de méthionine. Tous les organismes possèdent une ou deux des trois isoformes de la MAT: MATI, MATII et MATIII (Chamberlin et al. 2000).

La S-adenosyl-méthionine est le donneur universel de groupements méthyles nécessaires au maintien de la méthylation cellulaire: ADN, ARN, protéines, lipides... Ce transfert du groupement méthyle, qui est catalysé par des méthyltransférases, induit la synthèse de S-adenosylhomocystéine (SAH).

La SAM joue aussi un rôle dans la régulation du métabolisme de l'homocystéine. SAM est un effecteur allostérique de la cystathionine β -synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22). La fixation de la SAM sur le domaine de régulation de la CBS pourrait ne pas être coopérative ; cependant, cette liaison favorise un changement de conformation de l'enzyme, libérant le site actif (Janosik et al. 2001). L'augmentation de SAM va provoquer un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme, i.e. l'activation de la voie de transsulfuration. La SAM est aussi un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyltétrahydrofolate. A l'inverse, la SAH dont la structure est très proche de la SAM, est un antagoniste de la SAM et empêche le positionnement correct de la SAM sur sa protéine cible.

La S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH, E.C.3.3.1.1) catalyse la réaction de conversion de la SAH en homocystéine et en adénosine. C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine. Elle est plus en faveur de la synthèse de SAH que de la synthèse de l'homocystéine.

I.1. La voie de méthylation (cycle de la méthionine)

La reméthylation de l'homocystéine pour former la méthionine se fait selon deux réactions enzymatiques distinctes. La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la 5,10-méthylène tétra-hydrofolate réductase réductase (MTHFR), et la Méthionine Synthase (MTR) (ou MS). Cette dernière enzyme est présente dans tous les organismes cellulaires, mais chez les procaryotes, la MTR est cobalamine-indépendante. Chez les eucaryotes, en revanche, la MTR requiert pour son activité un cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine (MeCbl), forme active de la vitamine B12. Ce transfert du groupe méthyle, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est donc possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12 (Oltean et Banerjee, 2003).

La deuxième réaction se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité, et fait intervenir une enzyme hépatique, la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT), la bétaine étant la molécule donneuse de groupement méthyle.

Si la MTR est une enzyme ubiquitaire chez les mammifères, son expression n'est pas égale dans tous les tissus. En effet, des analyses par *Northern blot* (Chen et al. 1997, Matthews et al. 2001). ont montré que la MTR est exprimée principalement dans le cœur, le pancréas, le muscle squelettique, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires et l'intestin grêle. Elle est exprimée moyennement au niveau de la rate, du placenta et du cerveau, et faiblement dans les poumons, le foie, les reins et le colon.

Ainsi, l'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie en fonction du tissu considéré et du statut protéique. En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transulfuration est favorisée ; à l'inverse, en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine.

I.1.1. Homocystéine et potentiel de méthylation

Comme cela a été évoqué précédemment, l'homocystéine est un précurseur des réactions de méthylation qui débutent par la production de méthionine pour aboutir finalement à la synthèse de SAM. L'homocystéine est un facteur limitant dans la synthèse de SAM et peut conditionner directement la production de SAM. C'est donc un déterminant de la disponibilité en substrat méthylé pour les différentes méthyltransférases cellulaires (ADN méthyltransférases, Phosphatidyléthanolamine méthyltransférases, *etc.*) (Mato et al. 1997).

I.1.2. Rapport SAM/SAH : point de contrôle du métabolisme de l'homocystéine

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'homocystéine. A l'inverse, la SAH dont la structure est très proche de la SAM, va jouer un rôle antagoniste en empêchant le positionnement correct de la SAM sur sa protéine cible. La SAM est un effecteur allostérique de la CBS, un homotétramère dont la vitesse de catalyse peut être décuplée en présence de SAM. L'augmentation de SAM, et donc du potentiel de méthylation, va se traduire par un basculement du métabolisme de l'homocystéine vers son catabolisme, *i.e.* l'activation de la voie de transsulfuration. Cette logique est corrélée au fait que la SAM est aussi un inhibiteur allostérique de la MTHFR, empêchant ainsi la reméthylation de l'homocystéine par une diminution de la synthèse de méthyltétrahydrofolate. Ce dernier est le co-substrat dans la réaction de transméthylation de l'homocystéine par la MTR et une diminution de la quantité de substrat va aboutir à une baisse de l'activité enzymatique (Kutzbach and Stokstad, 1971) (Finkelstein et al., 1998).

I.2. La voie de transsulfuration

L'homocystéine est un élément indispensable au recyclage de la méthionine et des folates, mais dans des contextes nutritionnels particuliers (excédant de protéines alimentaires, déficience en folates ou vitamine B12), ce recyclage n'est plus assuré. L'homocystéine est exportée dans le sang mais a tendance à s'accumuler. L'élimination par les urines n'est pas suffisante et il est donc nécessaire de dégrader cet acide aminé. Cela permet dans le même temps de produire de la cystéine et ainsi de pallier les besoins immédiats.

Il n'existe qu'une seule voie de catabolisme de l'homocystéine chez les mammifères, c'est celle de la transsulfuration qui est amorcée de manière irréversible par la Cystathionine β -synthase (CBS, EC 4.2.1.22), une enzyme cytosolique, PLP-dépendante (Phosphate de pyridoxal, dérivé de la vitamine B6). Cette enzyme catalyse des réactions de β -remplacement entre la L-sérine, la L-cystéine, des cystéines-thioéthers, ou d'autres α -L-acides aminés β -substitués, ainsi qu'une variété de mercaptans. Biologiquement, la CBS est principalement impliquée dans les réactions de condensation de sérine sur l'homocystéine.

Contrairement aux autres voies métaboliques, cette dernière est irréversible, ce qui a pour conséquence que la cystéine ne peut être un précurseur pour la synthèse de méthionine. Ce fait revêt surtout une importance dans le cadre de recommandations diététiques.

A l'exception des astrocytes (Huang et al. 2005), cette enzyme, et de ce fait l'activité de cette voie de transsulfuration, se distribue de façon hétérogène dans l'organisme ; elle est présente dans les tissus nécessitant une forte concentration en glutathion (régulateur intracellulaire du statut redox), comme le foie ou les neurones.

II. L'homocystéine circulante

II.1. Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulante

Le plasma humain contient des quantités réduites et oxydées d'homocystéine (McCully et al., 1975). Des définitions chimiques ont été établies par Butz et du Vigneaud il y a plus de 70 ans (1932). Le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle homocystéine et le bisulfure ou la forme oxydée s'appelle homocystine. Les formes du bisulfure existent également avec la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines). Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom des disulfides mélangés. L'homocystéine libre ne compose que 1%-2% de l'homocystéine totale (tHcy). Les formes oxydées d'homocystéine représentent habituellement 98-99% de l'homocystéine totale dans le plasma humain, 80-90% sont liées aux protéines (McCully et al., 1975, Mudd et al., 2000). L'homocystéine totale est donc la somme de toutes les formes d'homocystéine présentes dans le plasma ou sérum.

L'homocystéine thiolactone (HTL), un thioester cyclique de l'homocystéine représente 0,3% et 28% de l'homocystéine totale, respectivement dans le plasma et l'urine. L'homocystéine peut également se lier aux protéines par liaison amidé (N-Hcy-protéine). N-Hcy-hémoglobine et N-Hcy-albumin constituent respectivement 75% et 22% de N-Hcy-protéine totale (Jakubowski et al., 2006).

Lorsqu'on mesure la concentration de l'homocystéine, tous les ponts disulfures sont réduits par un agent réducteur et toutes les homocystéines sous la forme de ponts disulfures passeront sous forme libre. Donc le terme homocystéine totale est la somme de l'homocystéine libre et liée par le pont disulfure. L'homocystéine totale ne compte pas l'homocystéine thiolactone (HTL) et l'homocystéine liée aux protéines par le pont amidé (N-Hcy-protéine), car cette liaison résiste au réactif réducteur, HTL et N-Hcy-protéine ne peuvent pas être réduits en homocystéine libre (Figure2)

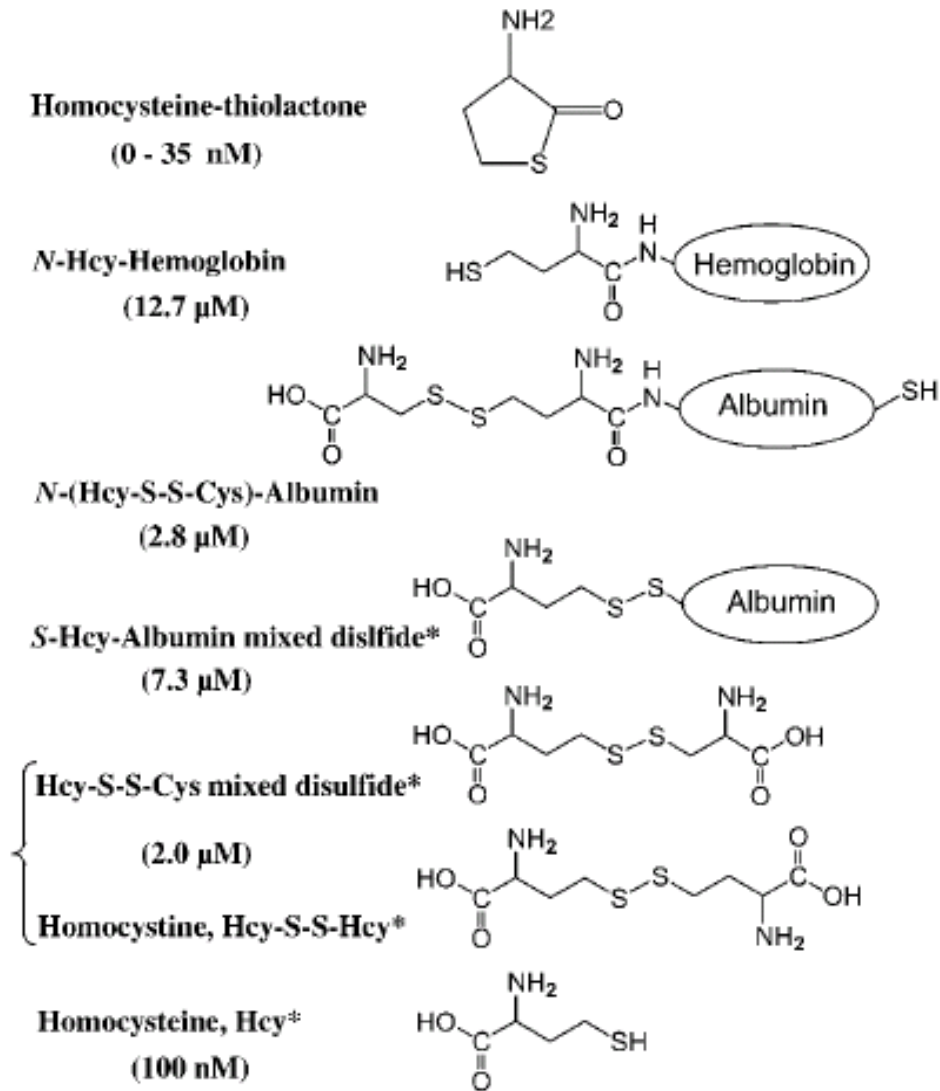


Figure 2 : Différentes formes de l'homocystéine dans le plasma humain.
(d'après Jakubowski et al., 2006)

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en homocystéine dans le plasma « des adultes en bonne santé » est 5–15 $\mu\text{mol/L}$ (Tableau1) (Ueland et al., 1993).

	Homocystéine $\mu\text{mol/L}$
Normal	5 – 15
Souhaitable	< 10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 – 25
Intermédiaire	26 – 50
Sévère	> 50

Tableau 1 : Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine

II.2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

II.2.1. Les facteurs environnementaux

En plus des facteurs qui contribuent à une hyperhomocystéinémie modérée, incluant l'âge et le sexe : les hommes ont une homocystéine plus élevée que les femmes, due à une plus grande masse musculaire ou aux effets des hormones sexuelles (Anderson et al., 1992), une élévation du taux plasmatique d'homocystéine peut être observée dans différentes conditions pathologiques comme l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, les affections inflammatoires (notamment intestinales), l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (sein, ovaire, pancréas) (DeBree et al., 2002). L'hyperhomocystéinémie modérée peut être liée à la prise de certains médicaments comme c'est le cas par exemple de la prise de méthotrexate, de carbamazépine qui interfèrent avec le métabolisme des folates, le monoxyde d'azote, qui inactive la vitamine B12, ou l'azaribine qui empêche l'activité de la CBS (Ueland et al., 1992).

Les contraceptifs, la pénicillamine ou les oestrogènes oraux diminuent l'homocystéine. Mais d'une manière générale, des suppléments en folates et/ou en vitamine B12 sont suffisants pour abaisser le taux d'homocystéine (Ueland et al., 1989).

Par ailleurs, l'usage chronique de tabac ou d'alcool favorise l'hyperhomocystéinémie. Ainsi, une hyperhomocystéinémie chez les sujets alcoolodépendants a été décrite pour la première fois par (Hultberg et al., 1993). Elle serait due à une altération du métabolisme de l'homocystéine par

l'alcool. Il existe, chez ces sujets, une corrélation entre l'hyperhomocystéinémie et le statut en vitamines B12, B6 et folates (Cravo et al., 2000). D'autres auteurs, comme Barak et al., 1988 et 1985), suggèrent que la consommation chronique d'éthanol pourrait modifier la reméthylation de l'homocystéine. En effet, l'alcool engendre une réduction significative de l'activité de la MTR suivie d'une augmentation de l'activité de la BHMT. Le mécanisme précis de la consommation de l'éthanol sur l'inhibition de la MTR n'est pas encore élucidé ; néanmoins, en regard de l'étude de Cravo ML et al., (1996), il est possible que cette baisse soit associée à la baisse de la vitamine B12 ou de folates, modifiant ainsi le taux d'ARNm de la méthionine synthase (Kenyon et al., 1998).

Carences vitaminiques	Carences en folates Carences en cobalamine Carences en vitamine B6
Déficiences enzymatiques	Déficite de la CBS Déficite de la MTHFR
Pathologies	Insuffisance rénale / Cancer Maladies inflammatoires chroniques intestinales Maladies neurodégénératives Maladies cardio-vasculaires Perturbations endocriniennes
Médicaments	Methotrexate NO Phénytoin Anti-diabétiques oraux L-Dopa
Changements physiologiques	Age Sexe masculin Augmentation de la masse musculaire
Mode de vie	Cigarette Café Alcool Activité physique

Tableau 2 : Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

II.2.2. Les facteurs nutritionnels

Les déterminants nutritionnels de l'homocystéine les plus couramment cités sont les folates, la vitamine B12, la vitamine B6, la choline et moins souvent la vitamine B2. Ces molécules sont toutes associées au métabolisme de l'homocystéine, que ce soit dans le cycle de reméthylation (B2, B9, B12 et choline) ou dans la voie de transsulfuration (B6).

Plusieurs études ont montré qu'il existe une hyperhomocystéinémie chez les sujets adultes soumis à une carence en vitamines du groupe B (Mann et al., 1999 ; De Bree et al., 2001 ;

Jacques et al., 2001 ; Hustad et al., 2000). Il existe 3 types de carences en vitamines du groupe B associées à une accumulation d'homocystéine (Stabler et al., 1988) :

- i- l'interruption de la voie de transsulfuration par une déficience en coenzymes dérivés de la vitamine B6 (PLP – phosphate pyridoxal) ;
- ii- la carence en folates responsable d'un déficit en méthylTHF qui est donneur de méthyle lors de la reméthylation de l'homocystéine ;
- iii- la carence en vitamine B12, qu'elle soit due à un défaut d'apport, d'absorption ou de transport sanguin (Namour et al., 2003), se répercute au niveau cellulaire et a pour conséquence une baisse de la transméthylation du méthylTHF sur l'homocystéine durant la reméthylation. Cela crée un déséquilibre entre reméthylation et transsulfuration, provoquant une trappe métabolique des folates sous la forme méthylTHF, les rendant ainsi inutilisables pour d'autres réactions métaboliques (Chanarin et al., 1990).

En effet, si certaines études retrouvent une corrélation entre la baisse du taux plasmatique en vitamine B12 et une hyperhomocystéinémie, il est en fait très difficile d'obtenir, du moins chez l'adulte sain, une véritable carence en vitamine B12. Ceci étant, à l'occasion d'une étude de cohorte (Framingham), Jacques et al., (2001) ont montré qu'il existait une corrélation significative entre des valeurs basses de vitamine B12 plasmatique et l'homocystéine, ainsi qu'entre les folates et l'homocystéine, et entre la vitamine B6 et l'homocystéine.

Dans une étude transversale hollandaise portant sur 2 435 patients, De Bree et al., (2001) ont rapporté que plus les régimes alimentaires sont déficients en vitamines B, plus l'homocystéinémie est élevée. Ces mêmes auteurs ont montré que les taux plasmatiques de toutes ces vitamines B (B2, B6, B9, B12) sont corrélés négativement aux taux d'homocystéine, en analyse univariée. Cependant, en analyse de régression multivariée, seuls les folates demeurent corrélés négativement à l'homocystéinémie, les autres vitamines B étudiées n'étant plus des déterminants de la concentration plasmatique d'homocystéine.

Jacques et al., (2001) ont mis en évidence une faible, mais significative, association entre la carence en riboflavine et le taux d'homocystéine dans la cohorte de Framingham portant sur 1 960 sujets. De même, Hustad et al., (2000) ont montré que la riboflavine est un déterminant indépendant de l'homocystéinémie dans une étude transversale portant sur 423 adultes sains.

II.2.2.1. Les folates (vitamine B9)

La vitamine B9 (acide folique, ou folate) se trouve dans l'alimentation, et principalement dans les légumes verts (épinards, concombre, asperges, fenouil, *etc.*), les levures, le foie. Les besoins en folates sont élevés car ils interviennent, outre dans le métabolisme des monocarbone, dans la synthèse des purines, éléments indispensables à la synthèse des acides nucléiques (ARN et ADN). Chez l'enfant de 0 à 12 ans, les apports nutritionnels conseillés (ANC) varient de 70 à 250 µg/jour. Chez l'adolescent de 13 à 19 ans, ainsi que chez les adultes, les ANC sont autour de 300 µg/jour. En revanche, pour la femme enceinte ou allaitante les besoins sont supérieurs à 400 µg/jour (Plosa et al., 2009).

Une carence en folates est probablement la cause principale et la plus étudiée d'une hyperhomocystéinémie.

Afin de limiter la survenue des différentes pathologies en lien avec l'accumulation d'homocystéine, les organismes de santé publique s'accordent à dire qu'une supplémentation quotidienne de la femme en folates de 400 µg durant toute la période périnatale est nécessaire. Néanmoins, l'apport excessif en acide folique pourrait interagir avec différents médicaments. Les folates jouant un rôle important dans la synthèse des nucléotides et la multiplication cellulaire, plusieurs études rapportent également un effet toxique des folates lorsque ceux-ci sont administrés à des doses non physiologiques chez le rat ou l'homme. Des apports excessifs vont engendrer une neurotoxicité et une néphrotoxicité. Plusieurs équipes ont montré un effet similaire des folates et du kaïnate (ligand d'un des sous-types de récepteurs glutamatergiques) ; néanmoins, le mécanisme de toxicité n'est pas encore connu (Hunter et al., 1970 ; Richens et al., 1971 ; Olney et al., 1981 ; Chen et al., 2004). Enfin, une absorption massive de folates peut perturber le métabolisme de la vitamine B12 et en masquer la carence, ce qui se produit chez les végétariens dont le régime est trop appauvri en vitamine B12. Ainsi, l'une des pathologies observées lors d'une déficience en vitamine B12 est une anémie. L'apport en folates va favoriser la synthèse de globules rouges en participant à la synthèse de nucléotides (Campbell et al., 1996).

- Les fonctions physiologiques

Les folates alimentaires sont sous forme de polyglutamates (~90%) et de monoglutamates. Alors que le monoglutamate est absorbé à plus de 90% par l'intestin, seulement 20 à 30% des polyglutamates sont absorbés à ce niveau là grâce à l'IFC (*Intestinal folate carrier*) (Nguyen et al., 1997 ; Galivan et al., 2000).

Les folates facilitent le transfert des unités monocarbonées à partir de multiples biomolécules vers de nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purines et de pyrimidines, la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine. (Scott et al., 1998).

- Réduction de l'acide folique

Pour être métaboliquement active, la molécule d'acide folique doit être réduite par une enzyme, la dihydrofolate réductase qui fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation. Ainsi, le ptéroylglutamate subit une double réduction en THF (TétraHydroFolate).

- Méthylation du THF

La fixation des groupements monocarbonés en 5 et 10 conduit aux formes circulantes et actives (5,10-MTHF et 5-MTHF).

- Déméthylation du 5-MTHF

La molécule de 5-MTHF véhiculée par le sérum doit être déméthylée pour intégrer le cycle des folates, et ce transfert de méthyle qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite la MTHFR et son cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine.

C'est en tant que donneur de méthyle que l'acide folique joue un rôle fondamental dans le métabolisme de l'homocystéine.

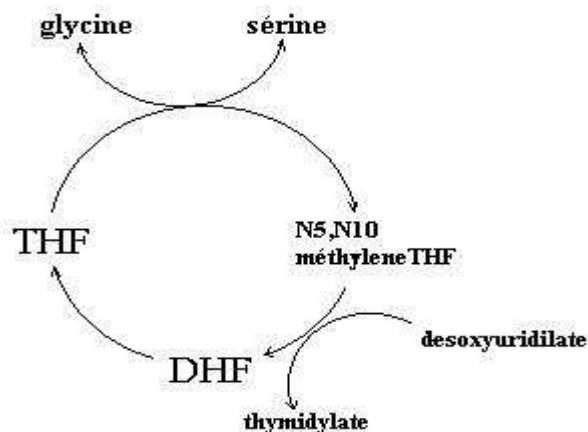


Figure 3 : Cycle des folates

II.2.2.2. La vitamine B12

La vitamine B12, ou cobalamine (Cbl), est une molécule organométallique présentant une liaison carbone-cobalt rarement rencontrée par ailleurs dans la nature. Elle appartient à une classe de composés complexes appelés corrinoïdes. La vitamine B12 est présente dans les aliments dérivés des animaux mais elle n'est synthétisée que par certains micro-organismes. Elle est absente du règne végétal. La molécule de corrinoïde est constituée de trois parties (Figure 4) : un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole et l'autre un radical anionique variable R en position β qui détermine le nom du composé vitaminique (Namour et al., 2003). Dans l'adocobalamine (AdoCbl), le cobalt se trouve lié à un radical 5'-désoxyadénosyle alors que dans la méthylcobalamine (MeCbl), le radical lié au cobalt est un groupement méthyle. L'homme est incapable de synthétiser *de novo* l'adénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl) et il dépend donc des sources alimentaires en précurseurs de cobalamine (Le al., 2004). Les formes circulantes, la cyanocobalamine (CNCbl) et l'hydroxocobalamine (OHCbl), sont converties en glutathionylcobalamine (GSCbl), réduite successivement en Cob(II) puis Cob(I), et finalement adénosylée en AdoCbl.

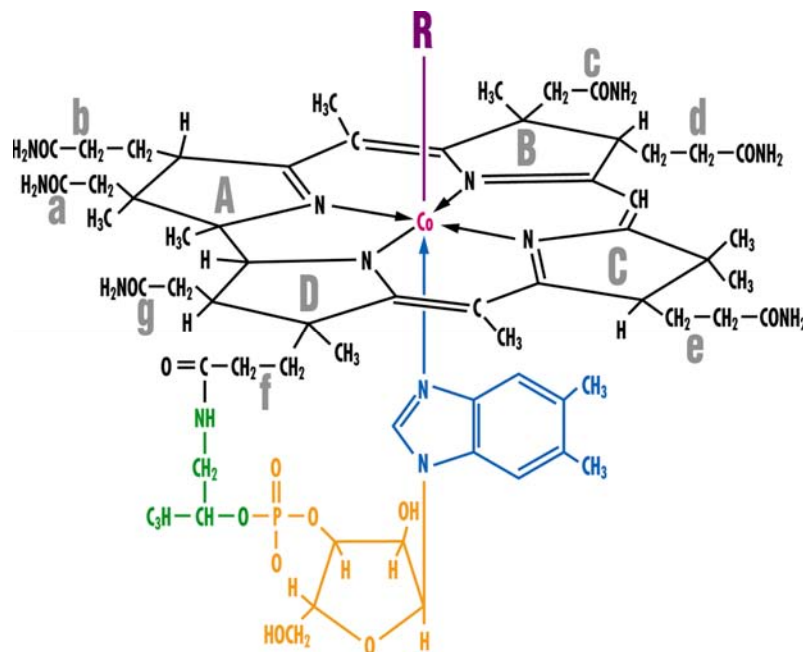


Figure 4: Structure de la vitamine B12 ou cobalamine (d'après Guéant et Namour 2003)

- Absorption et transport de la vitamine B12

La vitamine B12 d'origine alimentaire est rarement présente à l'état libre. Après ingestion des aliments, la Cbl est libérée de son support protéique par les sécrétions chlorohydropepsiques de l'estomac et se fixe à l'haptocorrine. L'haptocorrine assure le transport de la Cbl de l'estomac jusqu'au duodénum. A ce niveau, l'haptocorrine est partiellement dégradée par les enzymes pancréatiques exocrines. La Cbl libérée se combine au facteur intrinsèque (FI) (Allen, et al., 1978, Guéant, et al., 1990) synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Le FI est résistant à l'action de la trypsine. Le complexe FI-Cbl est ensuite internalisé par les cellules de l'iléon terminal par l'intermédiaire d'un/des récepteur(s). Cette absorption se fait selon un mécanisme de transport actif, saturable, extrêmement spécifique. Le complexe pénètre dans l'entérocyte par endocytose et y est dissocié (Seetharam, et al., 1982). L'absorption est lente puisqu'il faut 8 à 12 heures avant que la vitamine B12 fixée au niveau de l'iléon n'apparaisse dans la circulation sanguine. La Cbl quitte l'entérocyte liée à un transporteur protéique : la transcobalamine II (TC-II), elle est ensuite libérée dans la circulation sanguine. Le complexe TCII-Cbl est capté par l'ensemble des tissus de l'organisme. La conversion de la Cbl internalisée sous forme coenzymatique a été observée dans les cellules Caco-2 (Pons, et al., 2000). Le lieu de la formation du complexe TCII-Cbl reste à ce jour sujet à discussion.

La transcobalamine II est synthétisée par l'hépatocyte. Le complexe formé par la vitamine B12 et son transporteur, la TC II, circule dans le sang, se fixe par sa partie protéique à un récepteur membranaire spécifique et pénètre dans la cellule. Toutes les cellules synthétisant de l'ADN sont supposées posséder un récepteur spécifique du complexe (Benson, et al., 1972). La partie protéique est dégradée dans le lysosome et la vitamine B12 est libérée. Elle quitte alors les endosomes et est transformée en coenzymes actifs : méthylcobalamine (CH₃-B12) au niveau du cytoplasme ou adénosylcobalamine (Ado-Cbl) au niveau de la mitochondrie (Kolhouse and Allen, 1977).

La majeure partie de la Cbl contenue dans les cellules serait liée aux enzymes B12-dépendantes, la méthylmalonyl-CoA mutase et la méthionine synthase (Mellman, et al., 1977).

- Métabolisme de la vitamine B12

Réaction de transméthylation

Les cobalamines sont des coenzymes qui permettent à des enzymes spécifiques de transférer des groupements monocarbonés. La CH₃Cbl est indispensable à l'activité de la méthionine

synthase elle catalyse la méthylation de l'homocystéine en méthionine, tout en permettant la régénération de l'acide tétrahydrofolique (THF), forme active des folates à partir du N5-méthyl-tétrahydrofolate (CH₃-THF), (Hogenkamp et al., 1968; Mangum et al., 1969).

Réaction d'isomérisation

L'AdoCbl est le cofacteur de la méthylmalonyl co-enzyme A mutase (MCM, EC 5.4.99.2), enzyme mitochondriale qui catalyse l'isomérisation du L-méthylmalonyl coenzyme A (MMCoA) en succinyl coenzyme A (ScoA) (Beck and Ochoa, 1958; Valencia et al., 1974). Ce dernier est ensuite métabolisé en acide succinique et intégré dans le cycle de Krebs. Le blocage de cette voie succinate est alors observé en cas de carence, entraînant l'accumulation d'acide méthyl malonique (MMA) et son excrétion dans les urines (Lindenbaum et al., 1990).

- Elimination

La principale voie d'excrétion de la vitamine B12 est la bile. La majeure partie de cette excrétion biliaire est réabsorbée au niveau de l'iléon. C'est ce que l'on nomme le cycle entéro-hépatique des cobalamines. L'élimination urinaire est très faible (moins de 0,25 µg par jour).

- Carences en vitamine B12

La carence en vitamine B12 se manifeste surtout dans les maladies auto-immunes avec formation d'anticorps contre les protéines porteuses des vitamines (facteur intrinsèque), ainsi que dans certaines maladies intestinales ou encore par suite d'un régime alimentaire mal équilibré, exclusivement végétal (régime « végétalien »). Elle provoque une anémie mégalo-blastique, macrocytaire, dite anémie perniciose de Biermer.

L'effet de la carence en B12 sur l'érythropoïèse est fonction du métabolisme de l'acide folique et se traduit par une réduction de la synthèse de l'ADN. Ainsi, la gravité de l'anémie due à une carence en vitamine B12 dépend de la teneur en acide folique (Eichholzer et al., 2002).

La carence en vitamine B12 se manifeste par des signes généraux, hématologiques (anémie mégalo-blastique et défaut de prolifération des cellules à renouvellement rapide) neuropsychiatriques (Scott et al., 1992) avec l'apparition de foyers de démyélinisation, diffus et progressifs, au niveau de la moelle épinière et du cerveau (Lindenbaum et al., 1995) ainsi que cutanéomuqueux. La symptomatologie s'installe très progressivement au bout de plusieurs semaines ou de quelques mois.

Il existe différents degrés de déficience en vitamine B12 :

- Le stade I correspond à une concentration faible (<60 pg/mL) d'holo transcobalamine II
- Le stade II correspond à une faible déficience en vitamine B12 (<300 pg/mL) et d'holo TC II (<40 pg/mL) ;
- Le stade III regroupe une concentration de vitamine B12 et d'holo TC II plus basses, respectivement à 200 et 40 pg/mL, une hypersegmentation des neutrophiles, une élévation des concentrations en acide méthylmalonique (MMA) et en homocystéine dans le plasma et les urines.
- Les déficiences sévères (stade IV) présentent les mêmes caractéristiques que le stade III avec en plus une anémie mégalo-blastique et macrocytique ainsi qu'une démyélinisation du système nerveux central et périphérique conduisant à des neuropathies et une dégénérescence des fibres nerveuses.

II.2.2.3. La vitamine B6

La vitamine B6 (pyridoxine), est active sous forme de phosphate de pyridoxal (PLP), elle intervient dans plus d'une centaine de réactions en tant que cofacteur, soit cofacteur de la CBS dans la voie de transsulfuration, c'est donc un important modulateur des taux plasmatiques d'homocystéine.

Le terme « vitamine B6 » désigne 6 composés : le pyridoxal (PL), la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM), et leurs dérivés phosphorylés respectifs, le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), et la pyridoxine 5'-phosphate (PNP).

Nous nous intéresserons seulement au phosphate de pyridoxal ou PLP.

- Métabolisme

Dans la lumière de l'intestin grêle, le PLP et le PMP présents dans les produits animaux sont hydrolysés par une phosphatase pour être absorbés sous forme de PL et de PM par l'entérocyte, par un mécanisme de diffusion passive non saturable (Guilland et al.,1992).

Le PLP est formé par phosphorylation du PL catalysé par la pyridoxal kinase. Certains tissus (le foie, le cerveau et les érythrocytes) peuvent synthétiser le PLP à partir de la PN (présente dans les produits végétaux).

Le foie est le principal site de synthèse du PLP et c'est le seul organe capable de libérer dans le sang la vitamine B6, sous forme de PLP.

Hao et al., (2007) ont montré que la carence en vitamine B6 était responsable d'une hyperhomocystéinémie.

Ces différents travaux montrent l'importance des vitamines B dans le métabolisme de l'homocystéine. Ceci est conforté par le fait qu'en cas de supplémentation vitaminique chez les patients carencés, on observe une tendance à la normalisation de l'homocystéinémie (Jacques et al., 2001; O'Keefe et al., 1995). Toutefois cela ne semble pas être vrai pour toutes les vitamines. En effet, McKinley *et al.*, (2002) ont montré que la supplémentation en riboflavine (B2) n'engendrait une normalisation de l'homocystéine que si elle était associée à une supplémentation en folates chez des personnes âgées présentant un taux basal diminué de riboflavine.

II.2.3. Les facteurs génétiques

Les polymorphismes ou variants génétiques du génome sont la conséquence de mutations qui sont le plus souvent des mutations uniques (*single nucleotide polymorphism* ou SNP). Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (*MTHFR C677T, A1298C*), Méthionine synthase (*MTR A2756G*), Méthionine synthase réductase (*MTRR A66G*). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (*TCN C776G*), a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie modérée (Namour et al., 2001) (Figure 5). L'incidence fonctionnelle d'un polymorphisme donné n'est pas toujours connue. Les polymorphismes des enzymes du cycle des folates (MTHFR et MTR) peuvent affecter le statut en homocystéine, et conditionnent les besoins nutritionnels relatifs de la population concernée en vitamines du groupe B.

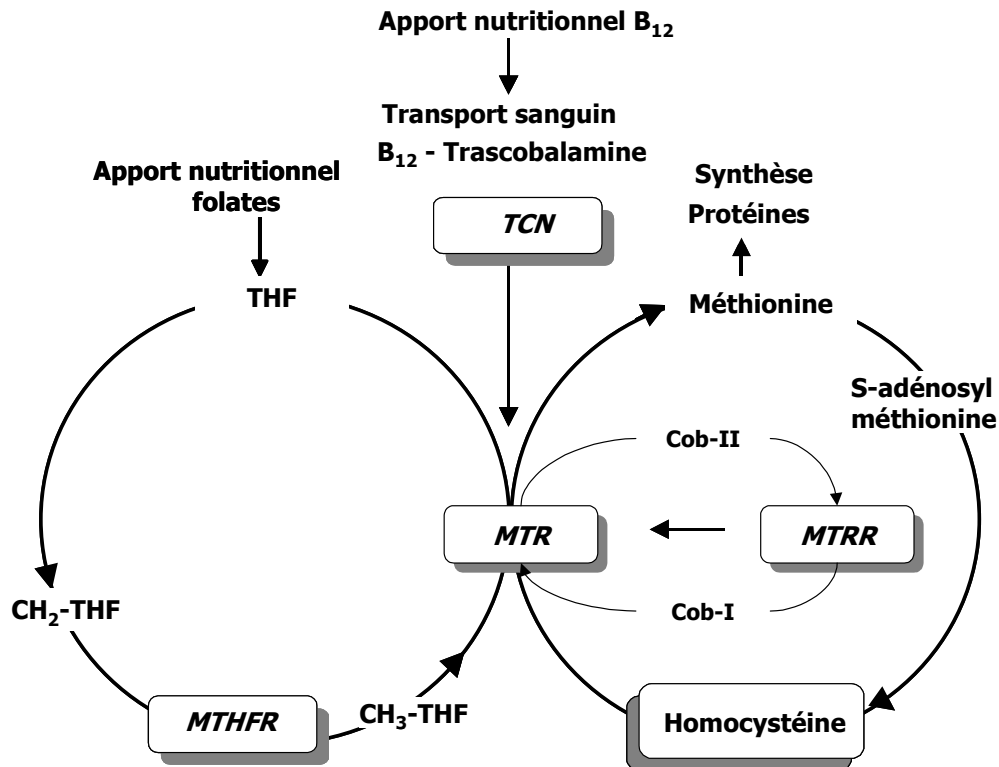


Figure 5 : Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine pour lesquels des polymorphismes associés à une hyperhomocystéinémie ont été décrits

II.2.3.1. Les polymorphismes du gène MTHFR : *C677T*, *A1298C*, *T1317C*

L'altération génétique la plus commune associée à une hyperhomocystéinémie modérée est une mutation par substitution d'une cytosine en une thymidine en position 677 (677 C→T) au niveau du cadre ouvert de lecture du gène de la MTHFR. Cette mutation ponctuelle provoque sur la structure protéique de l'enzyme le remplacement d'un acide aminé valine par un acide aminé alanine (Frosst et al., 1995), engendrant une diminution de l'activité enzymatique (Bailey et al., 1999). Cette mutation, autosomique récessive, a une fréquence variable suivant la population avec 10-13% d'homozygotes TT et 50% d'hétérozygotes dans les populations caucasienne et asiatique ; il existe une faible incidence dans les populations africaine et américaine (Bailey et al., 1999; Brattstrom et al., 1998).

Le second polymorphisme de la MTHFR correspond à la substitution d'une adénine en cytosine en position 1298 (1298 A→C), remplaçant au niveau de l'enzyme un acide aminé glutamate en alanine. La fréquence allélique du polymorphisme 1298 A→C est similaire au polymorphisme 677 C→T. Cependant, ce polymorphisme ne semble pas être associé à l'élévation plasmatique de l'homocystéine.

II.2.3.2. Les polymorphismes des gènes MTR : *A2756G* et MTRR : *A66G*

L'étude de Chen et al., (1997) a mis en évidence l'existence de plusieurs polymorphismes de la Méthionine synthase (MTR). L'un des polymorphismes prédominants est la mutation 2756 A→G. Au niveau de l'enzyme, un acide aminé aspartate est remplacé par une glycine. Cette mutation n'a pas ou peu d'effet sur les maladies cardiovasculaires (Van der Put et al., 1997 ; Bailey et al., 1999) et n'est pas un facteur déterminant de l'hyperhomocystéinémie (Bosco et al., 2006). Le polymorphisme 2756 A→G est décrit comme étant un facteur de risque d'avoir un enfant porteur d'une trisomie 21 si la mère est homo- ou hétérozygote pour cette mutation (Bosco et al., 2003).

Une mutation de la Méthionine synthase réductase (MTRR) doit être également mentionnée. Ce polymorphisme correspond à la mutation 66 A→G, modifiant l'acide aminé I22 en M22, et sa fréquence allélique est de 0,51. Ce polymorphisme est associé à des maladies coronariennes artérielles (Guéant-Rodriguez et al., 2005).

II.2.3.3. Les polymorphismes du gène CBS : T833C et *G919A*

La mutation homozygote du gène CBS favorise l'apparition d'une homocystinurie, qui est associée souvent à une hyperhomocystéinémie sévère, une thromboembolie et un retard mental.

Environ une soixantaine de mutations différentes ont été décrites dont les plus communes sont la 833T→C et la 919G→A (Kraus JP 1998). Le polymorphisme 833T→C est le plus répandu et serait fortement associé aux problèmes de thromboses (Gaustadnes et al., 2000).

II.2.3.4. Les polymorphismes du gène transcobalamine : *TCN C776G*

La transcobalamine II (TCII) est une globuline plasmatique de transport de la vitamine B12. Son absence provoque une anémie mégaloblastique sévère détectée dès l'enfance (Hakami et al., 1971) Le gène (*TCN*) de la TCII peut présenter plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en homocystéine. La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cystine en guanine en position 776 (*776C→G*) (Namour et al., 2001). La conséquence au niveau protéique est le remplacement d'un acide aminé arginine aux dépens d'une proline (codon 259). (Namour et al., 2001). L'allèle *TCN 776 G* diminue la transcription de la TCII et il existe par conséquent une diminution de la concentration plasmatique en TCII. L'influence faible de l'allèle *TCN 776 G* sur la concentration de l'homocystéine a été documentée dans des populations de Caucasiens (Namour et al., 2001,

Miller et al., 2002). Par contre, l'association des formes mutées de la *MTHFR* et de la *TCN* favorise l'apparition d'une hyperhomocystéinémie sévère chez l'embryon et augmente le risque d'avortement spontané (Zetterber et al., 2004).

III. Pathologies associées à l'homocystéine

Plusieurs études ont montré qu'une élévation des taux plasmatiques en homocystéine est associée à l'apparition de diverses pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), les maladies cardiovasculaires et, dans certains cas, les stéatoses hépatiques (homocystinurie). L'hyperhomocystéinémie perturbe aussi les processus de procréation et peut causer des troubles du développement (Trisomie 21, spina-bifida). Pour autant, il est encore difficile de déterminer si les symptômes observés chez un patient hyperhomocystéinémique sont dus à l'hyperhomocystéinémie elle-même ou si cette dernière est une autre conséquence de la pathologie.

III.1. Homocystéine et dysfonction vasculaire

III.1.1. Diminution de la fonction de thromborésistance endothéliale

Des travaux semblent indiquer que l'homocystéine peut perturber la coagulation par l'action sur des étapes multiples de la voie de coagulation. Les résultats expérimentaux suggèrent que l'hyperhomocystéinémie puisse favoriser la thrombose vasculaire par l'induction des procoagulants. Des cultures de cellules endothéliales humaines exposées à l'homocystéine présentent l'activation du facteur tissulaire et du facteur endogène V de la coagulation (Fryer et al., 1993 ; Rodgers et al., 1986). L'homocystéine peut, de plus, favoriser la thrombose par l'inhibition des anticoagulants naturels.

Cependant, la plupart des études soutiennent l'hypothèse d'une dysfonction endothéliale comme cause de thrombose vasculaire en présence d'homocystéine. La thrombogénèse accrue chez les patients présentant une hyperhomocystéinémie peut jouer un rôle important dans l'athérogenèse.

III.1.2. Homocystéine et lésions endothéliales

Les mécanismes par lesquels l'homocystéine induit le dysfonctionnement endothélial ne sont pas complètement définis. Toutefois, des travaux expérimentaux montrent que l'altération de la fonction de relaxation endothélium-dépendante est médiée par l'oxyde nitrique (NO)

(Lentz et al., 2001). En effet, le NO joue un rôle primordial dans la régulation de la pression sanguine et de la motilité microvasculaire. Le NO inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des globules blancs sur les parois des vaisseaux, réduisant ainsi le risque de formation du thrombus.

III.2. Homocystéine et insulino-résistance

Des patients ayant un diabète de type 2 (insulino-résistant) développent des maladies coronariennes qui ne sont pas toujours liées à une dyslipidémie (Fonseca et al., 2000). L'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie sont reconnues comme étant des facteurs de risque impliqués dans l'athérosclérose (De Fronzo et al., 1992). Munshi et al., (1996) ont montré, dans une étude comparative entre les diabétiques de type 1 et de type 2, que seul le type 2 est associé à une hyperhomocystéinémie. Dans ce cas, les patients développent plus vite des maladies macrovasculaires. D'autres études ont également montré une augmentation de l'homocystéinémie chez les patients diabétiques qui développent une athérosclérose ou une insuffisance rénale (Wiklund et al., 1996, Araki et al., 1993). Cependant, bien qu'il existe une corrélation négative entre insuline et homocystéine chez des patients obèses diabétiques, il n'y a aucune corrélation entre l'homocystéine et l'indice de masse corporelle (Fonseca et al., 2003). Le rôle de ces anomalies métaboliques dans l'étiologie du diabète reste assez flou. Pour comprendre ce lien possible, Poirier et al., (2001) ont soumis 33 patients diabétiques (types 1 et 2, sans discrimination apparente entre ces deux groupes) à des analyses biologiques (érythrocytes et lymphocytes) portant sur les déterminants nutritionnels de l'homocystéine. Il en ressort que des patients diabétiques souffrant d'hypertension (néphropathie) et/ou sous traitement d'hémodialyse, ont une hyperhomocystéinémie modérée (~16 μM) associée à une diminution du ratio SAM/SAH, et une diminution de l'activité MTHFR. Cela indique que des diabètes associés à des néphropathies sont accompagnés de troubles du métabolisme des monocarbone. Dicker-Brown et al., (2001) ont aussi observé chez des patients diabétiques de type 2, présentant des risques cardiovasculaires, une hyperhomocystéinémie modérée. De plus, une hyperinsulinémie conduirait à une chute de l'homocystéinémie chez des sujets sains mais pas chez des patients diabétiques de type 2 (Fonseca et al., 1998).

Des études récentes suggèrent que l'homocystéine pourrait induire une insulino-résistance par sa forme toxique, l'homocystéine thiolactone, qui provoque des altérations dans les structures protéiques, notamment sur les récepteurs à l'insuline (Najib et Sanchez-Margalet, 2005). Le stress oxydant généré par l'homocystéine thiolactone conduit à une inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs à l'insuline, résultant en une diminution de l'activité

phosphatidylinositol 3-kinase, une inhibition de la synthèse de glycogène et une inhibition, par l'insuline, de la stimulation d'ADN et de la synthèse peptidique.

III.3. Homocystéine et stéatose

L'alcoolisme chronique est depuis longtemps connu pour compromettre le métabolisme des vitamines et en particulier celles impliquées dans le métabolisme des monocarbones, notamment les folates et la vitamine B12 (Morgan et Levine 1988; Bonjour et al., 1980). Cette altération du statut vitaminique engendre une élévation du taux d'homocystéine. Ainsi, Hultberg *et al.* (1993) ont montré une concentration plasmatique d'homocystéine plus élevée chez des patients alcooliques chroniques hospitalisés pour une désintoxication que dans un groupe témoin. L'interruption de la consommation d'alcool a permis à ces malades de retrouver en quelques jours un niveau d'homocystéine normal. L'accumulation intracellulaire d'homocystéine est associée chez les patients au développement de différentes altérations hépatiques comme la nécrose, les réactions inflammatoires, la fibrose ou encore la stéatose (Tsukamoto et Lu 2001). Les problèmes de stéatose liés à une hyperhomocystéinémie ont été évoqués à diverses reprises chez l'homme adulte (Adinolfi et Ingrosso 2005), chez l'enfant (Carson et Neil 1962) ou encore chez les animaux mutés pour le gène de la CBS (Namekata et al., 2004 ; Robert et al., 2005) ou le gène de la MTHFR (Schwahn et al., 2003).

III.4. Homocystéine et pathologies développementales

III.4.1. Pathologies gravidiques

Plusieurs pathologies gravidiques ont été associées à l'hyperhomocystéinémie. En 1993, Wouters a, pour la première fois, associé les avortements spontanés à l'excès d'homocystéine qui provoquerait une altération des vaisseaux décidaux ou chorioniques, engendrant une perturbation de l'implantation du conceptus. Cette embryotoxicité de l'homocystéine a été également observée chez le rat (Vanaerts et al., 1994).

Le fait que l'homocystéine serait responsable d'une atteinte des cellules endothéliales vasculaires via un stress oxydant a également été évoqué dans la physiopathologie de la pré-éclampsie (Roberts et al., 1989). 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, contre environ 2% dans la population générale.

Leeda *et al.* (1998), Burke *et al.* (1992) ont montré que les enfants de femmes ayant une hyperhomocystéinémie au cours de leur grossesse présentent sept fois plus de risque de développer un retard de croissance intra-utérin que dans la population normale. Plusieurs études ont montré une corrélation entre l'hyperhomocystéinémie et la déficience de facteurs limitant le développement des mécanismes athérombotiques. Ainsi Dekker *et al.*, (1995), ou De Vries *et al.*, (1997) ont rapporté une association entre la baisse des protéines C et S et antithrombine III, les mutations des gènes exprimant le facteur V de Leiden ou l'anticorps anti-cardiolipine avec une hyperhomocystéinémie de la femme enceinte. Ces différents facteurs impliqués dans les pathologies thrombotiques sont aussi impliqués dans le retard de croissance intra-utérin. La moitié des femmes dont les enfants présentent un retard de croissance intra-utérin montrent une altération de ces métabolites (Sibai *et al.*, 1999).

III.4.2. Pathologies développementales

Au cours de la grossesse, une déficience en folates associée à une hyperhomocystéinémie augmente significativement le risque d'apparition de pathologies affectant le développement avec des atteintes qui touchent le développement cérébral, avec des degrés de sévérité plus ou moins importants. Parmi ces pathologies liées au développement du système nerveux, on observe des anomalies de la fermeture du tube neural chez le fœtus (Smithells *et al.*, 1976). Effectivement, la présence d'une hyperhomocystéinémie lors de la prolifération, la différenciation et la mort des cellules néoformées lors de la formation du tube neural aboutit à des spina-bifida. Plusieurs types de spina-bifida ont été identifiés avec des conséquences plus ou moins importantes.

A côté de ces malformations neurales, on distingue des malformations faciales telles que les fentes labio-maxillo-palatines représentant la malformation faciale la plus fréquente, et dont l'incidence la plus élevée est retrouvée en Asie, en Amérique du sud, la plus faible étant observée en Afrique. La survenue de ces malformations est attribuée à l'association de facteurs génétiques et nutritionnels. Plusieurs études suggèrent que les femmes supplémentées en acide folique pendant la grossesse peuvent réduire de manière significative les risques pour leur nouveau-né de présence de fente labio-maxillo palatine, tout comme cela a été observé pour les anomalies de fermeture du tube neural.

Une large partie traitant des pathologies affectant le développement cérébral sera développée plus loin dans cette revue bibliographique.

- Trisomie 21

La trisomie 21 (Syndrome de Down) est une pathologie complexe en rapport avec des perturbations métaboliques et génétiques dont le point de départ est un défaut de division durant la méiose du chromosome 21, aboutissant à un chromosome surnuméraire. Une carence en folates et en donneurs de groupements méthyles pourrait être impliquée dans cette altération de la séparation chromosomique au cours de la méiose.

La présence d'une mutation de la Méthionine synthase réductase (MTRR) a pour conséquence une altération du développement du tube neural, lorsqu'elle est associée à un statut insuffisant en vitamine B12 ou à un polymorphisme de la MTHFR (677 C→T) (Wilson et al. 1998). 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).

C'est en 1962 que Carlson et Neil ont publié pour la première fois des travaux établissant un lien entre une anomalie du métabolisme des folates et cobalamines et une diminution des performances intellectuelles, des troubles neurologiques et des signes de démence (Scott et al., 1992; van Leeuwen et al., 2000; Leblhuber et al., 2001).

III.5. Homocystéine et pathologies liées au vieillissement

III.5.1. Maladie d'Alzheimer

L'augmentation du taux d'homocystéine plasmatique a été associée à l'apparition de la maladie d'Alzheimer (MA). Alors que l'homocystéine se révèle toxique dans des modèles cellulaires tels que les cultures primaires de neurones corticaux ; toutefois, les mécanismes de la toxicité de l'homocystéine et son rôle dans la pathogénie de la MA demeurent encore assez flous. Hasegawa et al., (2005) ont émis l'hypothèse que ce serait l'acide homocystéique (HA), un produit d'oxydation de l'homocystéine, qui jouerait un rôle dans la pathogénèse de la MA par une régulation positive de la production du peptide β -amyloïde (A β 42). Les dépôts extracellulaires d'agrégats font partie des principaux diagnostics pour la MA mais l'A β 42 peut être particulièrement cytotoxique quand il s'accumule à l'intérieur des neurones. L'HA diminue l'apparition des plaques A β 42 à l'extérieur des cellules mais au contraire augmente fortement l'A β 42 intracellulaire. Cette neurotoxicité est atténuée par l'utilisation d'inhibiteurs de γ -secrétase, enzyme générant de l'A β 42 à partir du peptide précurseur, suggérant ainsi le rôle clé de l'accumulation de A β 42 dans l'action neurotoxique de l'HA.

Bien que les taux d'HA soient identiques entre les patients MA et les témoins, il a été démontré que l'augmentation de l'homocystéine associée à un polymorphisme MTHFR 677TT

était un facteur de risque indépendant dans l'apparition de la maladie (Anello et al., 2004; Fernandez et al., 2005). Selon ces travaux l'implication de l'homocystéine et ses effets neurotoxiques dans la maladie d'Alzheimer seraient donc dus à son produit d'oxydation, l'HA, lui-même activateur dans la synthèse du peptide A β 42. Néanmoins, cela n'explique pas comment l'HA régule le peptide A β 42. La régulation positive de A β pourrait impliquer le stress oxydant car les différentes études menées sur ce sujet montrent que des marqueurs du stress oxydant précèdent la période d'accumulation de A β .

Les travaux *in vitro* de Ho PI (2001) ont montré que l'association homocystéine et peptide A β induit un stress oxydant et une mort par apoptose des neurones, alors qu'individuellement, leurs effets seraient moindres. L'action synergique de l'homocystéine et du peptide A β stimule l'ouverture de canaux calciques. L'influx de calcium favorise la production de radicaux libres conduisant à une mort cellulaire. Par ailleurs, les individus porteurs de l'isoforme ϵ 4 de l'apolipoprotéine E présentent un risque élevé de développer une MA. L'apoE est une protéine ubiquitaire, jouant un rôle dans le transport du cholestérol et des phospholipides. Des études génétiques ont montré que l'apoE intervient dans la MA en tant que facteur de risque (pour l'allèle E4) ou protecteur (pour l'allèle E2). Cette apoE4 aurait une activité antioxydante réduite par rapport aux autres isoformes. A ce titre, plusieurs études cliniques ont rapporté l'existence d'une corrélation entre les polymorphismes apoE4 et MTHFR dans les cas de MA (Nishiyama et al., 2000 ; Anello et al., 2004 ; Fernandez et al., 2005).

III.5.2. Maladie de Parkinson

Plusieurs études (Yasui et al., 2000 ; Blandini et al., 2001; Heider et al., 2004) ont montré une corrélation entre l'apparition de la Maladie de Parkinson (MP) et une augmentation de l'homocystéine plasmatique. Une hyperhomocystéinémie a été observée chez les patients atteints de MP présentant une mutation (C677T) de la MTHFR. La baisse de donneurs de méthyles à l'origine d'une hyperhomocystéinémie pourrait accélérer le processus de neurodégénérescence (Liu et al., 2000 ; Duan et al., 2002) ont montré sur un modèle de souris MP (après administration de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP), qu'une déplétion en folates ou une administration d'homocystéine augmentait la perte des neurones dopaminergiques. Par ailleurs une autre étude (Muller et al., 2004) a rapporté que le traitement de Lévodopa induirait une élévation de l'homocystéine et augmenterait le processus neurodégénératif.

CHAPITRE II : Développement cérébral et pathologies associées à l'homocystéine

I. Développement du SNC et cellules souches neurales

Les malformations ou anomalies du développement sont très souvent la conséquence de perturbations environnementales survenues durant la période critique que constitue la mise en place du système nerveux central. Ces malformations survenant sur un tissu sont généralement regroupées sous le terme de dysplasie.

La prise en compte du rôle de l'environnement, et notamment celui de conditions nutritionnelles de la mère durant la période délicate qu'est la gestation, pourrait apporter un éclairage nouveau sur les causes de certaines de ces malformations (Blaise et al., 2005).

Les anomalies de l'environnement telles que la malnutrition ou les carences en vitamines du groupe B survenant à des périodes critiques du développement cérébral sont des causes importantes de malformations plus ou moins sévères, telles que des défauts de fermeture du tube neural à l'origine de spina bifida ou de fentes labio-maxillo-palatines. Elles sont par ailleurs une cause de retard mental, comme dans le cas de la trisomie 21.

I.1. Généralités sur le développement du système nerveux

Chez les vertébrés, la gastrulation va permettre la formation des trois couches embryonnaires (début de la 3^{ème} semaine de gestation chez l'homme) : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La corde 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 la neurulation l'ectoderme s'épaissit et devient la plaque neurale (milieu de la 3^{ème} semaine chez l'homme) (Figure 1A). Les bords de cette plaque neurale vont se redresser (stade de la gouttière neurale) (Figure 1B) et se rejoindre pour fermer le tube neural (milieu de la 4^{ème} semaine chez l'homme, 9^{ème} jour embryonnaire chez la souris (E9)) (Figure 1C-D).

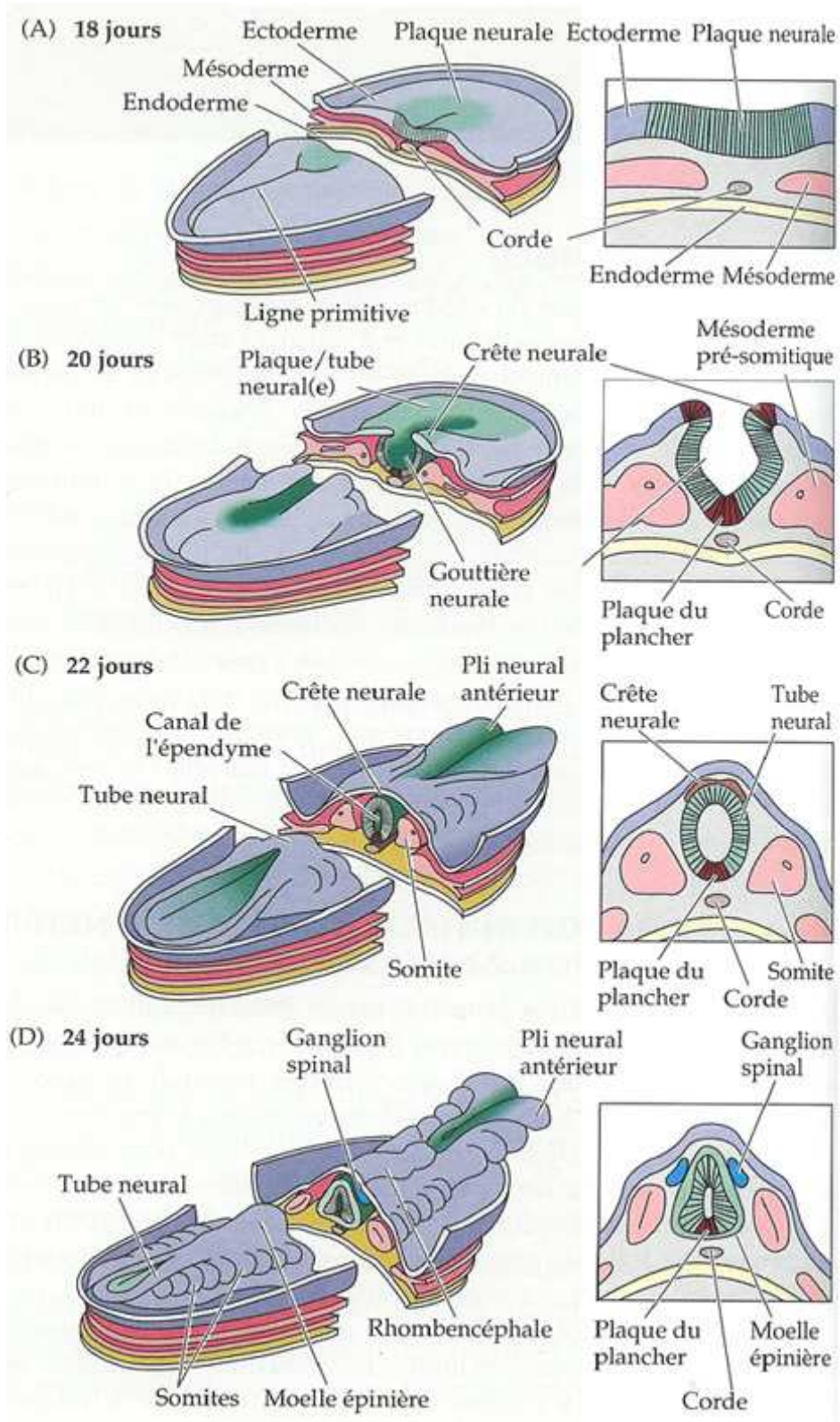


Figure 6 : Neurulation de l'embryon de mammifère. Vues dorsales (à gauche) et transversales (à droite) de l'embryon à différents stades de la neurulation (d'après Purves et al., 1999).

Après la fermeture du tube neural antérieur, les ébauches des principales régions du cerveau prennent forme. Des divisions cellulaires successives au sein du neuroépithélium vont entraîner la formation des trois vésicules cérébrales primaires : le prosencéphale ou cerveau antérieur, le mésencéphale ou cerveau moyen et enfin le rhombencéphale ou cerveau postérieur (Figure 6). La partie la plus rostrale du prosencéphale donnera lieu au télencéphale. Chez les mammifères, ce dernier peut être subdivisé en deux structures : le sous-pallium côté ventral, et le pallium côté dorsal. Le sous-pallium est constitué de l'éminence ganglionnaire latérale, qui sera à l'origine du striatum, de l'éminence ganglionnaire médiane, futur globus pallidus, et de l'éminence ganglionnaire caudale qui deviendra l'amygdale (Deacon et al., 1994). Le pallium regroupe l'archipallium, gauche de l'hippocampe, le néopallium, gauche du néocortex, et le paléopallium. Le diencéphale donnera le thalamus et l'hypothalamus ainsi que les cupules optiques. Enfin, dans la région caudale, le mésencéphale formera le cervelet et le pont alors que le myélocéphale donnera naissance au futur bulbe rachidien.

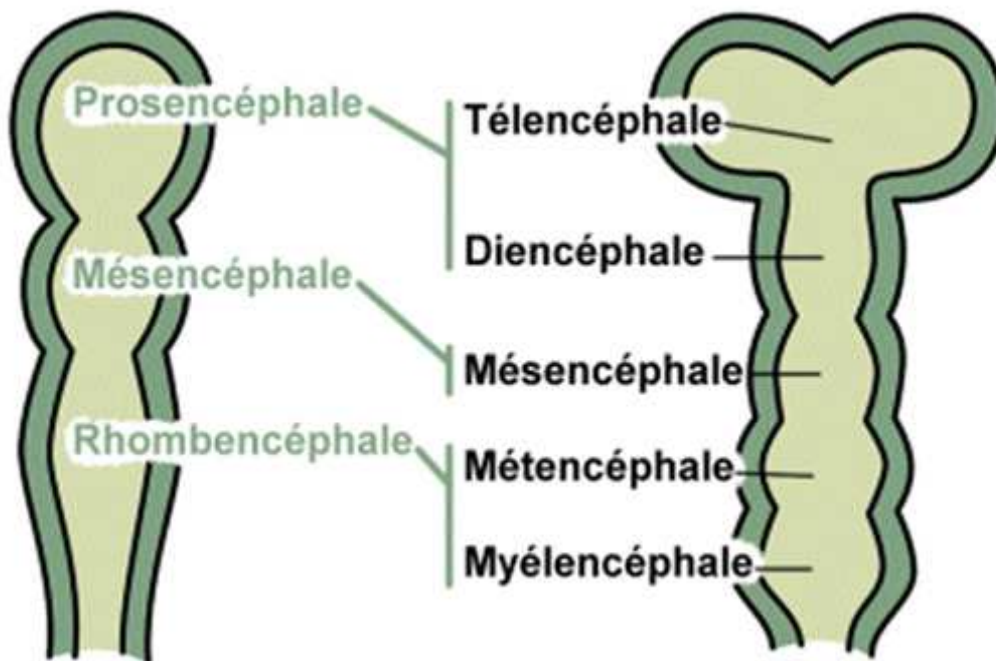


Figure 7 : Schéma des vésicules cérébrales.

Disponible sur le site http://www.apprentoile.u-bordeaux2.fr/WEmbryos/sys_nerv.htm

I.2. Précurseurs neuronaux et gliaux au cours du développement du SNC

Types cellulaires présents dans le système nerveux central

Le SNC est constitué de deux ensembles principaux de cellules : les neurones et les cellules gliales, elles-mêmes subdivisées en trois types cellulaires principaux : oligodendrocytes, astrocytes et cellules épendymaires. Chez l'homme, les cellules gliales constituent 90% des cellules du SNC et occupent environ la moitié du volume du cerveau. Elles assurent un soutien structural et métabolique aux neurones et interviennent dans l'émission et la conduction des signaux nerveux. Ces cellules sont en dialogue permanent avec les neurones qui constituent l'unité structurale fonctionnelle du système nerveux. Leurs besoins métaboliques sont très élevés (ils utilisent 20% du métabolisme du corps alors qu'ils ne constituent que 5% de sa masse). Enfin, les cellules épendymaires séparent le tissu nerveux central du liquide céphalo-rachidien contenu dans les ventricules du cerveau. Le liquide céphalo-rachidien est sécrété par les cellules des plexus choroïdes, qui ne sont pas des cellules nerveuses.

Les astrocytes sont des cellules étoilées dont les prolongements sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins, la pie-mère et les neurones. Les astrocytes permettent l'échange de nutriments entre sang, liquide céphalorachidien et neurones. 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.

Pendant longtemps, on a pensé que les neurones et la glie du SNC étaient produits à partir de deux types distincts de précurseurs qui divergeaient très tôt au cours du développement. Cette théorie était notamment basée sur le fait que la neurogenèse et la gliogenèse interviennent à des stades différents du développement embryonnaire. A l'exception de la microglie, toutes les cellules constituant le SNC dérivent du neuroectoderme. Neurones, astrocytes et oligodendrocytes dérivent d'un précurseur commun, une cellule multipotentielle présente dans le neuroépithélium (Alvarez-Buylla et al., 2001). Ce précurseur peut être considéré comme une cellule souche neurale (CSN), car il possède les caractéristiques qui définissent les cellules souches : auto-renouvellement, capacité de prolifération quasi-infinie et capacité de générer les types cellulaires qui constituent le tissu dont elles sont issues. Le neuroectoderme est un feuillet embryonnaire pseudostratifié qui s'invagine pour former la gouttière neurale (McConnell et al., 1995 ; Temple et al., 2001). Les bords de cette dernière vont se rapprocher puis s'accoler pour délimiter le tube neural, après que se soit détaché de chaque côté un amas cellulaire longitudinal issu de la zone de jonction de la gouttière neurale et de l'ectoblaste. Les cellules des crêtes

neurales constituent un véritable « 4^{ème} feuillet embryonnaire » avec une organisation segmentaire partielle participant à la formation du système nerveux périphérique (neurones ainsi que cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel). De la fermeture de la gouttière neurale s'ensuit la formation du tube neural.

Le tube neural contient les CSN qui, au cours d'une phase d'expansion transitoire vont proliférer par division symétrique (Mione et al., 1997). On estime chez le rongeur qu'au 8^{ème} jour de développement embryonnaire (E8), 50% des cellules du tube neural sont des précurseurs pouvant générer neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Quand aux crêtes neurales elles quittent le neuroépithélium et produisent les neuroblastes du système nerveux périphérique, les glioblastes de la glie périphérique, les cellules de l'ectomésoenchyme de la région céphalique et autres...

La phase d'expansion des CSN est ensuite remplacée par une phase neurogénique (E10-E18, chez les rongeurs) au cours de laquelle les CSN vont se diviser de manière asymétrique pour générer des précurseurs de neurones (neuroblastes), qui vont à leur tour proliférer et coloniser le tube neural.

La dernière phase est la phase gliogénique (E18 – développement post-natal, chez les rongeurs) au cours de laquelle les cellules gliales vont être générées.

I.3. Mise en place des lignages cellulaires

Au cours du développement du SNC de mammifères, les progéniteurs multipotents produisent les cellules des trois lignages principaux : neurones, astrocytes et oligodendrocytes, à des temps et des endroits spécifiques (Temple et al., 2001 ; Ihrle and Alvarez-Buylla, 2008). De manière générale, la différenciation neuronale a lieu à des stades embryonnaires précoces (les marqueurs neuronaux sont détectés chez la souris à partir de E12 et affichent un pic à E15) alors que les deux autres lignages apparaissent plus tardivement (les marqueurs astrocytaires sont exprimés à partir de E16 et les oligodendrocytes matures émergent au stade post-natal). La détermination du devenir cellulaire a donc été décrite comme un choix binaire « neurone *versus* glie ».

Les mécanismes par lesquels une CSN donne naissance aux trois types cellulaires du SNC sont encore mal connus. On sait cependant que ce phénomène procède par étapes successives au cours desquelles les potentialités développementales de la CSN initiale sont progressivement restreintes. Il y a ainsi production de précurseurs intermédiaires aux potentialités de plus en plus limitées qui aboutiront à des cellules différenciées.

La figure 3 représente le schéma de la filiation hypothétique entre la CSN d'origine et ses descendants : neurones, oligodendrocytes et astrocytes, définissant ainsi différents lignages pour chacun des types cellulaires. Même si ces lignages sont encore incertains, on peut distinguer différentes étapes grâce à la mise en évidence de précurseurs intermédiaires, identifiés *in vivo* ou *in vitro*.

La division asymétrique produit une cellule souche identique à la cellule mère et une autre cellule ayant conservé toutes ses potentialités développementales, mais ayant perdu la possibilité de s'autorenouveler (le précurseur multipotentiel). Ensuite, des étapes de restriction des potentialités développementales aboutissent successivement à des précurseurs bipotentiels, puis à des précurseurs considérés comme déterminés, ne possédant plus qu'une seule possibilité d'évolution.

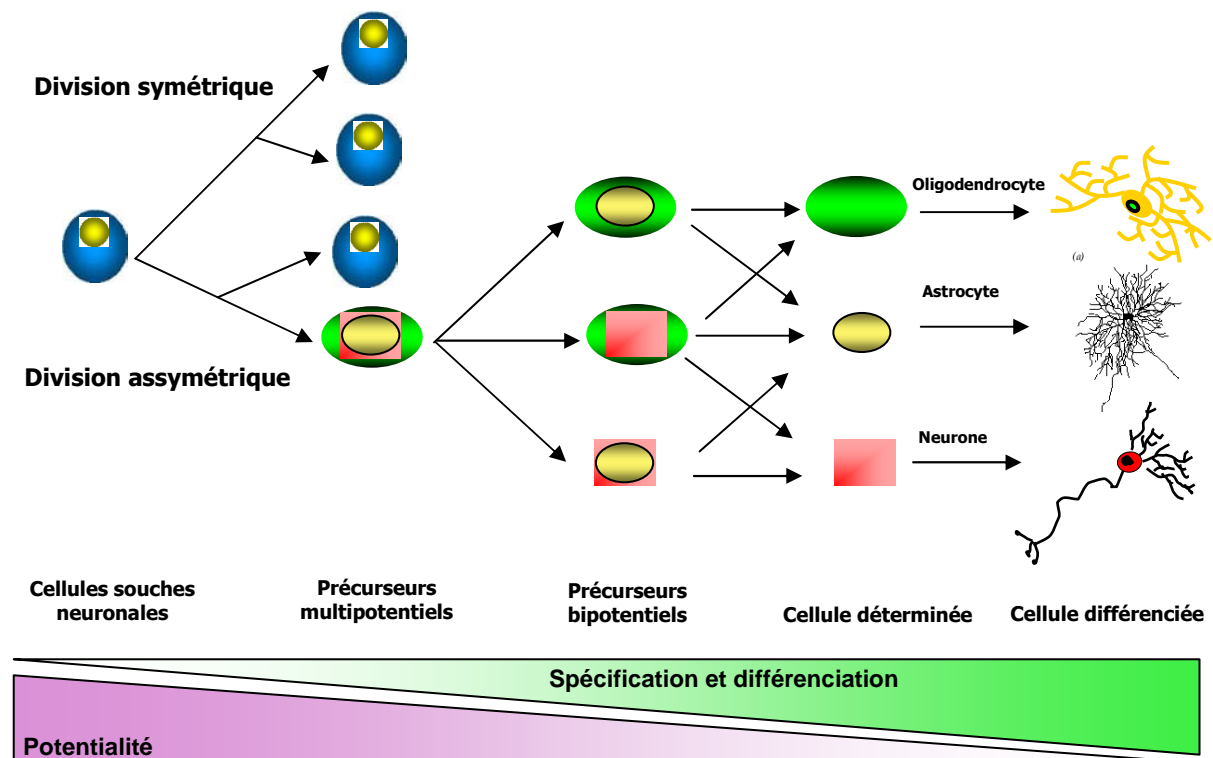


Figure 8 : Représentation théorique de la production des différents lignages à partir des cellules souches neuronales (adaptée de Lillien et al., 1998).

Dans ce manuscrit, nous utiliserons le terme de « différenciation cellulaire » pour caractériser le processus de différenciation cellulaire s'exerçant sur une cellule spécifiée, par lequel par exemple un précurseur de neurone se transforme progressivement en un neurone morphologiquement et fonctionnellement différencié.

Ce processus est également appelé « maturation » par certains auteurs. Le processus de différenciation cellulaire est caractérisé par l'apparition de « marqueurs de différenciation », spécifiques à chaque lignage cellulaire et à l'état de maturité de la cellule, et correspondant à leurs fonctions physiologies finales. Pour identifier une cellule différenciée mature, il est donc très important de choisir des marqueurs de différenciation hautement spécifiques du type cellulaire étudié.

I.4. Maturation cérébrale (différenciation des cellules souches nerveuses fœtales humaines)

La différenciation *in vitro* des cellules souches nerveuses fœtales humaines peut être induite par retrait des agents mitogènes du milieu, par ajout de sérum, ou par exposition à des facteurs mimant le développement nerveux *in vivo* (différenciation « épigénétique »), engageant la différenciation vers un lignage particulier (Caldwell et al., 2001), ou plus récemment, par surexpression de gènes de différenciation. Cette dernière méthode est de plus en plus développée car elle permet un contrôle plus efficace, plus précis et plus reproductible de la différenciation. Le suivi de la différenciation des cellules souches en culture est fondé sur l'expression de protéines définissant un type cellulaire précis et apportant des informations sur le stade de développement des cellules. Souvent le phénotype cellulaire est analysé par immunocytochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre ces différents marqueurs. Par exemple, l'expression de la protéine de filament intermédiaire nestine caractérise les cellules souches neuroépithéliales isolées à partir de tissus foetaux (Cattaneo and McKay, 1990). De la même manière, l'expression de la protéine associée aux microtubules de type V (Map5), (Ohyu et al., 1997) ou de la β -tubuline de type III (β 3tubuline) (Reske-Nielsen et al., 1987; Menezes and Luskin, 1994) caractérise le lignage neuronal précoce, tandis que l'expression de la protéine associée aux microtubules de type II (Map2) (Huber and Matus, 1984) caractérise le lignage neuronal plus mature. L'expression de la protéine fibrillaire gliale acide (GFAP) caractérise le plus souvent le lignage astrocytaire (Reske-Nielsen et al., 1987). Enfin, l'expression de gangliosides mis en évidence par l'anticorps anti-A2B5 (Raff et al., 1983) ou de galactolipides mis en évidence par l'anticorps anti-O4 (Sommer and Schachner, 1981) caractérise majoritairement le lignage oligodendrocytaire précoce, tandis que l'expression de l'enzyme CNPase (Sprinkle et al., 1987) caractérise les oligodendrocytes terminaux. Cette liste de marqueurs n'est évidemment pas exhaustive et un grand nombre de marqueurs font double emploi en désignant les mêmes populations. Cependant, le manque de fiabilité d'un certain nombre de molécules, qui ne sont pas entièrement spécifiques d'un lignage et d'un stade donnés, peut conduire à une mauvaise interprétation de la caractérisation des cellules et de l'orientation de leur différenciation

(Hayman et al., 2006). Il est donc indispensable de rester prudent dans l'analyse des résultats. Les populations nerveuses en culture primaire qui sont capables d'engendrer à la fois des neurones et des cellules gliales après de longues périodes *in vitro* ont également été explorées en tant que source potentielle de tissu nerveux pour les transplantations dans le SNC.

Les mécanismes, par lesquels une cellule souche multipotentielle donne naissance aux différents types cellulaires au cours du développement du système nerveux, étaient encore mal connus. Nous savons cependant que la spécification cellulaire, étape au cours de laquelle la cellule précurseur « choisit » de s'engager dans la voie de développement neuronale ou gliale, est contrôlée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (Edlund et Jessell, 1999).

Les facteurs intrinsèques dépendent de l'histoire de la cellule. Ils correspondent notamment à certains facteurs de transcription. Lorsqu'ils sont inégalement répartis dans la cellule souche au cours d'une division asymétrique, ils lui permettent de générer deux cellules filles non équivalentes. Ainsi chez la drosophile, la distribution asymétrique du facteur de transcription Prospero est responsable de la spécification neurones/cellules gliales dans le SNC. En effet, Prospero active l'expression du gène *glial cells missing* (*gcm*) qui est nécessaire et suffisant pour qu'une cellule possédant la double potentialité neurone/cellule gliale s'engage dans la voie de différenciation gliale (Freeman et Doe, 2001).

On regroupe sous le terme de facteurs extrinsèques les facteurs extérieurs à la cellule, par exemple, des facteurs diffusibles présents dans le milieu extracellulaire, tels que certains facteurs de croissance, ainsi que les interactions entre cellules voisines (interactions cellulaires directes). En plus de leur activité mitogénique, certains facteurs de croissance sont capables d'orienter les CSN vers une voie de différenciation et de favoriser par exemple la production de neurones ou de cellules gliales. Ainsi, le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) (Johe et al., 1996) et les BMP (Rajan et McKay, 1998) orientent *in vitro* le développement des précurseurs multipotentiels vers la voie astrocytaire, alors que d'autres facteurs orientent les CSN vers la voie neuronale. C'est le cas du BDNF, du CNTF, du PDGF, de NT3 et de NT4 (Caldwell et al., 2001).

I.5. Cellules souches neurales adultes

Il y a encore 10 ans, la plupart des manuels scolaires retenaient ce dogme et expliquaient que le cerveau ne pouvait se développer que pendant la vie embryonnaire et au cours de la jeune enfance (Ihrie and Alvarez-Buylla, 2008).

Les cellules souches adultes sont quiescentes et expriment les marqueurs GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et nestine (Gage et al., 1998 ; Garcia et al., 2004). Le profil génétique de ces cellules souches varie en fonction de l'âge de l'individu (Garcia et al., 2004 ; Abramova et al., 2005).

Bien que la neurogenèse persiste dans le cerveau adulte, la naissance de nouvelles cellules neurales est réduite à un pool de cellules qui sont enrichies dans seulement quelques régions du cerveau. Les deux principales zones sont la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Les précurseurs neuronaux, ou neuroblastes, issus de la zone sous-ventriculaire migrent le long de la RMS (*rostral migratory stream*) jusqu'aux bulbes olfactifs et se différencient en inter-neurones. Des cellules souches neurales pourraient résider également dans des régions non neurogéniques du cerveau adulte (Palmer et al., 1999).

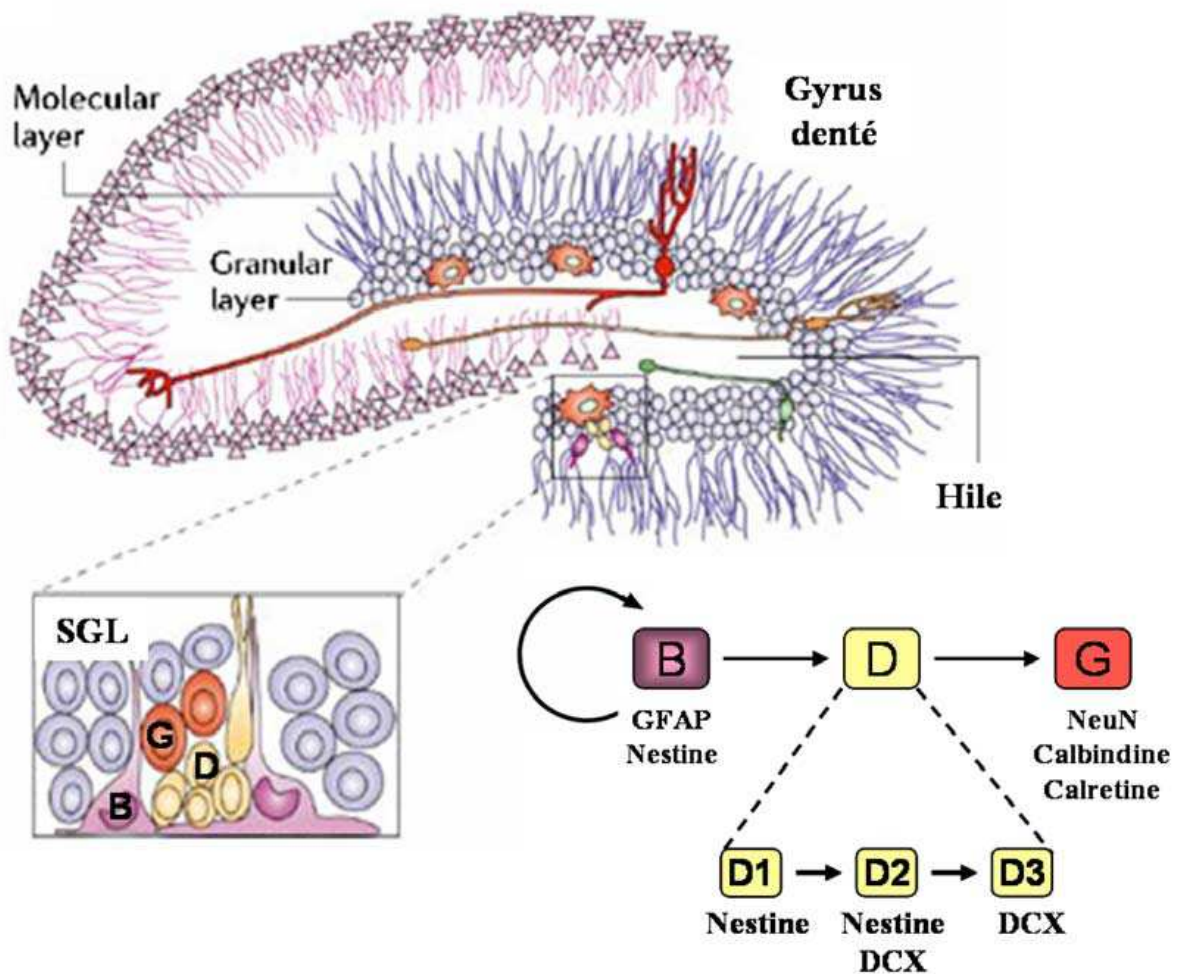


Figure 9 : Organisation de la couche sous-granulaire (SGL) dans le gyrus denté de l'hippocampe adulte (d'après : Seri et al., 2001; Vescovi et al., 2006)

Les astrocytes de la SGL (type « B », rose) possèdent une morphologie de glie radiaire avec une extension pénétrant dans la couche de neurones granulaires (type « G », rouge). Les cellules de type « B » se divisent afin de générer des précurseurs neuronaux immatures (type « D », jaune) qui vont évoluer et se diviser pour donner des neurones matures granulaires. Ce lignage fait également état des principaux marqueurs exprimés au cours de cette neurogenèse adulte.

I.6. Plasticité des cellules souches neurales

Le devenir des CSN transplantées semble être dicté par l'environnement dans lequel les cellules sont placées. Les travaux de (Gage et al., 1995) en sont une belle illustration : bien que les CSN aient la capacité de produire neurones, astrocytes et oligodendrocytes *in vitro*, si les CSN sont transplantées dans l'hippocampe, elles ne vont générer que des neurones hippocampiques. De même, transplantées dans la zone sous-ventriculaire, elles vont générer les types cellulaires présents dans cette zone. Enfin, il semble que si ces mêmes cellules sont transplantées dans des zones du cerveau où aucune neurogenèse n'a lieu, elles ne formeront que des cellules gliales (Gage et al., 1995). Il est également possible d'influencer le comportement des CSN *in vivo* en modifiant leur microenvironnement. Ainsi, une micro injection locale d'EGF (Craig et al., 1996), de bFGF (Kuhn et al., 1997) ou de TGF- α , augmente la prolifération cellulaire dans les zone sous-ventriculaire et dans le hile du gyrus denté de l'hippocampe et le type de cellules générées est influencé par le facteur injecté.

I.6.1. Potentialités des CSN pour la régénération du SNC

La thérapie cellulaire consiste à réparer un organe ou un tissu lésé en y implantant des cellules capables de pallier partiellement ou totalement le dysfonctionnement. Cette stratégie est une alternative aux greffes d'organe et est directement liée aux avancées touchant les cellules souches.

La plasticité des CSN au sein du SNC laisse entrevoir des perspectives pour la réparation de lésions du SNC, accidentelles ou dues à des maladies neurodégénératives - (pour revue, voir (Rossi and Cattaneo, 2002; Klein and Fishell, 2004; Romanko et al., 2004). Par exemple, dans le cas de la maladie de Parkinson, de nombreux travaux ont étudié les potentialités de transplantation des CSN dans des modèles animaux (pour revue, (Roybon et al., 2004). Il a été montré que ces cellules s'engagent dans la voie neuronale et gliale mais que peu d'entre elles vont exprimer la tyrosine hydroxylase (TH) - une enzyme nécessaire à la synthèse de dopamine et marqueur des neurones dopaminergiques lésés dans le cas de la maladie de Parkinson (Svendsen et al., 1996; Nishino et al., 2000). Dans le but d'améliorer ces résultats, d'autres investigateurs, en particulier l'équipe de McKay (1997), ont décidé de transplanter des populations déjà enrichies en neurones dopaminergiques, obtenus *in vitro* à partir de CSN. Dans ce cas, une amélioration significative des capacités comportementales a été observée.(Studer et al., 1998; Sanchez-Pernaute et al., 2001). Des résultats analogues ont été observés en utilisant des neurones dopaminergiques obtenus à partir de cellules ES (Lee et al., 2000). Les cellules

greffées ont une activité électrique normale, montrant que ces cellules ont pu s'intégrer au tissu lésé en développant des synapses fonctionnelles, (Kim et al., 2002). Dans le cas de lésions mécaniques de la moelle épinière, les potentialités des transplantations de CSN ont été étudiées. Il a été montré que des CSN existent dans la moelle épinière adulte mais, après une lésion, elles semblent se différencier exclusivement en astrocytes, participant ainsi à la formation de la cicatrice gliale qui empêche la régénération des axones (Johansson et al., 1999 ; Namiki and Tator, 1999). La transplantation de CSN a donné différents résultats : dans certaines études, elles se différencient uniquement en astrocytes, alors que dans d'autres, elles migrent vers la lésion pour se différencier en neurones (Okano et al., 2003). Dans les cas de différenciation en neurones, une amélioration des fonctions locomotrices a également été rapportée. Comme nous l'avons vu dans ces deux exemples, selon le type de pathologie du SNC, la réparation fonctionnelle nécessite d'une part le remplacement des cellules lésées par le bon type cellulaire et d'autre part le rétablissement de connexions fonctionnelles entre les cellules. Généralement, il est plus prometteur de transplanter des cellules ayant acquis le bon phénotype *in vitro* que de transplanter des cellules multipotentes qui auront le plus souvent tendance à se différencier en cellules gliales. Ces observations montrent qu'il est important de comprendre les mécanismes régulant la quiescence, la prolifération, le déterminisme et la différenciation des CSN. Ces études permettraient d'élaborer des méthodes d'obtention des populations enrichies en neurones du type désiré à partir des cellules souches mais également de développer de nouvelles drogues pouvant potentiellement activer les CSN présentes dans le SNC chez l'adulte et les orienter vers le type cellulaire adéquat.

I.6.2. Un exemple : les greffes de cellules souches nerveuses fœtales humaines

Des greffes de cellules souches nerveuses fœtales humaines ont été réalisées dans le cerveau sain de rongeur (rat et/ou souris) au stade embryonnaire (Brustle et al., 1998), postnatal (Flax et al., 1998) et adulte (Fricker et al., 1999; Buchet et al., 2002). Quel que soit le stade de développement, les cellules migrent à travers l'ensemble du cerveau, s'intègrent sans perturber l'organisation cellulaire et se différencient en fonction de leur site d'intégration. Chez l'adulte, les cellules acquièrent un phénotype préférentiellement neuronal dans les zones de neurogenèse et préférentiellement astrocytaire dans les zones non neurogéniques (Fricker et al., 1999). Ainsi, les cellules souches nerveuses fœtales humaines présentent les caractéristiques nécessaires pour mener à bien une stratégie de greffe efficace, à savoir une survie à long-terme et une intégration au sein des tissus de l'hôte.

L'étape suivante, consistant à évaluer leur capacité à remplacer des cellules endommagées, se place dans une perspective de médecine régénérative. Ainsi, des transplantations de cellules souches nerveuses fœtales humaines dans le SNC lésé de rongeur ou de primate non humain ont montré des améliorations significatives dans des modèles de maladies telles que l'attaque vasculaire cérébrale (Kelly et al., 2004; Roitberg et al., 2006), la maladie de Parkinson (Svendsen et al., 1996), la maladie de Huntington (Armstrong et al., 2000; Lee et al., 2005), les lésions de la moelle épinière (Tarasenko et al., 2007) ou l'épilepsie (Chu et al., 2004).

Un grand nombre de paramètres semblent influencer la survie, la migration et/ou la différenciation des cellules lors des transplantations. Parmi eux, l'hétérogénéité cellulaire apparaît clairement comme l'une des causes principales de variabilité.

Homogénéiser les cellules à greffer permet, dans certains cas, de réduire la variabilité, mais aussi et surtout de contrôler plus précisément le phénotype terminal des cellules transplantées et d'obtenir un nombre significatif de cellules fonctionnelles. Des travaux ont en effet démontré que les cellules prédifférenciées répondaient de manière plus efficace que les cellules neuroépithéliales immatures lors de transplantations (Lepore et al., 2004). D'autre part, les cellules restreintes à un lignage particulier survivent mieux, migrent de façon sélective, s'intègrent activement dans le SNC et limitent les effets délétères (tels que le « sprouting » ou l'allodynie) liés à l'intégration superflue de cellules des autres lignages (Hofstetter et al., 2005; Muramatsu et al., 2005).

Ainsi, mettre en place des systèmes simples et efficaces pour se procurer les phénotypes cellulaires désirés et systématiser leur obtention à partir des cellules souches et progénitrices nerveuses fœtales en culture s'avère désormais nécessaire.

I.7. Modèles d'études

Le développement de modèles cellulaires variés présente un grand intérêt car ils montrent chacun des propriétés originales et caractéristiques qui font d'eux des modèles candidats plus ou moins appropriés pour des tentatives de traitement des lésions du SNC, de maladie neurodégénérative ou encore pour l'étude des conséquences de carences en déterminant nutritionnel de l'homocystéine. Parmi les modèles d'études des phénomènes survenant au niveau du cerveau on peut distinguer :

I.7.1. Cellules du cordon ombilical

Pendant la grossesse, la majeure partie des cellules souches hématopoïétiques se retrouvent dans la circulation et par conséquent dans le cordon ombilical et le placenta. C'est seulement après l'accouchement qu'elles vont migrer au niveau de la moelle osseuse. Par

conséquent, une partie de ces cellules persiste dans le sang du cordon ombilical et constitue ainsi une source de cellules souches multipotentes aisément accessible (Broxmeyer et al., 1992; Piacibello et al., 1998).

Ces cellules souches multipotentes, permettent d'engendrer l'ensemble des cellules composant un tissu ou un organe donné. Les cellules obtenues peuvent présenter des morphologies et des fonctions très différentes mais elles font généralement partie d'un même compartiment tissulaire.

I.7.2. Neurosphères

Le système des neurosphères offre de multiples utilisations en recherche fondamentale et appliquée. Il permet l'étude *in vitro* de mécanismes régulant la spécification des CSN ainsi que ceux régulant la différenciation des précurseurs neuraux. Il permet également d'obtenir des lignées de neurosphères à partir d'animaux transgéniques létaux à des stades précoces du développement et ainsi d'étudier la neurogenèse, dans des contextes génétiques ne le permettant pas *in vivo*.

Il est également possible d'étudier, grâce à ce modèle, l'effet de toutes sortes de facteurs extrinsèques tels que les facteurs de croissance sur le devenir des CSN. Dans ce cadre, les neurosphères peuvent également servir de système de criblage pour tester des chimiothèques de petites molécules et ainsi découvrir des drogues potentiellement capables de « réveiller » les cellules souches présentes dans le cerveau adulte, de stimuler leur prolifération et/ou d'orienter leur spécification vers une voie donnée, la voie neuronale par exemple. Le contrôle supplémentaire de la différenciation des neuroblastes vers un type particulier de neurones permettrait ainsi de disposer d'un matériel quasi-illimité de greffe à utiliser dans le traitement de maladies neurodégénératives (par exemple, obtention de neurones GABAergiques et DOPAMINERGiques respectivement dans le cas des maladies de Huntington et de Parkinson).

Deux tissus peuvent aisément contribuer à la production de neurosphères, le système olfactif et le SNC.

Le système olfactif montre dans des conditions normales ou expérimentales un renouvellement neuronal continu tout au long de la vie. Ceci est lié à la présence de cellules olfactives capables, dans les différentes conditions, de produire de nouveaux neurones. Elles sont situées dans la partie basale de l'épithélium (Graziadei et Monti-Graziadei, 1977).

De nombreuses similarités existent entre les cellules souches du système nerveux central et les cellules souches olfactives. Ainsi, la neurogenèse olfactive semble avoir de nombreux points communs avec la neurogenèse du système nerveux central. Du fait de sa facilité d'accès,

l'étude de la neurogenèse au niveau de l'épithélium olfactif est donc intéressante. Il est toutefois important de ne pas négliger que quelques différences même mineures existent entre ces deux types de neurogenèse.

I.7.3. Lignée H19-7/IGF-IR

Comparativement aux autres cellules souches, les cellules nerveuses extraites de tissus fœtaux, ou cellules neuroépithéliales fœtales, présentent un certain nombre d'avantages non négligeables pour le traitement des maladies neurodégénératives. Elles ont la particularité d'être déjà partiellement orientées dans la voie de différenciation nerveuse (Davis and Temple, 1994). *In vitro*, elles peuvent être amplifiées, différenciées dans les trois lignages cellulaires principaux du SNC. Un grand nombre d'expériences ont révélé le potentiel de ces cellules à survivre, migrer et se différencier après greffe chez l'animal.

D'autre part, l'utilisation de cellules fœtales humaines est moins sujette à controverse que celle des cellules souches embryonnaires. Cette plus grande tolérance émane vraisemblablement du fait que les fœtus sont obtenus après interruption volontaire de grossesse et qu'ils étaient considérés, encore récemment, comme des déchets post-opératoires.

Les cellules souches nerveuses fœtales humaines apparaissent donc comme un outil approprié pour étudier, anticiper et optimiser le comportement des cellules lors de transplantations dans le SNC. Cependant, la réalisation de telles lignées stables de cellules souches nerveuses fœtales humaines étant fastidieux et onéreux, l'utilisation de lignées nerveuses établies issues de rongeurs, semble une alternative non négligeable.

La lignée H19-7 est dérivée de l'hippocampe d'embryons de rats au stade de 17 jours (E17). Les cellules sont transformées de façon stable et rendues immortelles par la transfection avec l'antigène « grand T » du rétrovirus SV40 (*Simian virus 40*), portant une dénaturation thermosensible.

C'est une lignée pure, composée uniquement de progéniteurs neuronaux qui prolifèrent à une température permissive de 33°C en présence de l'antigène T actif et de sérum. L'induction de la différenciation cellulaire se fait à la température de 39°C, dans un milieu de différenciation supplémenté par un milieu riche en facteurs de croissance.

Cette lignée est souvent utilisée pour les études de proliférations (divisions ou étude des processus mitotiques) ou de différenciation.

- Applications des modèles de cellules souches et de progéniteurs neuronaux

Les systèmes présentant les caractéristiques des cellules souches neuronales offrent de multiples utilisations en recherche fondamentale et appliquée. Ils permettent l'étude *in vitro* de mécanismes régulant la spécification des CSN ainsi que ceux régulant la différenciation des précurseurs neuronaux. Ils permettent également d'obtenir des lignées à partir d'animaux transgéniques létaux à des stades précoces du développement.

Il est également possible d'étudier, grâce à ces modèles, l'effet de toutes sortes de facteurs extrinsèques tels que les facteurs de croissance sur le devenir des CSN. Dans ce cadre, les neurosphères ou les progéniteurs peuvent également servir de système de criblage pour tester des chimiothèques de molécules et ainsi découvrir des drogues potentiellement capables de « réveiller » les cellules souches présentes dans le cerveau adulte, de stimuler leur prolifération et/ou d'orienter leur spécification vers une voie donnée, la voie neuronale par exemple. Le contrôle supplémentaire de la différenciation des neuroblastes vers un type particulier de neurones permettrait ainsi de disposer d'un matériel quasi-illimité de greffe à utiliser dans le traitement de maladies neurodégénératives (par exemple, obtention de neurones GABAergiques et DOPAminergiques dans le cas des maladies de Huntington et de Parkinson respectivement).

I.7.4. Cellules issues de neuroblastomes

Le neuroblastome, également appelé sympathoblastome, est une tumeur maligne développée aux dépens des cellules de la crête neurale, qui donnent naissance au système nerveux sympathique. Il s'agit de la tumeur solide la plus fréquente chez l'enfant (8 à 10 % des cancers avant 15 ans) et en particulier de l'enfant très jeune (moyenne d'âge 4 ans avec 90 % qui ont moins de 5 ans). Son incidence est de 1 à 3 cas pour 100 000 enfants âgés de 0 à 14 ans. Il n'y a pas de causes ni de facteurs reconnus favorisant la survenue d'un neuroblastome.

Le degré de différenciation des neuroblastomes a été très étudié dans le but d'élaborer une thérapie qui consisterait à induire la différenciation des tumeurs pour stopper leur prolifération. Ce concept a fait ses preuves au niveau clinique où les dérivés de l'acide rétinoïque sont utilisés pour le traitement des neuroblastomes et de la leucémie promyélocytaire aiguë (Matthay et al., 1998). Les neuroblastomes sont ainsi devenus un modèle d'étude de la thérapie contre le cancer par la différenciation.

Des lignées humaines et murines dérivées de ces tumeurs sont utilisées comme modèles. Il s'agit principalement de la lignée SK-N-SH (Biedler et al., 1973), obtenue à partir d'une métastase (provenant de ganglion sympathique) présente dans la moelle osseuse d'une fillette de

4 ans, et de sa lignée dérivée SHSY-5Y (Biedler et al., 1978). Il existe également également un modèle murin, la lignée NIE-115, sous clone de cellules C-1300 établie en 1972 par Amano et al.

II. Pathologies du développement du cerveau en lien avec l'homocystéine

II.1. Les effets cellulaires de l'homocystéine

II.1.1. Stress oxydant

Les concentrations cellulaires en différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) résultent de l'équilibre entre les systèmes producteurs et les capacités antioxydantes. Dans les conditions normales, la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Dans certaines conditions et à la suite de certains stimuli, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de ROS ou par une diminution des systèmes de défense, voire une association des deux phénomènes. (Carrière et al., 2006).

Ainsi, un excès de production de ROS ou une diminution de l'activité des systèmes antioxydants conduisent à l'apparition d'un stress oxydant et provoque des lésions directes, irréversibles et non spécifiques des molécules biologiques environnantes provoquant une toxicité cellulaire (HO et al., 2003)

Le groupe Thiol de l'Hcy est oxydé pour former des ROS, suggérant que l'Hcy induit des lésions/dysfonctions cellulaires à travers un mécanisme impliquant l'auto-oxydation et des lésions oxydatives de protéines cibles. Des études récentes ont également montré que l'Hcy est en grande partie impliquée dans les réactions cellulaires antioxydantes et réductrices (Zappacosta et al., 2001). En effet, la régulation de la voie de transsulfuration de l'Hcy est très sensible aux conditions de stress oxydant dans le maintien des réserves intracellulaires de glutathion (Vitvitsky et al., 2003).

L'homocystéine provoque une production de ROS, et de nombreuses études ont mis en évidence le rôle majeur joué par ces composés dans la survenue de lésions neurodégénératives (HO et al., 2003).

De plus, l'homocystéine sensibilise les cellules au stress oxydant en diminuant l'expression de nombreuses enzymes anti-oxydantes dont la glutathion peroxydase (GPX) et l'hème oxygénase-1 (HO-1) (Outinen et al., 1999). Une diminution du pouvoir anti-oxydant a également été rapportée chez les sujets atteints de maladie neurodégénérative (Franco et al., 2009).

II.1.2. L'apoptose

L'apoptose physiologique au cours du développement cérébrale, permettant de supprimer des cellules surnuméraires ou inadaptées, et l'apoptose pathologique qui se produit dans le cerveau à tous les âges de la vie partagent les mêmes mécanismes lors de la phase d'exécution. Cependant, des différences notables existent dans les mécanismes qui déclenchent l'apoptose. Alors que la carence en facteurs trophiques a un rôle prééminent lors de l'apoptose au cours du développement, les événements toxiques résultant d'accidents biochimiques ou génétiques semblent être responsables des phénomènes apoptotiques associés aux pathologies neurodégénératives. A ce titre, l'apoptose neuronale est un mécanisme de neurodégénérescence qui intervient en réaction à différents stress cellulaires (neurotrauma, asphyxie...) ainsi qu'au cours des maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. Une hypothèse générale actuelle concernant la cause des maladies neurodégénératives est la toxicité d'agrégats protéiques anormaux, qui déclencherait un processus apoptotique (Yuan et Yankner, 2000).

Des travaux ont démontré que la thiolactone, un dérivé cyclique thioester de l'Hcy (Jakubowski et al., 1997), induit la mort par apoptose des cellules HL-60, par activation de la caspase-3 (Huang et al., 2001). Cependant, aucune étude n'a montré que l'Hcy peut aussi activer les caspases 7 et 12 impliquées dans le stress du réticulum endoplasmique et l'apoptose (Rao et al., 2001).

II.1.2.1. La voie extrinsèque des récepteurs de mort

La voie extrinsèque est déclenchée par des ligands extracellulaires (solubles ou présentés par d'autres cellules), qui activent les récepteurs de mort (Thorburn et al., 2004 ; Debatin et al., 2004). Les récepteurs de mort font partie de la superfamille des récepteurs au TNF (*tumor necrosis factor*) (Bhardwaj et al., 2003) tels que TNF α , FasL/CD95L (*fibroblast-associated ligand*), et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*).

Les récepteurs de mort peuvent être divisés en deux groupes selon la nature des molécules qui s'associent à leur domaine cytoplasmique.

Le premier groupe comporte les récepteurs CD95, TRAILR1 et TRAILR2, qui vont tous former un complexe multiprotéique périmembranaire nommé DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) qui permet l'activation des caspases 8 et 10 (Peter et al., 2003). Le second groupe rassemble les récepteurs TNF-R1, DR3 et DR6 dont la signalisation est mal connue. Les

récepteurs TNF-R1 et DR3 pourraient recruter FADD par l'intermédiaire de la protéine TRADD (*TNFRAssociated Death Domain protein*) (Hsu et al. 1995),

Le modèle d'activation le mieux documenté est l'activation de la procaspase 8 par le récepteur Fas : la stimulation d'un complexe de trois récepteurs Fas entraîne un changement de leur conformation qui permet au niveau de leur partie cytoplasmique de rapprocher entre elles les procaspases 8. Ce rapprochement induit leur dimérisation et leur activation par clivage autoprotéolytique. Le clivage entre les deux sous-unités de la procaspase 8 aboutit à la formation d'une caspase 8 active.

Une fois la caspase 8 activée, l'exécution de l'apoptose peut se faire de deux façons selon le type cellulaire (Scaffidi et al., 1998). Les cellules dites de type I sont caractérisées par des niveaux élevés de composants du DISC et expriment une plus grande activité caspase 8. Dans ces cellules, la caspase 8 active directement les caspases effectrices 3 et 7 qui détruisent la cellule. Dans les cellules de type II, les niveaux d'expression des composants du DISC et de caspase 8 activée sont plus faibles. Dans ces cellules, l'exécution de l'apoptose nécessite une amplification du système d'activation des caspases effectrices qui passe par l'activation de la voie mitochondriale via le clivage de la protéine Bid.

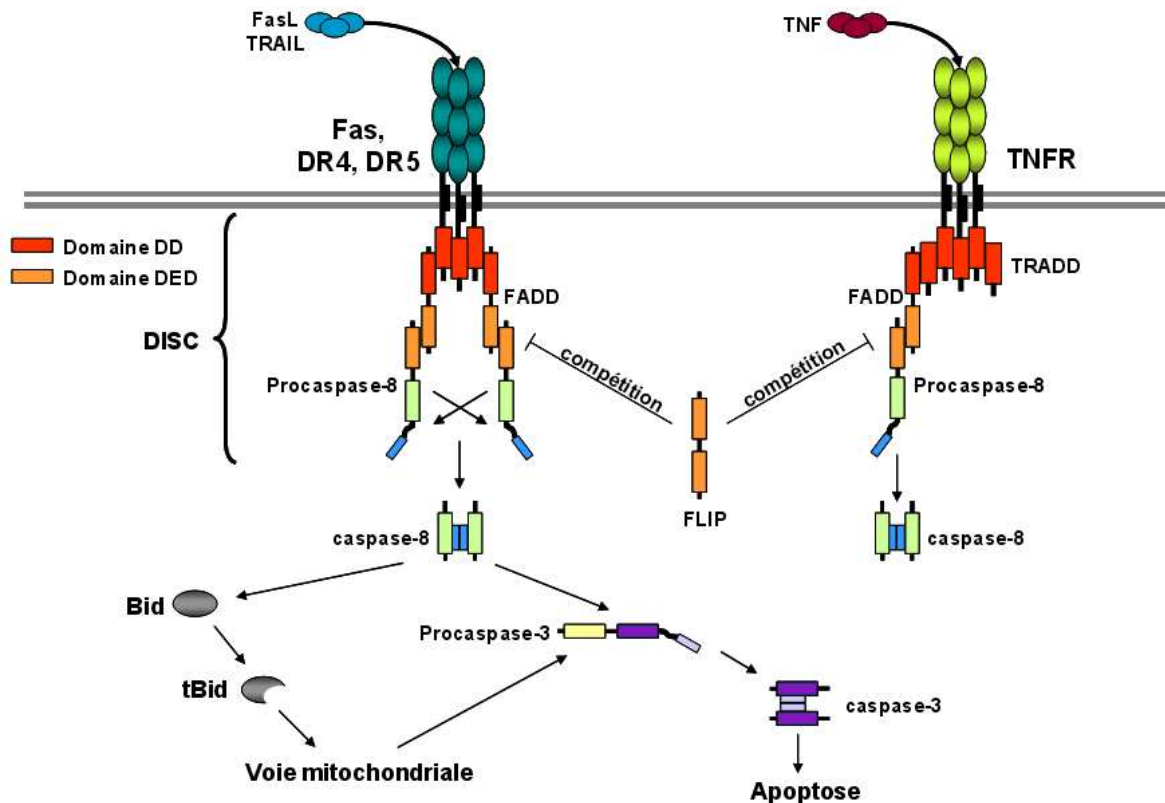


Figure 10 : La voie extrinsèque de l'apoptose ou voie des récepteurs de mort. Après fixation des ligands, les récepteurs de mort se trimérisent et recrutent grâce à leur domaine de mort (domaine DD) la protéine FADD, soit directement (Fas, DR4 et DR5) soit indirectement par l'intermédiaire de TRADD (TNF-R1). Les protéines FADD recrutent, grâce à leur domaine effecteur de mort (domaine DED), les caspases initiatrices, les procaspases 8 et 10, pour former un complexe DISC. Les caspases initiatrices s'activent par auto-clivage et activent la caspase effectrice, caspase 3. La caspase 8 active peut cliver Bid en une forme tronquée tBid, qui va se lier à Bax et activer la voie mitochondriale. Un régulateur négatif de la caspase 8, FLIP, qui entre en compétition avec les procaspases 8 et 10 pour la fixation à FADD. *DD* = *Death Domain*, *DED* = *Death Effector Domain*, *FADD* = *Fas-Associated Death Domain*, *TRADD* = *TNFR-Associated Death Domain*, *DR* = *Death Receptor*, *TNFR* = *Tumor Necrosis Factor Receptor*, *FLIP* = *FLICE Inhibitory Protein*, *DISC* = *Death-Inducing Signaling Comple*. (d'après la thèse de David Léger, 2006).

- TNF-alpha et homocystéine

Le *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF α) est une cytokine pro-inflammatoire multifonctionnelle. Le TNF α exerce des effets sur le métabolisme des lipides, la coagulation sanguine, l'insulino-résistance et la fonction endothéliale. *In vivo*, le TNF α est capable d'induire une nécrose hémorragique (Carswell et al., 1975). *In vitro*, le TNF α a des effets cytostatiques et cytotoxiques contre les cellules tumorales humaines ; les effets cytotoxiques proviennent de son association au *Tumor Necrosis Factor Receptor 1* (TNFR-1) (Schall et al., 1990). Les mécanismes pour lesquels le TNF α induit une cytotoxicité sont variables ; ils incluent l'activation de la caspase 8 (Vercammen et al., 1998), l'activation de la Phospholipase A2

(Suffys et al., 1987), la génération des ROS (Zimmerman et al., 1989), et les altérations de l'ADN (Dealtry et al., 1987).

- **TNF-alpha et S-adénosylméthionine (SAM)**

Il a été suggéré que la SAM a une influence sur la cytotoxicité du TNF α . Ce processus peut impliquer les Protéines G (et la transméthylation. L'inhibition de réactions de transméthylation est associée à une surproduction du TNF α . En effet, sur un modèle de cellules tumorales (lignées résitantes au TNF : L929 M1, L929 M5 et HeLa), il a été montré que les cellules exposées à l'adénosine et/ou à l'homocystéine, produisent davantage de TNF α (Ratter et al., 1999).

Sur un modèle animal d'alcoolisme, la relation entre le TNF α et la SAM a été testée avec des souris *wild-type* et *knockout* en TNFR-1. Ces souris ont été exposées à l'alcool par voie intra gastrique pendant 4 semaines. Les résultats montrent que les niveaux plasmatiques d'Hcy étaient 7,4 fois plus élevés chez les souris *wild-type* et 6,1 fois plus élevés chez les *knock-out* en TNFR-1. Dans ce même modèle, pour tester l'hypothèse que les taux élevés en TNF α dépendaient de la SAM, certaines souris ont reçu un régime riche en betaine, la différence entre les deux groupes de souris n'était pas significative (Ji et al., 2003).

- **TNF α et Cystathionine β -synthase (CBS)**

La CBS catalyse la première des deux étapes de la transsulfuration de l'Hcy, elle transforme l'Hcy en cystéine. La cystéine est un précurseur de la glutathion qui joue un rôle important dans l'homéostasie intracellulaire et protège les cellules contre un stress oxydant. De manière opposée, le TNF α provoque des lésions cellulaires par différents mécanismes comme la surproduction des ROS (Li et al., 1998). Cependant, la capacité du TNF α de détruire les cellules semblerait être réduite uniquement aux cellules tumorales et virales (Beutler et al., 1988). En effet, les cellules normales sont en général insensibles aux effets cytotoxiques du TNF α , par un mécanisme très probablement associé à une capacité anti-oxydante, en augmentant la synthèse de glutathion (Morales et al., 1997).

Zou et Banerjee (2003), ont étudié la CBS dans les cellules hépatiques traitées au TNF α et dans un modèle animal de souris pour évaluer l'effet du lipopolysaccharide (LPS) sur la formation de ROS dans la voie de la transsulfuration. Leurs résultats montrent que le TNF α augmente l'activité de la CBS et la concentration de glutathion dans les cellules hépatiques, en plus d'une protéolyse ciblée de la CBS dans le foie de souris traitées avec du LPS. Ces données montrent qu'il existe une relation entre la CBS et le TNF α .

II.1.2.2. La voie intrinsèque mitochondriale

A la différence de la voie extrinsèque, la voie intrinsèque, ou mitochondriale, a pour éléments déclencheurs des signaux intracellulaires comme un choc osmotique ou thermique, un arrêt du métabolisme, des dommages irréversibles de l'ADN, un déficit en cytokines. Les différentes voies de signalisation mises en jeu convergent vers la formation de pores de taille variable au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Loo et al., 2001 ; Saelens., 2004).

L'engagement de la mitochondrie dans la mort cellulaire est largement documenté et implique la perméabilisation de sa membrane. Le mécanisme par lequel celle-ci survient n'est pas franchement élucidé et reste un sujet de controverse mais contribue à la dissipation du gradient ionique dans la mitochondrie. La mitochondrie est considérée comme un centre décisionnel, puisque les signaux inducteurs et inhibiteurs de mort y convergent. Si les signaux de mort l'emportent, la membrane mitochondriale est perméabilisée. La mitochondrie renferme des protéines potentiellement dangereuses et leur libération apparaît comme l'événement critique pour le déclenchement de l'apoptose. En effet, un véritable cocktail de protéines effectrices de l'apoptose (Newmeyer et Ferguson-Miller, 2003), normalement séquestrées, dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie, est libéré (Green et Reed, 1998 ; Kroemer et Reed, 2000), de même que des espèces toxiques (ex: ROS) qui restent normalement confinées dans la mitochondrie sont relarguées.

- La voie mitochondriale dépendante des caspases

La voie principale d'activation des caspases est la voie dépendante de la mitochondrie. La perméabilisation de la mitochondrie conduit à la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et à la sortie de plusieurs protéines proapoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. Elle implique de nombreux acteurs.

- Le cytochrome *c* (Cyt-*c*) : il est synthétisé sous forme d'un précurseur, l'apo-cytochrome *c*. Celui-ci est ensuite transporté dans la mitochondrie, où il est transformé en protéine globulaire appelée holo-cytochrome *c* qui permet le transport d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ravagnan et al., 2002). En réponse à un stimulus, le Cyt-*c* peut être transloqué de la mitochondrie vers le cytoplasme de la cellule.

Dans la majorité des cas, la libération du Cyt-*c* est dépendante de l'activité des caspases (Bossy-Wetzel et al., 1998) mais son mécanisme de libération suscite des controverses. Heiskanen et al., 1999) ont montré que la libération du Cyt-*c* et la chute du $\Delta\Psi_m$ avaient lieu en même temps.

- L'Apaf-1 : (*apoptosis-protease activating factor 1*) comprend un domaine CARD (*caspase recruitment domain*) dans la partie N-terminale, et un domaine C-terminal contenant plusieurs répétitions WD-40 impliquées dans les interactions protéines/protéines (Cain et al., 2002). Ces répétitions sont nécessaires à sa liaison au Cyt-c et joue également un rôle important dans le recrutement de la pro-caspase 3. Dans des conditions normales, le domaine CARD n'est pas exposé et ne peut donc pas interagir avec la caspase 9. En présence d'ATP et de Cyt-c, Apaf-1 change de conformation et peut donc interagir avec la caspase 9 grâce à l'exposition de CARD. La partie centrale possède un domaine ATPase et l'hydrolyse de l'ATP semble être nécessaire à la formation de l'apoptosome (Cain et al., 2002).

- L'apoptosome : est constitué d'Apaf-1, de deux Cyt-c et de la pro-caspase 9 (Cain et al., 2001).

La concentration de potassium intracellulaire inhibe la formation de l'apoptosome en réduisant l'activation des caspases. Cette inhibition peut être supprimée en présence d'une grande quantité de Cyt-c. Le Cyt-c facilite la liaison de l'ATP à Apaf-1 en favorisant l'exposition du domaine de liaison par changement de la conformation de Apaf-1. Rodriguez et Lazebnik (1999) ont montré que la caspase 9 clivée était présente dans l'apoptosome et dans le cytoplasme, mais elle n'est réellement active que quand elle est liée à l'apoptosome.

Les protéines chaperonnes HSP (*heat shock protein*) qui sont induites lors de différents stress comme l'élévation de la température ou la carence en glucose, facilitent la formation tridimensionnelle des protéines et la survie des cellules. Les HSP ont été aussi impliquées dans l'inhibition de l'apoptosome. HSP27 se fixe au cytochrome c et l'empêche d'interagir avec Apaf-1 (Germain et al., 2003), HSP90 se fixe à Apaf-1 et inhibe son oligomérisation (Pandey et al., 2000) et HSP70 empêche l'oligomérisation d'Apaf-1 (Saleh et al., 2000) et le recrutement de caspase 9 (Beere et al.). Récemment, l'équipe du Dr Wang a isolé deux autres protéines régulatrices de l'apoptosome. La rothymosine α (ProT) qui inhibe la multimérisation d'Apaf-1 et PHAP (*HLA-DRAssociated Protein*) qui favorise l'activation de caspase 9 (Jiang et al., 2003). Cependant leur mécanisme d'action est encore inconnu.

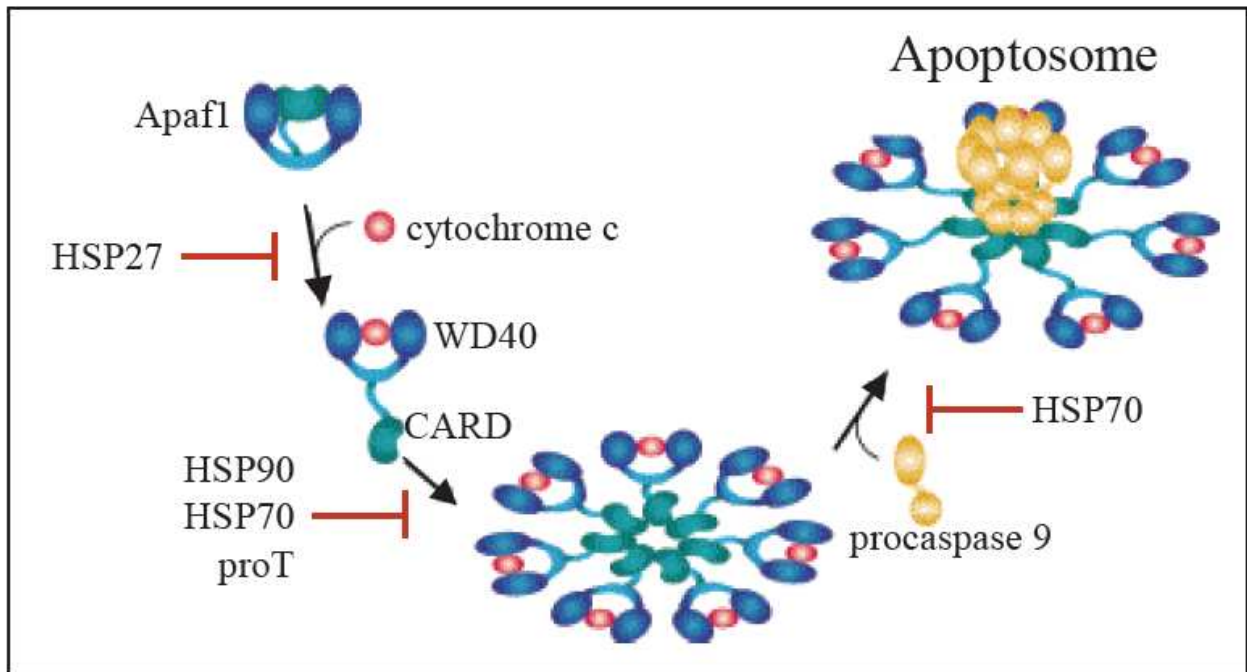


Figure 11: Formation de l'Apoptosome et son inactivation

Dans le cytoplasme, le cytochrome c vient se fixer au domaine WD40 de la protéine Apaf1, entraînant un changement de conformation qui permet l'oligomérisation d'Apaf1 sous forme d'heptamère. Les domaines CARD des molécules d'Apaf1 se retrouvent au centre de l'Apoptosome et vont pouvoir recruter des procaspases 9. Cette disposition des domaines CARD d'Apaf1 permet de concentrer les procaspases 9, ce qui favorise leur activation par dimérisation. Les différentes étapes de formations de l'Apoptosome sont inhibées par plusieurs protéines antiapoptotiques. HSP27 inhibe la fixation du cytochrome c à Apaf1 ; proT, HSP70 et 90 inhibent la multimérisation d'Apaf1 et HSP70 inhibe le recrutement de la procaspase 9. <http://www.metafzikbilgiler.com/image/apoptosome.jpg>

- Les caspases (*cysteine aspartate-specific proteases*) correspondent aux acteurs moléculaires majoritaires de l'apoptose, elles ont un rôle essentiel dans les phases d'initiation et d'exécution de l'apoptose. Elles sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, les procaspases. L'activation des procaspases se fait par des coupures protéolytiques intra- ou intermoléculaires. Une caspase active est formée par dimérisation de deux grandes et deux petites sous-unités et comprend donc deux sites catalytiques, à l'exception de la caspase 9 dont la forme dimérique ne présente qu'un seul site actif. Les procaspases ont une structure primaire très conservée qui comprend un prodomaine amino terminal de taille variable, un domaine central correspondant à la grande sous-unité et un domaine carboxy-terminal qui correspond à la petite sous-unité.

L'activation des caspases est séquentielle et débute par le clivage auto-protéolytique des caspases initiatrices. Les caspases initiatrices possèdent un prodomaine long, domaine CARD (*CAspase Recruitment Domain*) pour les caspases 1, 2, 4 et 9 ou domaine DED (*Death Effector Domain*) pour les caspases 8 et 10. Ces prodomaines longs permettent aux caspases initiatrices

d'être recrutées au sein de complexes multiprotéiques qui servent d'inducteurs de proximité (Boatright et al., 2003) au sein desquels elles pourront être activées par dimérisation et clivage autoprotéolytique. Ces complexes multiprotéiques sont l'apoptosome, qui active la procaspase 9, et le DISC qui active les procaspases 8.

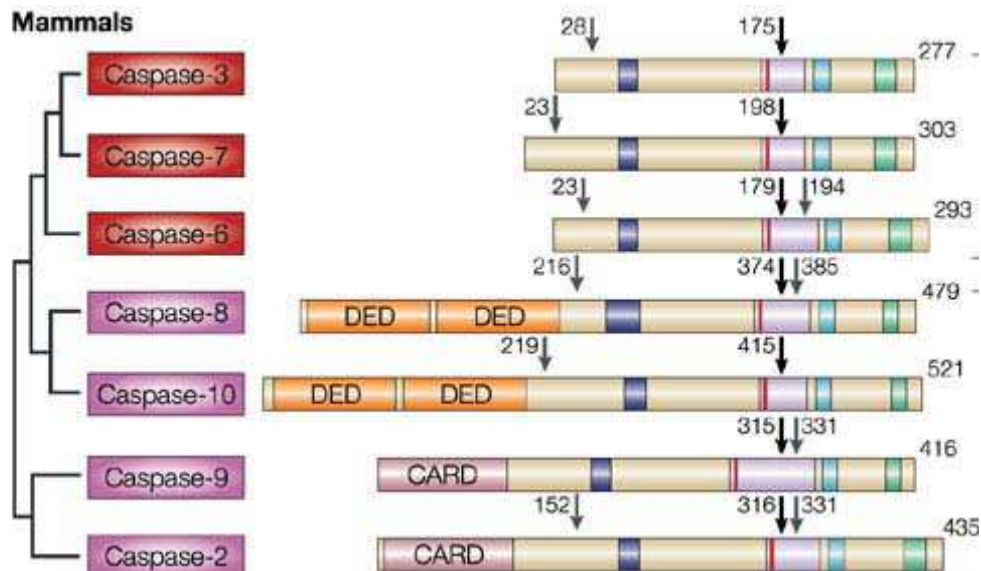


Figure 12 : Les principales caspases impliquées dans l'apoptose (Riedl et al., 2004)

Les caspases possèdent toutes trois domaines : un prodomaine amino terminal, un domaine central long (p20) et le domaine court (p10). Les caspases initiatrices possèdent un long prodomaine contenant deux domaines DED (caspases 8 et 10) ou un domaine CARD (caspases 9 et 2). Les caspases effectrices 3, 6 et 7 possèdent un prodomaine court. Les caspases sont activées par clivage protéolytique (sites de clivage représentés par les flèches).

- La voie mitochondriale indépendante des caspases

A partir de la mitochondrie, deux facteurs particuliers, AIF (*apoptosis-inducing factor*) et Endonucléase G, (endo G), vont être relocalisés dans le noyau et vont favoriser la mort cellulaire par des mécanismes indépendants des caspases. La protéine AIF est une flavoprotéine impliquée dans la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN en larges fragments (Susin et al., 1999). La ribonucléase G est une endonucléase qui coopère avec AIF pour dégrader l'ADN.

- La protéine AIF : est une flavoprotéine mitochondriale. Le précurseur de l'AIF est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie (Susin et al., 1999). Une fois dans l'espace intermembranaire, la protéine change de conformation. C'est une protéine bifonctionnelle ayant probablement une activité oxydoréductase et un rôle pro-apoptotique (Ye

et *al.*, 2002). Après exposition de la cellule à un stimulus, l'AIF est transloqué de l'espace intermembranaire vers le cytosol puis vers le noyau. Ce phénomène précède généralement la libération du cytochrome c. L'AIF induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN par interaction directe avec l'ADN. De plus, l'AIF provoque une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et donc la libération du cytochrome c et de la pro-caspase 9, grâce à un cofacteur cytosolique (Susin et al., 1999). Les effets de l'AIF sont abolis par la surexpression de Bcl-2 et sont les mêmes dans des cellules ayant ou non des activités caspases: l'AIF agit donc indépendamment des caspases. (Li et al., 2001).

- L'endonucléase G, est une nucléase mitochondriale non-spécifique très conservée chez les eucaryotes (Li et al., 2001). Elle est codée par un gène nucléaire et probablement impliquée dans la réplication du génome mitochondrial. Pendant l'apoptose, l'endo G est relarguée de la mitochondrie puis transloquée dans le noyau. Elle digère l'ADN en absence d'activité caspase (van Loo et al., 2001). L'endo G pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Widlak et al., 2001) mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques (Samejima et al., 2001).

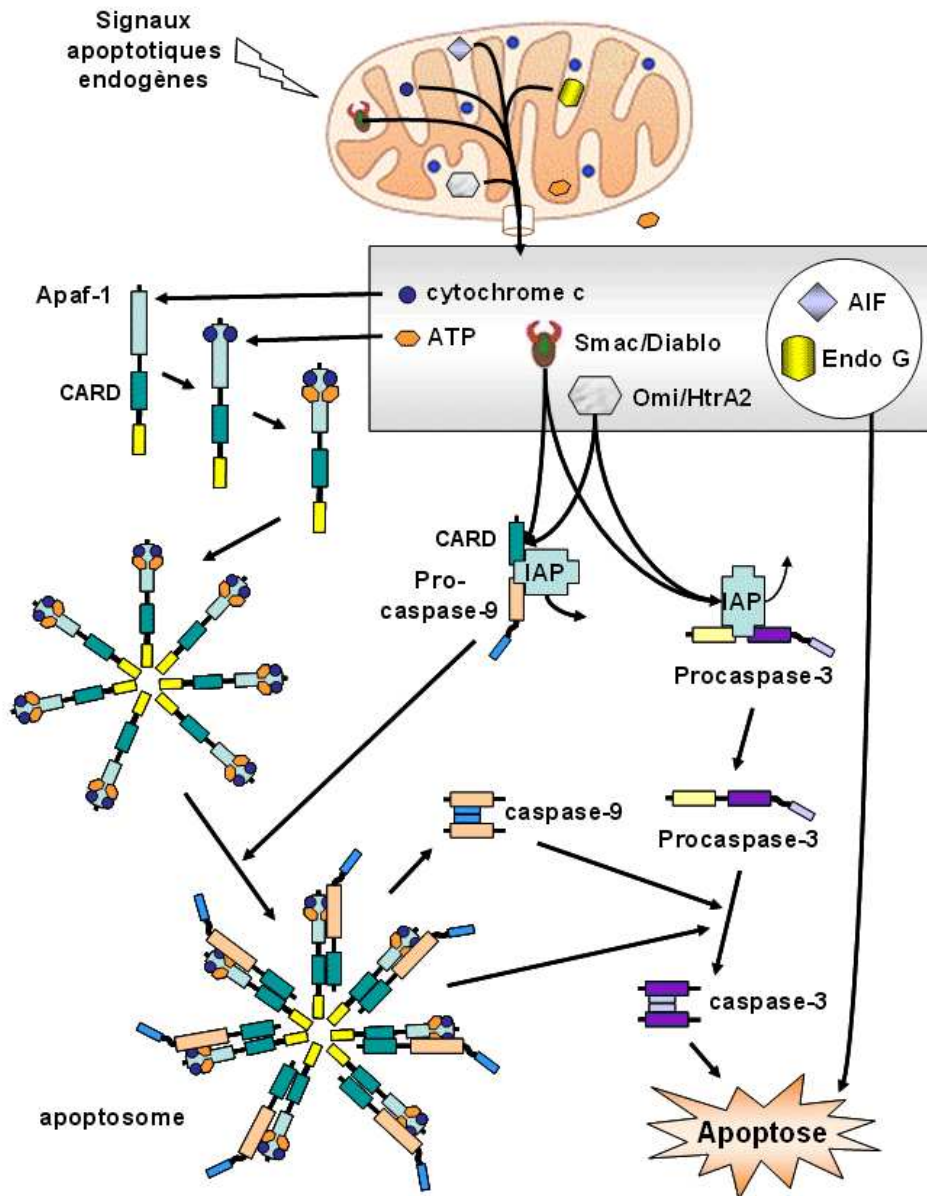


Figure 13 : La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale. La perturbation du potentiel mitochondrial ψ_m et la formation de pores au niveau membranaire permettent le relargage dans le cytoplasme du cytochrome c, de Smac/Diablo, d'AIF et de l'Endo G. Le cytochrome c et l'ATP se fixent à Apaf1. Grâce à un domaine CARD, Apaf1 fixe les procaspases 9, formant un complexe appelé apoptosome, générant la caspase 9 qui active les caspases 3 et 7. Les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2 se fixent aux domaines BIR des IAPs, empêchant l'inhibition de la maturation des procaspases 9 et 3. L'AIF et l'EndoG, relarguées de la mitochondrie, migrent vers le noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire et clivent l'ADN en plusieurs fragments. *Apaf1* = *Apoptotic Protease Activating Factor1*, *ATP* = *Adenosine TriPhosphate*, *AIF* = *Apoptosis-Inducing Factor*, *CARD* = *CASPASE Recruitment Domain*, *IAP* = *Inhibitor of Apoptosis Protein*, *EndoG* = *Endonuclease G*, *Smac/Diablo* = *Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP Binding protein with LOW pI*, *Omi/HtrA2* = *High Temperature Requirement protein A2*.

Le lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose est assuré dans ces cellules par une petite protéine de la famille des protéines Bcl-2, appelée Bid. En effet, la caspase 8 active clive Bid au niveau de la partie N-Terminale, permettant l'exposition de son domaine BH3. La forme tronquée de Bid appelée tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à des protéines pro-apoptotiques dont Bax, induisant l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (d'après Luo X et al., 1998).

Les membres de la famille Bcl-2 (homologue du gène *ced-9* de *C. elegans*) ont une grande importance dans la phase de régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire (voie intrinsèque et voie extrinsèque). Le plus souvent, les signaux inducteurs d'apoptose semblent être modulés par les gènes de cette famille. Cette modulation se situe en amont de l'activation de la phase exécutive faisant intervenir les caspases. Le proto-oncogène Bcl-2 a été le premier membre découvert dans les lymphomes folliculaires de type B (Tsujimoto et Croce, 1986). La translocation chromosomique t(14 ; 18) associée à ces lymphomes a permis d'isoler le gène *bcl-2*, localisé au point de cassure de la translocation (Vaux et al., 1988). L'inactivation du gène chez la souris a permis d'aller plus loin dans la compréhension de la fonction anti-apoptotique de Bcl-2. Le blocage du gène aboutit à une variété d'anomalies attribuées pour la plupart à un dérèglement de l'apoptose, notamment une mort cellulaire excessive. Après la découverte de Bcl-2, de nombreuses protéines présentant des similitudes avec Bcl-2 ont été mises en évidence. Cette famille regroupe à la fois des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bcl-Xs, etc.) et des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-B, etc.). L'équilibre entre ces deux types de protéines détermine en partie la susceptibilité des cellules à l'apoptose (Strasser et al., 2005 ; Yousefi et al., 2006).

- Classification des protéines de la famille Bcl-2

Tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins un des quatre domaines d'homologie de Bcl-2: BH1, BH2, BH3 et BH4 (BH, *Bcl-2 homology*). Le domaine BH3 joue un rôle dans la dimérisation ainsi que dans l'induction de l'apoptose. Presque toutes les protéines de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire (TM) carboxyterminal leur permettant de s'ancrer dans des membranes cellulaires, (Strasser et al., 2005). Ces membres sont classés en deux groupes, l'un anti-apoptotique et l'autre pro-apoptotique qui se scinde lui même en deux sous-groupes (Borner et al., 2003).

Le premier groupe « Bcl-2-like survival factors » comprend les membres antiapoptotiques avec notamment Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL, Mcl-1, A1. Ils contiennent quatre domaines BH, dont le domaine BH4 spécifique et absolument essentiel à la fonction de survie. Le deuxième groupe contient les membres pro-apoptotiques et se divise en deux sous groupes. Le premier sous groupe « Bax-like death factors » se caractérise par l'absence du domaine BH4 dans la séquence des protéines (Bax, Bak, Bok...). Le deuxième sous-groupe « BH3 only death factors » comprend des membres possédant uniquement un domaine BH3 considéré comme un signal de mort (Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Noxa, Puma...) (Strasser et al., 2005).

Les membres anti- et pro-apoptotiques semblent avoir des localisations sub-cellulaires différentes. Les membres anti-apoptotiques siègent au niveau des membranes cellulaires des mitochondries, du noyau et du réticulum endoplasmique *via* leur domaine TM (Wattenberg et Lithgow, 2001). Les protéines pro-apoptotiques auraient, quant à elles, une localisation cytosolique (Kaufmann et al., 2003). Un des mécanismes d'action des protéines de la famille Bcl-2 est l'hétérodimérisation entre les membres pro- et anti-apoptotiques, suggérant la neutralisation compétitive entre eux. Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort. Bien que certaines protéines de la famille Bcl-2 soient ancrées dans les membranes où elles sont directement actives, d'autres ont besoin d'un second niveau de régulation pour être transloquées dans la cellule et exercer leur fonction. Ces mécanismes régulateurs correspondent à des changements conformationnels et/ou à des modifications post-traductionnelles (Puthalakath et Strasser, 2002). En effet, l'activation ou l'inactivation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont régulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que les phosphorylations, déphosphorylations, le clivage ou la séquestration dans le cytoplasme (Borner et al., 2003).

Plusieurs exemples illustrent ce processus. A la suite d'un signal apoptotique, les molécules anti-apoptotiques, telles que Bax, changeraient de conformation afin de permettre l'exposition de leur domaine TM et de rendre possible leur ancrage sous forme d'homodimère au niveau de la membrane externe mitochondriale. Ceci induirait la perméabilisation de cette dernière, modulant ainsi la libération des facteurs apoptogènes (Yousefi et al., 2006). Un mécanisme similaire a été mis en évidence pour Bcl-xL. En réponse à un stimulus apoptotique, l'expression des protéines Noxa ou Bim est induite et serait régulée par p53. Bad, Bid ou Bmf subissent des clivages et/ou des modifications post-traductionnelles du type phosphorylation (Borner et al., 2003). En réponse à l'activation des récepteurs de mort, la protéine Bid est clivée par la caspase-8 générant la protéine tronquée (tBid) qui peut être transloquée et s'ancrer à la mitochondrie. Cette forme tronquée serait indispensable au relargage du cytochrome c et tBid s'associerait alors à Bax par son domaine BH3 pour causer le dysfonctionnement de la mitochondrie. De même, la protéine Bad est régulée par une variété de kinases. Ces kinases peuvent la phosphoryler sur différents résidus sérines et contrôler ainsi son interaction ou non avec la protéine chaperonne 14-3-3 et par conséquent commander sa séquestration dans le cytosol (Harada et al., 1999). A la suite de signaux apoptotiques, Bad est déphosphorylée pour former des hétérodimères avec Bcl-XL ou Bcl-2, par liaison avec son domaine BH3. Seule la forme non phosphorylée de Bad est capable de lier Bcl-XL. D'autres membres pro-apoptotiques sont séquestrés par des éléments du cytosquelette.

Les molécules pro-apoptotiques Bim et Bmf sont essentielles à l'apoptose durant l'embryogénèse. Leur inactivation est due à leur séquestration par des protéines du cytosquelette comme la dynéine. A la suite d'un signal de mort, Bim et Bmf sont relarguées dans le cytosol et se lient à la mitochondrie pour interagir avec d'autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Borner et al., 2003).

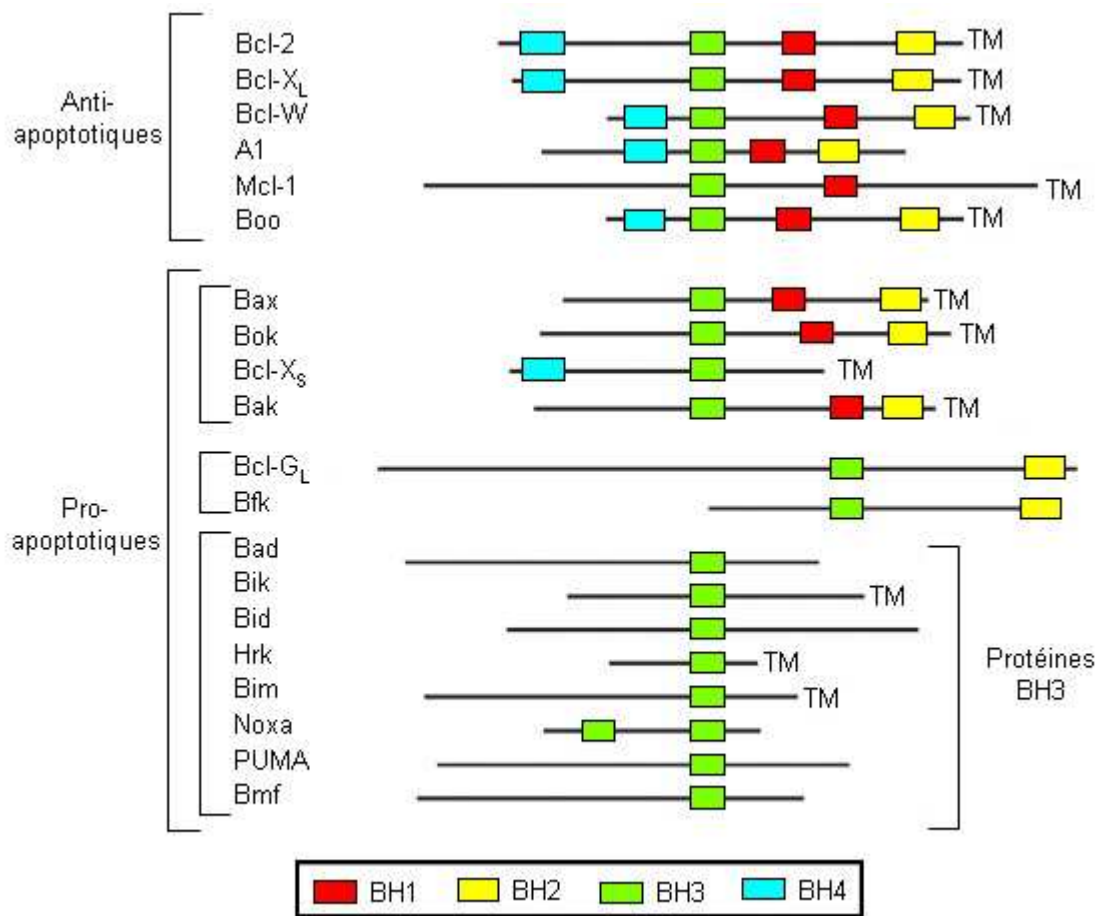


Figure 14 : Structure des membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en deux familles : les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. Ces protéines possèdent toutes de 1 à 4 domaines BH (pour Bcl-2 homology). Ces protéines contrôlent la sortie du cytochrome c mitochondrial. Bax et Bak sont responsables de la sortie du cytochrome c. Bax et Bak sont inhibées par Bcl-2 et BclxL (d'après Strasser et al., 2005).

II.1.3. La voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE), régule la synthèse et le repliement des protéines, et a un rôle de maintien de l'homéostasie calcique. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose. Les facteurs capables de perturber son fonctionnement sont rassemblés sous le terme «ER stress» ou stress du réticulum

endoplasmique. Ces stress incluent l'inhibition de la glycosylation des protéines, la modification de l'homéostasie calcique, le blocage du transport des protéines à l'appareil de Golgi ou l'accumulation de protéines mal repliées ou dénaturées. Un stress prolongé du réticulum endoplasmique semble lié à la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives. Une accumulation de protéines mal repliées et agrégées est ainsi retrouvée dans les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington, tout comme dans la sclérose latérale amyotrophique. Les neurones sont en effet très sensibles à l'accumulation des protéines mal repliées.

Comme la mitochondrie, le RE contient des molécules pro-apoptotiques (caspase-12, p28Bap31 et GADD153) et anti-apoptotiques (GRP78, calreticuline et DAD1).

De plus, des études ont montré que des membres de la famille Bcl-2 (Bcl-X_L, Bax, Bak et Bik) étaient associés avec le réticulum endoplasmique pour réguler l'homéostasie calcique et la mort cellulaire (Germain et Shore, 2003). L'apoptose induite par le calcium est régulée par les membres de la famille Bcl-2. Ils agissent sur la perméabilité des membranes du RE. Une surexpression de Bcl-2 empêche la libération trop importante de calcium, alors qu'une surexpression de Bak ou de Bax induit la libération de calcium. Il pourrait donc exister une redistribution précoce de Bax et de Bak au niveau des membranes du RE lors de l'apoptose (Hajnoczky et al., 2003).

- **Homocystéine et stress du Réticulum Endoplasmique**

Comme il a été décrit ci-dessus, le RE est le site principal de maturation des protéines transmembranaires, sécrétaires et RE résidentes (Rutkowski et al., 2004) Pour assurer le repliement correct des protéines récemment synthétisées et empêcher l'agrégation de protéines intermédiaires, le RE contient de nombreuses molécules chaperonnes telles que la GRP78, la GRP94, la calnexine, la calreticuline, et la protéine bisulfure isomérase. Ces molécules chaperonnes agissent comme un système de contrôle de qualité en assurant que seulement les protéines correctement repliées soient traitées avant d'entrer dans l'appareil de Golgi pour sa transformation et sa sécrétion ultérieure. Des conditions pathologiques et/ou des agents qui interfèrent avec le processus de repliement et maturation des protéines, activent le *unfolded protein response* (UPR), une voie de signalisation intracellulaire intégrée qui répond au stress du RE en augmentant l'expression des gènes de réponse UPR (y compris les molécules chaperonnes RE-résidentes), et par conséquent, il existe une diminution de la traduction des protéines et une dégradation des protéines non repliées. En effet, l'UPR assure la survie cellulaire en empêchant

les effets adverses du stress du RE. La dysfonction d'UPR ou un stress prolongé et sévère du RE peut provoquer une apoptose cellulaire.

Le stress du RE en lien avec une hyperhomocystéinémie peut activer plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans le développement et la progression de l'athérosclérose, y compris l'altération du métabolisme des lipides, la mort cellulaire par apoptose, et l'inflammation. Il a été montré récemment que l'hyperhomocystéinémie induit un stress du RE et par conséquent provoque une altération du métabolisme des lipides dans les hépatocytes en activant la *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) (Ji et al., 2003). La SREBPs est une famille de protéines RE-résidentes, ces protéines contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la biosynthèse des triglycérides, des acides gras et du cholestérol (Horton et al., 2002). Werstuck et al., (2001), ont montré que la surexpression de la GRP78, protéine RE chaperonne qui protège la cellule du stress du RE, inhibe l'expression de gènes SREBPs induits par l'Hcy dans de cultures de cellules endothéliales humaines (*human umbilical vein endothelial cells* -HUVECs). Sur un modèle animal, les mêmes auteurs ont montré que les souris alimentées avec un régime riche en méthionine avaient une stéatose hépatique. Ces données appuient l'hypothèse du lien entre le stress du RE et le métabolisme de lipides.

II.2. Pathologies cérébrales au cours du développement

Divers pathologies (maladies cardiovasculaires, défaut de fermeture du tube neural...) sont associées à l'augmentation d'homocystéine plasmatique sans vraiment définir si l'homocystéine est une cause, une conséquence ou simplement un marqueur de la pathologie. Les paragraphes suivants feront le point sur la toxicité intrinsèque de l'homocystéine et les réactions qui conduisent à des effets néfastes conséquents à l'augmentation de sa concentration cellulaire au cours du développement cérébral.

L'hyperhomocystéinémie perturbe les processus de procréation (Forges et al., 2007) et peut causer ainsi des défauts du développement (Trisomie 21, spina-bifida).

C'est en 1962, que Carson et Neil, ont publié des travaux établissant un lien entre une anomalie du métabolisme des folates, des cobalamines (substrats monocarbonés), de l'homocystéine et une diminution des performances intellectuelles, des signes de démence et des troubles neurologiques (Lindenbaum et al., 1988 ; Scott et al., 1992 ; Leblhuber et al., 2001).

Les folates jouent également un rôle essentiel dans le développement du fœtus. Ils sont transportés via le placenta, pendant la grossesse (Luhby et al., 1958; Steegers-Theunissen et al.,

1995). Ce rôle est mis en évidence par une teneur en folates plus élevée dans le sang fœtal, que dans le sang maternel (Strelling et al., 1976).

II.2.1. Les malformations du tube neural : le spina-bifida

Au cours de la grossesse, une déficience en folates augmente significativement le risque d'une anomalie dans la formation du tube neural chez le fœtus (Smithells et al., 1976). Ainsi la présence d'une hyperhomocystéinémie est associée à une anomalie dans la prolifération, la différenciation et la mort des cellules néoformées au niveau du tube aboutissant au spina-bifida. Il s'agit d'une malformation congénitale de la colonne vertébrale, caractérisée par l'absence de soudure des arcs postérieurs et de l'apophyse épineuse d'une ou de plusieurs vertèbres, le plus souvent au niveau lombosacré. La malformation est localisée au niveau de la colonne vertébrale, de ses enveloppes et des vertèbres qui l'entourent entraînant chez l'enfant, dans ses formes sévères, une paralysie des membres inférieurs, des troubles sensitifs ainsi qu'une incontinence urinaire et fécale. On distingue plusieurs formes: le spina-bifida qui s'accompagne d'une herniation de la moëlle épinière (myéломéningocèle), laquelle est mise à nu au même titre que les terminaisons nerveuses, et celui dans lequel seules les méninges sont impliquées (méningocèle). Quant au spina-bifida occulta ou caché, il s'agit de la forme la moins sévère et la plus commune. Elle consiste en une légère déficience dans la formation d'une des vertèbres et peut se manifester par une fossette ou une touffe de poils grandissant dans le dos.

Il est actuellement admis que le statut en folates est l'un des facteurs environnementaux importants dans l'étiologie des anomalies du tube neural (Van der Put et Blom 2000). Sur des cultures de cellules cérébrales embryonnaires, des études ont montré que la baisse de folates inhibe la prolifération des cellules souches astrocytaires et neuronales (Mattson et al., 2003). De la même façon, l'utilisation de méthotrexate, inhibiteur du métabolisme du folate, diminue la prolifération et augmente l'apoptose des cellules souches en modifiant la quantité et l'appariement des nucléotides à l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire (Kruman et al., 2002).

La déficience en vitamines B12 durant la gestation provoque une élévation de l'homocystéine chez le fœtus et augmente les altérations développementales (Li et Sheng, 2003) de son système nerveux. Chez l'enfant, la déficience en vitamine B12 peut engendrer divers problèmes comme une hypotonie sévère, une apathie... qui pourraient être le reflet d'un déficit de la myélinisation (Lovblad et al., 1997). Par ailleurs, la déficience héréditaire de la transcobalamine II provoque des anomalies neurologiques caractérisées par un retard intellectuel, une ataxie... (Thomas et al., 1982).

L'association des anomalies de fermeture du tube neural avec l'hyperhomocystéinémie a fait l'objet de diverses publications (Groenen et al., 2004; Guéant-Rodriguez et al., 2003). La non fermeture du tube neural ne serait pas due à une action directe de l'homocystéine, mais à une anomalie de fonctionnement de la méthionine synthase (Guéant-Rodriguez et al., 2003). 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.

- **Autres anomalies de la fermeture du tube neural suite à une déficience en acide folique**

Folic acid-binding protein one (Folbp1), est une protéine de liaison membranaire ; c'est un médiateur du transport de l'acide folique dans les cellules épithéliales. De nombreuses études ont mis en évidence qu'une inactivation du gène Folbp1 à l'aide d'un modèle de souris *Folbp1*^{-/-} entraîne la mort *in utero* au stade 10,5 de gestation chez les fœtus. Ils présentent des anomalies de fermeture du tube neural qui demeure ouvert au niveau des sites II et IV et des malformations cranio-faciales telles que les fentes labio-maxillo-palatines (voir plus loin). Près de la moitié des fœtus présentent une forme sévère de fentes labio-maxillo-palatines qui se manifeste par un défaut de fermeture fronto-nasale, et l'absence au niveau des maxillaires de l'axe bilatérale (Tang et al., 2005 ; Spiegelstein et al., 2004). Une supplémentation en acide folique des mères avant et pendant la gestation sauve une majorité de fœtus d'une mort prématurée.

II.2.2. Les fentes labio-maxillo-palatines

La fente labio-palatine, plus communément appelée « bec-de-lièvre », est une anomalie qui concerne en moyenne un enfant sur mille chez les Européens. Elle est par contre plus fréquente chez les Japonais et plus rare chez les Noirs américains. Les filles sont deux fois plus touchées que les garçons.

On distingue deux formes de fente : la fente palatine et la fente labiale. La fente labiale, qui concerne le plus souvent des garçons, correspond à une interruption de la lèvre, souvent associée à une fente du maxillaire, c'est-à-dire une fissure entre la deuxième incisive et la canine. La narine du même côté de la fente labiale est parfois élargie.

La fente palatine, touche davantage les filles. Le palais est constitué de deux parties différentes que l'on sent en passant la langue sur le palais : le voile, une membrane en arrière, et l'os, situé en avant, derrière les dents. La fente palatine concerne soit le voile soit l'ensemble du palais.

La fente labio-palatine associe les deux types de fentes, labiale et palatine. Elle peut être présente d'un seul côté ou des deux. Dans 30% des cas, elle est associée à d'autres malformations - cardiaques, digestives ou au niveau du cerveau.

L'origine de ces anomalies remonte à la grossesse, lorsque le visage du fœtus se développe. Entre le 35^e et le 40^e jour de la grossesse, deux parties, appelées bourgeons, se soudent : le bourgeon maxillaire qui correspond au bas du visage, et le bourgeon naso-frontal qui constitue le nez et le front. Ces deux bourgeons doivent fusionner pour obtenir un visage harmonieux. Si ce n'est pas le cas, une fente plus ou moins importante se forme. L'échographie permet de révéler l'anomalie au sixième mois. En plus de la disgrâce esthétique, il peut être difficile de parler et de s'alimenter. Pour éviter que les aliments passent dans le nez, le nouveau-né est alimenté avec une tétine particulière, et un palais artificiel, en résine, est posé pour supprimer la communication entre la bouche et le nez.

La survenue de cette pathologie est attribuée à l'association de facteurs génétiques et environnementaux complexes. Plusieurs études laissent supposer que les femmes qui prennent des suppléments d'acide folique pendant la grossesse peuvent réduire de manière significative les risques que leur bébé soit atteint d'une fente labio-maxillo palatine comme cela est observé dans le cas d'anomalie de fermeture du tube neural. Les données de la littérature conduisent à s'intéresser à l'acide folique, à la vitamine B12 mais plus généralement au cycle de la méthionine avec en particulier les polymorphismes génétiques de plusieurs systèmes enzymatiques mis en jeu.

Afin de déterminer si le risque d'un nouveau-né de développer une fente labiopalatine (FLP: fente labiale et fente palatine) est associé à la prise de vitamines B (autres que l'acide folique) par la mère en période périconceptionnelle, Krapels et al., 2004 ont comparé l'alimentation de 182 femmes ayant donné naissance à un enfant atteint de FLP à celle de 173 témoins.

Les femmes ayant un enfant atteint présentaient des apports en thiamine, niacine et pyridoxine significativement inférieurs à ceux des mères témoins. Toutefois, 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 (Mattson et al., 1999 ; Krapels et al., 2004, Schubert et al., 2006).

III. Voies de signalisation mises en jeu

La prolifération des cellules de mammifères est strictement régulée par des signaux externes qui contrôlent le cycle cellulaire. En effet, les cellules peuvent sortir du cycle et entrer en phase de quiescence si les conditions extérieures ne sont pas optimales pour la prolifération. La structure transmembranaire des intégrines et des récepteurs tyrosine kinase leur permet d'être des transducteurs de signaux de la surface de la cellule vers le cytoplasme. Ces deux types de récepteurs partagent d'ailleurs une partie des voies de signalisations cytoplasmiques à travers l'activation des membres de la famille des GTPases Rho et Ras. Il s'ensuit alors l'activation d'une cascade de protéines de type MAPKKK/MAPKK/MAPK comme Raf/MEK1/Erk et PI3K/PDK1/AKT. En général, ces cascades conduisent à la stimulation de la transcription de gènes essentiels pour l'entrée en division. Mais, elles peuvent également inhiber ou au contraire induire la dégradation de protéines importante pour la progression dans le cycle cellulaire

III.1. Le cycle cellulaire

III.1.1. Généralités

Le cycle cellulaire est un mécanisme conservé par lequel les cellules eucaryotes se dupliquent. Dans l'organisme, l'homéostasie des tissus résulte de l'équilibre entre les cellules qui vont mourir et les cellules nouvellement formées. Le contrôle de l'homéostasie est permis par la connexion entre le cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée. La réparation de l'ADN se fait en même temps que le cycle cellulaire ou avant l'apoptose pour maintenir l'intégrité génomique des cellules, essentielle pour leur fonctionnement et leur survie. Des lésions de l'ADN ou une mauvaise répllication de celui-ci peuvent activer des voies spécifiques de transduction. L'activation de points de contrôle peut induire un arrêt temporaire du cycle cellulaire et parfois une réparation de l'ADN.

III.1.2. Complexes cyclines/Cdk

La durée du cycle cellulaire ainsi que son déroulement sont contrôlés aux différents points de transition G1/S et G2/M mais aussi dans la phase S par des complexes protéiques appelés cyclines/kinases dépendantes des cyclines (Cdk). Lors de lésions sur l'ADN ou d'un mauvais alignement des chromosomes au niveau du fuseau mitotique, le cycle est arrêté au niveau de ces points de contrôle pour permettre la réparation des dommages. Après réparation, la cellule poursuit son cycle cellulaire mais si les lésions sont trop importantes pour être réparées, la cellule entre en apoptose (Bloom et Cross, 2007).

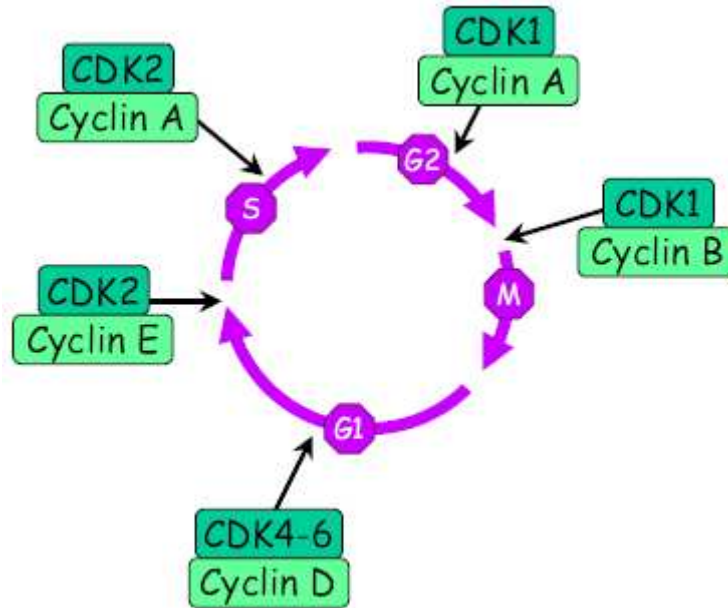


Figure 15 : Contrôle du cycle cellulaire par les cyclines et Cdk, (d'après Meijer et al., 2003).

La progression de la cellule dans les différentes phases du cycle cellulaire est médiée par l'activation transitoire de complexes cyclines/Cdk. Les Cdk appartiennent à la famille des sérine/thréonine kinases et leur activité kinase est dépendante de la présence des cyclines. Les cyclines requises pour le déroulement de chacune des phases du cycle cellulaire sont fortement induites lors de la phase concernée puis leur expression est diminuée pendant les phases au cours desquelles elles n'interviennent pas.

Lorsque les cellules quiescentes entrent dans leur cycle cellulaire, le gène de la cycline D est induit et la cycline peut alors se complexer aux Cdk4 ou 6 permettant à la cellule de progresser en phase G1. Les complexes cycline E/Cdk2 et cycline A/Cdk2 contrôlent la progression des cellules de la phase G1 à la phase S (Sherr et Roberts, 1999). L'activité des complexes cycline/Cdk est régulée par des mécanismes agissant au niveau de la formation des complexes ou au niveau de la phosphorylation des Cdk qui est nécessaire à leur activité. La phosphorylation des Cdk par des kinases activatrices ou CAK (*Cdk-activating kinase*) favorise leur activité. A la fin de la phase G1, après le point de restriction, la cellule peut entrer en phase S et les complexes cyclines D/Cdk sont alors inactivés alors que la cycline A se lie à Cdk2 pour permettre la transition G1/S. L'un des principaux substrats du complexe cycline D/Cdk est la protéine du rétinoblastome (Rb). La phosphorylation de Rb initiée par ce complexe au cours de la phase G1 est amplifiée par le complexe cycline E-Cdk2 après activation.

L'inhibition des complexes est importante pour l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire. Les Cdk sont régulées négativement par les sous-unités inhibitrices de Cdk ou CKI «Cdk inhibitor».

La transition G2/M est permise par la présence de complexes cycline A/Cdk2 ou cycline B/Cdk2. Les complexes cycline B/Cdk2 s'accumulent pendant la phase G2 du cycle cellulaire mais sont rendus inactifs par des kinases qui phosphorylent Cdk2. L'entrée en mitose nécessite la déphosphorylation de Cdk2 par la phosphatase CDC25C (Smits et Medema, 2001). Les complexes cyclines A/Cdk2 et B/Cdk2 activés maintiennent Rb hyperphosphorylée jusqu'au début de la mitose avant qu'elle ne soit hypophosphorylée pour la prochaine phase G1. La fin de la mitose se produit lorsque la cycline B est ubiquitinylée et dégradée par le complexe d'induction de l'anaphase (APC, *Anaphase-Promoting Complex*).

III.1.3. Régulateurs de la progression du cycle cellulaire

III.1.3.1. Les protéines p21, p27, p57 et p53

Les trois membres de la famille CIP/KIP (*Cycline inhibitor protein/ Kinase inhibitor protein*) : p21 WAF1/CIP1/SID1, p27 KIP1 et p57 KIP2 possèdent une séquence conservée dans leur région aminoterminal qui est nécessaire pour la fixation et l'inhibition des Cdk (Gartel et Tyner, 2002). Ces CKI se fixent aux Cyclines et aux Cdk individuellement, mais ils ont une plus forte affinité pour les complexes Cdk/Cycline. *In vitro*, ces inhibiteurs peuvent bloquer l'activité de tous les complexes Cdk/Cycline, bien qu'ils présentent certaines préférences pour les complexes contenant Cdk2. L'analyse structurale du complexe ternaire p27/Cycline A/Cdk2 montre que p27 interagit directement avec la Cycline A et Cdk2. p27 s'insère dans le site catalytique de Cdk2 induisant un changement conformationnel qui bloque le site de fixation de l'ATP. Les similitudes de structures primaires entre les trois membres de la famille CIP/KIP suggèrent qu'ils interagissent tous de la même façon avec les complexes Cdk/Cycline (Sherr et Roberts, 1995). Bien que les CKI de la famille CIP/KIP aient été isolés en tant qu'inhibiteurs, ils ont aussi été détectés dans des complexes Cycline D/Cdk actifs. LaBaer et ses collaborateurs ont montré que p21 et p27 facilitent la formation et stabilisent les complexes Cycline D/Cdk (LaBaer et al., 1997). p27 s'associe principalement aux complexes Cycline D/Cdk lors de la progression dans le cycle cellulaire. Ceci constitue une réserve de p27 qui peut être mobilisée en présence de facteurs anti-prolifératifs. Par exemple, l'addition de TGF α (anti-mitogène dans certaines cellules) active l'expression de p15 qui se fixe spécifiquement aux complexes Cycline D/Cdk,

induisant la libération de p27 qui va alors inhiber les complexes Cycline E/Cdk2 (Reynisdottir et al., 1995).

Les trois membres de la famille CIP/KIP interviennent dans la régulation de la progression en G1/S bien que p21 pourrait également avoir un rôle en G2/M (Taylor et Stark, 2001; Vidal et Koff, 2000). p21 est induit en réponse à de nombreux stimuli mitogènes et à des dommages à l'ADN. La protéine est fortement exprimée dans les cellules en différenciation et en sénescence. L'expression de p21 dans plusieurs lignées cellulaires en culture inhibe leur prolifération. La transcription de p21 est sous la dépendance de p53 (Kim et al., 1997). Une fois exprimée, p21 va se lier aux complexes cycline D/Cdk4, cycline D/Cdk6 ou cycline E/Cdk2 et les inactiver, conduisant alors à une hypophosphorylation de Rb et à un arrêt du cycle cellulaire (Stewart et Pietsenpol, 2001). La transfection de p53 dans des cellules de muscles lisses induit l'expression de p21, entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et en phase G₂/M (Katayose et al., 1995). De plus, p21 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en G₂ lorsqu'elle est induite par p53 car, lors d'une invalidation de p53 ou de p21, les cellules ne s'arrêtent pas en G₂ mais entrent en mitose (Bunz et al., 1998).

L'altération des fonctions de p53 dans les différents cancers a permis de constater son rôle aussi bien dans le contrôle de la prolifération cellulaire, dans l'apoptose, dans le contrôle de l'intégrité du génome que dans la réparation de l'ADN (Levine et al., 1997). Plusieurs stimuli, comme des lésions sur l'ADN, l'hypoxie, l'activation d'oncogènes, la déplétion en facteurs de croissance, ou les chocs thermiques entraînent son activation en augmentant le taux de transcription du messager ou en augmentant la durée de sa demi-vie (Mosner et al., 1995). En réponse à ces stimuli, p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN avant la division cellulaire ou l'initiation de l'apoptose. Dans la majorité des cancers, on observe une p53 mutée mais sans altération de son activité, et les cellules cancéreuses ayant une p53 sauvage sont souvent défectueuses en facteurs intervenant dans la stabilisation ou l'activité de p53 (Hainaut et Hollstein, 2000).

III.1.3.2. La protéine PP2A

Les protéines phosphatases de type 2A (PP2A) sont largement décrites comme des Sérine/Thréonine phosphatases majeures du règne eucaryote. Ces enzymes sont composées de trois sous-unités ayant chacune un rôle bien déterminé:

- une sous-unité structurale (la sous-unité A)
- une sous-unité catalytique (la sous-unité C)
- une sous-unité régulatrice (la sous-unité B)

Ces enzymes se retrouvent *in vivo* sous la forme d'un dimère (PP2A_D) ou d'un trimère (PP2A_T) (Zolnierowicz et al., 2000). Le dimère se compose d'une sous unité catalytique PP2A_C de 36 kDa liée à une sous unité structurale de 65 kDa, PR65 (sous unité A).

La protéine PP2A participe à de très nombreux événements cellulaires grâce à sa diversité de formes et de fonctions. Elle est notamment impliquée dans le contrôle des transitions G1/S, G2/M et la mitose.

La progression du cycle cellulaire est notamment inhibée par la famille des protéines du rétinoblastome, elles constituent une cible des protéines kinases Cdk qui abolissent leur pouvoir inhibiteur en les phosphorylant. Il a été démontré que la protéine p107 du rétinoblastome s'associe avec la sous unité régulatrice PR59 (sous unité B) de PP2A *in vivo*. Par ailleurs, la surexpression de PR59 conduit à la déphosphorylation de p107 (Voorhoeve et al., 1999). La progression du cycle cellulaire est alors abolie et les cellules se retrouvent bloquées en phase G1. De plus, l'initiation de la réplication chez les eucaryotes met en jeu une autre sous unité régulatrice de la famille B : PR48. PR48 a une localisation nucléaire où, en association avec le dimère PP2A_D elle a pour substrat la protéine Cdk6, un composant majeur du complexe de pré-réplication. La surexpression de PR48, tout comme PR59, conduit à l'accumulation des cellules en G1. L'holoenzyme PP2A composée de PR48 participe donc à initialiser la réplication de l'ADN chez les mammifères. Pour cela, il est probable que PP2A_D/PR48 maintienne Cdk6 sous une forme déphosphorylée nécessaire pour sa liaison aux origines de réplication (Yan et al., 2000).

Le rôle de PP2A dans l'initiation de la réplication a été confirmé chez le Xénope. Dans des extraits d'oeufs de Xénope, la réplication de l'ADN est fortement inhibée consécutivement à l'immunodéplétion de PP2A, tandis que les fourches de réplication préalablement établies continuent. Ceci suggère que PP2A régule spécifiquement l'initialisation de la réplication de l'ADN (Lin et al., 1998).

- Régulation par des modifications post-traductionnelles :

Deux types de modifications peuvent affecter l'activité de PP2A : des phosphorylations réversibles sur des résidus tyrosines et thréonines ainsi qu'une méthylation carboxy terminale. Différentes protéines tyrosines kinase peuvent phosphoryler PP2A_C *in vitro* sur la Tyrosine 307 appartenant à la partie conservée C-Terminale (Chen et al., 1992). La présence d'acide okadaïque, un inhibiteur de PP2A, favorise cette réaction suggérant que PP2A pourrait avoir une activité tyrosine phosphatase et se déphosphoryler elle-même. *In vivo*, la phosphorylation sur

tyrosine de PP2A induite par des facteurs de croissance inactive l'enzyme (Begum et Ragolia, 1996 et 1999).

La phosphorylation sur des résidus thréonines affecte quand à elle non seulement PP2AC sur des résidus non identifiés, mais aussi les sous-unités régulatrices, particulièrement la famille B (Xu et Williams, 2000). La phosphorylation de PP2AC est inhibitrice contrairement à celle de la famille B qui augmente l'activité phosphatase pour des substrats phosphorylés par PKC (Protéine Kinase C).

Des travaux ont confirmé que les cellules peuvent en partie contrôler dynamiquement la formation et la fonction du complexe PP2A par sa méthylation et sa phosphorylation (Wei et al., 2001). La dérégulation de ces modifications a donc de lourdes conséquences pour la cellule et se trouve liée à des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer. En effet, la dérégulation de la méthylation de PP2A, modifie la composition et la spécificité de substrats de l'enzyme (Sontag et al., 2004a ; Sontag et al., 2004b). Ceci peut conduire à l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et à abolir sa capacité à lier et à promouvoir l'assemblage des microtubules (Lim et al., 2005). Ces événements précèdent des mécanismes de neurodégénérescence en affectant la plasticité et la survie neuronale (Sontag et al., 2004a ; Sontag et al., 2004b).

III.2. Régulation de la survie cellulaire

III.2.1. La voie PI3Kinase/AKT

Les PI3Kinases appartiennent à une famille d'enzymes qui phosphorylent les phosphoinositides des membranes en position 3 du groupe inositol (Wymann et Pirola 1998). Les PI3Kinases phosphorylent spécifiquement deux substrats: le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) générant ainsi du phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI3,4-P2) et du phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate (PIP3) (Franke et al., 1997). Les phosphatidylinositols PI3,4-P2 et PI3,4,5- P3 sont absents à l'état normal dans les cellules quiescentes. Ils apparaissent suite à un stimulus extracellulaire et sont rapidement dégradés par des phosphatases (Franke et al., 1997), notamment la phosphatase PTEN qui génère du PIP2 à partir du PIP3, et contrebalance ainsi l'activité des PI3Kinases. La PI3Kinase, activée par des facteurs de croissance ou de survie, génère des phosphatidylinositols 3-phosphate insérés dans la membrane plasmique qui se fixent au domaine PH de AKT, une sérine/thréonine kinase impliquée dans l'inhibition de l'apoptose. La translocation de AKT du cytoplasme vers la membrane plasmique permet son activation. L'activation maximale de AKT se fait par la double phosphorylation des résidus thréonine 308 et sérine 473 par deux kinases différentes appelées PDK (*phosphatidyl inositol dependent kinases*).

AKT sous forme activée phosphoryle de nombreux substrats cytoplasmiques qui ne sont pas encore, à l'heure actuelle, tous identifiés.

Une inactivation de PTEN entraîne une phosphorylation constitutive de AKT (Cantley et al., 1999 ; Ramaswamy et al., 1999 ; Lu et al., 1999). Inversement, son activation est bloquée par des inhibiteurs de PI3Kinase comme la wortmannine et le LY294002.

Les protéines de la famille AKT sont surexprimées dans des tumeurs de l'ovaire (Yuan et al., 2000), du sein (Sun et al., 2001) ou du pancréas (Cheng et al., 1996) ce qui suggère que les kinases de type AKT pourraient participer à la résistance à l'apoptose fréquemment observée dans les cellules tumorales.

AKT activée peut favoriser la survie cellulaire en régulant l'expression des gènes de la famille Bcl-2 ou des caspases via des phosphorylations directes. D'autre part, AKT est nécessaire et suffisante pour que le PDGF et le TNF induisent l'activation de NFκB, un facteur activant la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire (Romashkova et Makarov, 1999). AKT permet également la répression transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques via la phosphorylation de facteurs de transcription séquestrés dans le cytoplasme.

AKT est définitivement l'un des plus importants médiateurs de la survie cellulaire ; il peut agir directement sur les effecteurs ou les régulateurs de l'apoptose. De nombreuses données indiquent que l'une des fonctions majeures de AKT est de réguler l'effet de survie des facteurs de croissance et de bloquer l'apoptose (Thornberry et al., 1998). Quand Bad est phosphorylé sur la sérine 136 par AKT, il ne peut plus exercer son action proapoptotique. C'est pourquoi on le considère comme l'une des cibles privilégiées de AKT dans son effet de survie (Datta et al. 1997).

La caspase-9 humaine est phosphorylée par AKT sur la sérine 196 et cette phosphorylation se traduit par l'atténuation de son activité cystéine-protéase (Cardone et al. 1998).

- **Inactivation de AKT**

Peu de données sont connues concernant l'inactivation de AKT. L'utilisation d'un inhibiteur, l'acide okadaïque, a montré que la protéine phosphatase 2A (PP2A) inactive AKT par déphosphorylation de la thréonine 308. Cependant, les auteurs ont observé que l'inhibition de PP2A est quasiment sans effet sur la phosphorylation de la sérine 473 de AKT. La recherche d'une phosphatase insensible à l'acide okadaïque et possédant un domaine PH lui permettant de se colocaliser avec AKT a permis d'identifier la « *protein phosphatase, PH domain leucinerich repeat protein phosphatase* » (PHLPP). Cette protéine est la seule phosphatase du génome

humain à posséder un domaine PH. Elle déphosphoryle très efficacement la sérine 473 de AKT et n'a que peu d'effet sur la phosphorylation de sa thréonine 308 (Gao et al., 2005).

L'effet du couple PI3Kinase/AKT est relayé par la voie mTOR/p70 S6Kinase (Aoki et al., 2001). mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) appartient à la famille des protéines kinases PIKK (*PIKinase-related kinase*). Elle comprend dans sa partie C-terminale un domaine catalytique (phosphotransférase et lipide kinase) très similaire à celui de la sous-unité p110 de la PI3Kinase. mTOR intervient dans une voie de signalisation mitogénique réglant l'initiation de la traduction. mTOR phosphoryle deux substrats majeurs impliqués dans l'initiation de la traduction protéique: 4E-BP1 (*eIF-4E binding protein*) et p70 S6kinase qui est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la synthèse protéique et la prolifération cellulaire (Chou et Blenis, 1995). Les protéines ainsi synthétisées induisent directement ou indirectement la transition G1/S du cycle cellulaire (Schmelzle et Hall, 2000).

De nombreuses expériences ont été menées visant à montrer que la PI3kinase active la p70 S6kinase. Le blocage de l'activité de la PI3Kinase par la wortmanine ou le LY294002 inhibe l'activation de la p70 S6kinase (Chung et al., 1994 ; Burgering et Coffey, 1995). Une confirmation a été apportée par des travaux utilisant une forme constitutivement activée de la PI3Kinase. La surexpression d'une telle construction dans des expériences de transfection transitoire a montré une activation de la p70 S6kinase. Enfin, il a également été montré que l'activité de la p70 S6kinase est augmentée après activation de AKT (Burgering et Coffey, 1995).

III.2.2. MAP Kinases

Les cellules perçoivent les changements de leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs, le plus souvent membranaires. Ces récepteurs vont transmettre le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule en activant une série de modifications protéiques ou « cascade de signalisation » qui va permettre à la cellule de réagir.

Les voies de signalisation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) permettent l'engagement rapide d'un programme d'expression génique en réponse à un stimulus. Ces voies de signalisation ont été extrêmement bien conservées au cours de l'évolution et sont constituées de protéines kinases qui s'activent en cascade et transmettent le signal par une suite d'interaction entre protéines. Les voies de signalisation des MAPK, comme celles de p38, de JNK et de ERK 1/2, jouent un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire.

III.2.2.1. ERK 1/2

Les kinases ERK2/1 (*Extracellular Regulated Kinase*) ou p42/p44 (correspondant à leur poids moléculaire respectif de 42 et 44 KDa) sont les premiers membres de la famille MAPK à avoir été caractérisés. ERK1 et ERK2 sont exprimées de façon ubiquitaire. Les MAPK possèdent à leur extrémité C-terminale un domaine CD riche en résidus acides, qui permet d'interagir avec leurs substrats au niveau de sites de fixation formés par des résidus basiques comme le domaine D de MEK.

- MAPK et prolifération cellulaire

Lorsque l'on stimule des fibroblastes quiescents avec du sérum, les MAPK sont activées de façon biphasique avec un premier pic d'activation de 5 minutes, suivi d'un second pic atténué qui dure environ 1h, et un retour progressif au niveau basal avant la fin de la phase G1. Le second pic d'activation des MAPK est en corrélation avec la progression des cellules en phase S. Cette activation permet l'induction de cycline D1 et l'activation du complexe Cdk4/cycline D1 nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire (Lavoie et al., 1996). L'activation de ERK 1/2 augmente la synthèse des nucléotides, en régulant l'activité de la CPSII (*Carbamoyl Phosphate Synthetase II*) (Graves et al., 2000), ainsi que la traduction en activant le facteur de traduction eIF4E (pour revue (Raught et al., 1999)). Enfin, les MAPK augmentent la prolifération cellulaire en activant directement les facteurs de transcription Elk, c-Fos, c-Jun, Ets1/2 et cMyc ou encore le facteur CREB via l'activation de Rsk.

- MAPK et différenciation cellulaire

La voie MAPK joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire. Ainsi l'invalidation de *mapk1* chez la souris provoque la létalité embryonnaire entre les jours J6 et J12 suite à l'absence de développement de l'ectoderme extra embryonnaire, du cône ectoplacentaire, à l'absence de différenciation de la lignée conduisant au développement du mésoderme (Yao et al., 2003), et à des défauts dans le développement du placenta (Hatano et al., 2003). L'invalidation de *mapk3* provoque une altération de la différenciation des thymocytes en lymphocytes simples positifs CD4+ CD8+. La voie Raf/MAPK a été impliquée aussi dans la différenciation de l'épithélium intestinal (Taupin et al., 1999), et des cellules musculaires (Gredinger et al., 1998).

- **MAPK et fonctions neuronales**

La voie Raf/MAPK est activée lors de la stimulation des récepteurs NMDA par le glutamate (Xia et al., 1996). Les MAPK sont impliquées dans la modulation de la transmission synaptique en particulier lors de la libération de neurotransmetteurs. La voie Raf/MAPK joue un rôle dans la plasticité synaptique, notamment au cours du processus de potentialisation à long terme dans l'hippocampe qui sous-tend l'apprentissage et la mémorisation (Sweatt et al., 2004). Ainsi les souris invalidées *mapk3* présentent une augmentation de leurs capacités de mémorisation (Mazzucchelli et al., 2002).

- **MAPK et survie cellulaire**

Inhibition de la voie des récepteurs de mort :

La protéine FLIP est un inhibiteur de l'activation de la caspase 8 qui bloque le recrutement de la procaspase 8 aux récepteurs de mort (Peter et al., 2004). L'activation de la voie des ERK 1/2 induit l'expression de l'ARNm de FLIP (Kazama et al., 2000). L'induction de FLIP par la voie des ERK 1/2 est liée à l'inhibition de l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas (Yeh et al., 1998) ou par la surexpression de FADD, deux constituants majeurs de la voie des récepteurs de mort.

L'induction de FLIP par la voie des ERK 1/2 entraîne aussi l'inhibition de la mort cellulaire par la perte d'ancrage à la matrice extracellulaire (12 Aoudjit), ce qui laisse supposer l'implication de la caspase 8 dans cette forme de mort. L'induction transcriptionnelle de FLIP n'est cependant pas le seul mécanisme d'inactivation de la voie des récepteurs de mort par les ERK 1/2 puisque l'inhibition de la caspase 8 dans les cellules épithéliales MCF-10, n'implique pas l'induction du messager de FLIP (Schulze et al., 2001).

Inhibition de la voie mitochondriale :

La voie des ERK 1/2 inhibe par des mécanismes post-traductionnels l'activité et l'expression des protéines proapoptotiques Bad, Bim et Bax. Ainsi, l'activation de la voie des MAPK entraîne la phosphorylation de la protéine Bad sur sa sérine 112, par RSK1 et RSK2 et diminue le taux de mort cellulaire induit par la privation de facteurs de survie (Shimamura et al., 2000). La phosphorylation de Bad provoque sa liaison à la protéine 14-3-3, sa délocalisation à l'écart de la mitochondrie et sa dissociation de la protéine antiapoptotique Bcl-xL (She et al., 2000).

L'activation de la voie des ERK 1/2 induit aussi la phosphorylation de BimEL sur la sérine 69, ce qui provoque sa dégradation par le protéasome (Ley et al., 2003, Luciano et al., 2003). Il faut noter que la kinase MAPK1 est capable de phosphoryler directement la sérine 69 *in vitro* (Monick et al., 2005). Cette augmentation de la dégradation de Bim par la voie des MAPK permettrait de lever l'inhibition exercée par Bim sur la protéine antiapoptotique Bcl-xL (Luciano et al., 2003). Enfin, dans les fibroblastes CCL39, l'activation de la voie des ERK 1/2 induit une inactivation de Bax (Weston et al., 2003).

La voie des ERK 1/2 induit les protéines de survie Bcl-2, BclxL et Mcl-1 :

Le rôle antiapoptotique de la voie des MAPK est associé à l'induction des protéines de survie Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans différents modèles cellulaires et notamment dans les cellules tumorales issues de leucémie (Yu et al., 2002), de mélanome (Zhang et al., 2003) ou de tumeur du pancréas. Ce contrôle des protéines antiapoptotiques permet d'inhiber la sortie du cytochrome c. Cette induction des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dépend à la fois de mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels. Des résultats montrent que la voie des ERK 1/2 régule la survie cellulaire en maintenant le ratio des protéines de la famille de Bcl2 en faveur de l'intégrité de la membrane mitochondriale.. Cependant dans certains types cellulaires comme les cellules épithéliales MCF-10, l'activation de la voie des ERK 1/2, bien qu'elle favorise la survie cellulaire, ne suffit pas à empêcher la sortie du cytochrome c (Rytomaa et al., 2000). Cette observation indique que le contrôle de l'intégrité de la membrane mitochondriale n'est pas le seul mécanisme d'inhibition de la mort mitochondriale par les ERK 1/2.

- MAPK et mort cellulaire par apoptose

L'apoptose induite par la voie des MAPK dépend de p53

L'expression de p53 est contrôlée en permanence par la protéine MDM2, qui se fixe à p53 et entraîne sa dégradation par le protéasome. Lorsque le génome subit des altérations, la liaison entre p53 et MDM2 est inhibée par différents mécanismes post-traductionnels et p53 s'accumule, induisant alors la protéine p21.

Lorsque les dommages causés sont trop importants, p53 déclenche la mort cellulaire en réprimant des gènes codant pour des protéines de survie comme Bcl-2 ou en induisant des gènes codant pour des protéines de mort comme le récepteur de mort DR5, ou la protéine de mort mitochondriale Bax (Slee et al., 2004).

L'activation prolongée de la voie des ERK1/2 par des agents génotoxiques induit la protéine proapoptotique p53. Cette induction dépend de la phosphorylation de p53 par les ERK1/2 (Shieh et al., 1997), ce qui a pour effet de stabiliser p53 en empêchant sa liaison à la protéine MDM2 et sa dégradation par le protéasome. L'induction et l'activation de p53 par la voie des ERK1/2 sont associées avec la diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 (Tang et al., 2002) et avec la répression de son gène (Yeh et al., 2004). Ainsi, l'un des mécanismes d'induction de la mort par la voie des ERK1/2 est de stabiliser p53 qui provoque l'activation de la mort mitochondriale par diminution du taux de Bcl-2.

La voie des MAPK est activée dans les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson

La mort neuronale qui fait suite à un stress oxydant participe aussi à l'origine des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que la voie des ERK1/2 est aussi impliquée dans ces modèles de mort cellulaire. Les études post-mortem réalisées sur des coupes histologiques de cerveau de sujets atteints de maladie d'Alzheimer (Pei et al., 2002, Zhu et al., 2003) ou de la maladie de Parkinson (Zhu et al., 2003), montrent la présence des formes actives des ERK1/2 dans les neurones des zones dégénérées et en particulier dans l'hippocampe.

Dans les neurones en culture, l'inhibition des ERK1/2 par le PD98059 bloque la mort induite par le peptide β -amyloïde ou par la neurotoxine 6-Hydroxydopamine (6-OHDA). Ces composés, qui sont respectivement impliqués dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, induisent une mort cellulaire dépendante des ROS (Xie et al., 2002).

Dans le cas de la 6-OHDA, l'induction des ROS entraîne l'activation de la voie des ERK1/2 (Kulich et al., 2003). Ces résultats indiquent que, comme dans l'ischémie cérébrale, l'activation des MAPK par les ROS serait impliquée dans la mort neuronale au cours des maladies neurodégénératives.

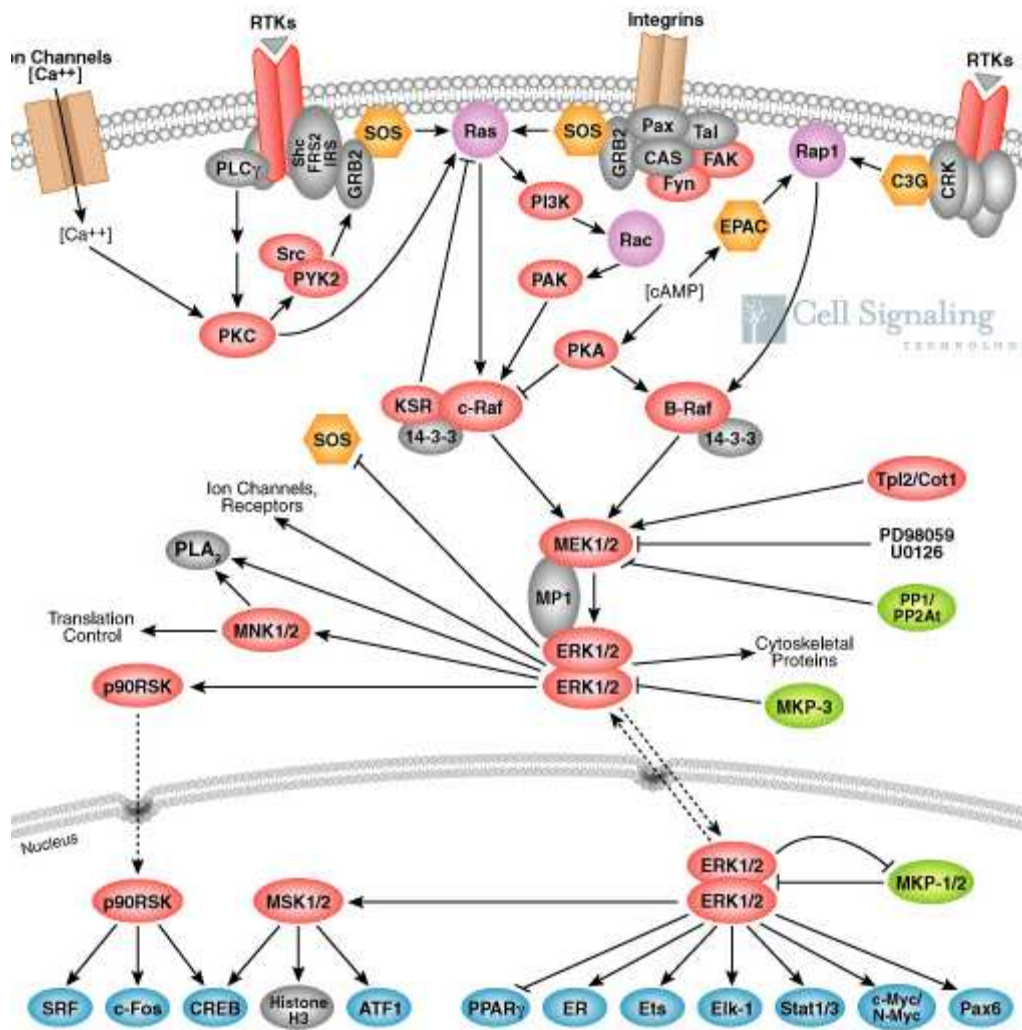


Figure 16 : La voie de signalisation Raf/MAPK

La stimulation des récepteurs membranaires couplés à Ras, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, active Raf par un mécanisme complexe. La kinase Raf, initiatrice de la voie des ERK 1/2, active par une double phosphorylation les kinases à spécificité tyrosine et thréonine MEK1/2 qui phosphorylent et activent les kinases ERK 1/2. Les ERK 1/2 activées sont libérées du complexe et transmettent le signal généré par les récepteurs en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments sub-cellulaires (Cell signaling 2005).

III.2.2.2. Les voies de signalisation de JNK et p38

Les kinases JNK et p38 appartiennent à la famille des SAPK (*Stress-Activated Protein Kinase*). La voie JNK (*c-Jun NH2-terminal Kinase*) est activée par les stimuli associés à un stress comme le choc thermique ou osmotique, les cytokines inflammatoires comme le TNF α ou les rayons ionisants.

Comme pour la voie JNK, la voie p38 est activée par le stress thermique et osmotique et les cytokines inflammatoires. Elle est composée de quatre protéines p38 α /Mpk2/CSBP, p38 β , p38 δ /SAPK4 et p38 γ /SAPK3. Les p38 sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et

tyrosine de leur boucle d'activation TGY par les MAPK Kinases MKK3, 4 et 6 (Derijard et al., 1995). La voie p38 joue un rôle important dans l'induction des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et dans la différenciation des neurones et des myoblastes (Puri et al., 2000). La voie p38 est aussi impliquée dans l'apoptose induite par Fas, par la perte d'ancrage et pourrait jouer un rôle synergique avec la voie JNK dans l'induction de l'apoptose dans les cellules PC12 (Xia et al., 1996).

III.2.3. Le récepteur p75^{NTR}

Le récepteur p75 a tout d'abord été décrit sous le nom de récepteur au NGF (*nerve growth factor*), p75^{NGFR}, du fait de sa capacité à interagir avec le NGF, (Chao et al., 1994 ; Hempstead et al., 1995). Il est maintenant connu sous le nom de récepteur de faible affinité pour les neurotrophines (NT), p75^{NTR} (TNFRSF 16). En effet, il est capable de se lier à toutes les NT, NGF, BDNF et NT-3 et NT-4, avec la même affinité. Chacune de ces NT peut également interagir spécifiquement avec un des récepteurs à activité tyrosine kinase, Trk (NGF : TrkA ; BDNF et NT-4 : TrkB ; NT-3 : TrkC), et l'association de ces deux types de récepteurs, Trk et p75^{NTR}, permet d'augmenter l'affinité des récepteurs Trk pour les NT.

Son expression a été détectée au niveau de cellules du système nerveux central dans un grand nombre de populations cellulaires (Ernfors et al., 1988 ; Cotrina et al., 2000) durant les stades précoces du développement, avec une diminution lors du développement ultérieur et surtout à la naissance. Il a également été largement détecté dans des cellules du système nerveux périphérique avec une expression plus réduite chez l'adulte.

Les NT qui se lient au récepteur p75^{NTR} sont des facteurs de croissance que l'on retrouve principalement au niveau du système nerveux central. Elles jouent un rôle très important lors du développement du système nerveux des mammifères. Elles régulent la survie, la mort et la différenciation des neurones durant le développement embryonnaire et après la naissance, mais également dans le maintien neuronal tout au long de la vie. Cette famille de facteurs de croissance comprend quatre membres chez les mammifères : le NGF (Levi-Montalcini, 1966 et 1987), le BDNF (Leibrock et al., 1989), la NT-3 (Hohn et al., 1990) et la NT-4 (Halbook et al., 1991) (également connue sous le nom de NT-4/5 et NT-5) (Snider et al., 1994). Cependant, il a été montré que toutes les NT ne se lient pas exactement au même endroit du récepteur p75^{NTR}. Ces différences d'interaction peuvent induire des changements conformationnels multiples du récepteur et expliquer les effets spécifiques de chaque NT sur la transduction du signal par p75^{NTR} (Dobrowsky et al., 1995 ; Mukai et al., 2000).

La diversité des NT ainsi que le double système de récepteurs à haute et basse affinités rend la régulation par les NT très complexe. Les récepteurs p75^{NTR} et Trk peuvent influencer simultanément la décision de vie ou de mort des cellules, cette décision dépendant des NT exprimées (Fundin et al., 1999).

Les voies de signalisation induites par le récepteur p75^{NTR}

Au niveau cellulaire, la fixation des NT sur leur récepteur peut induire des réponses très diverses qui peuvent même parfois sembler paradoxales. Les NT peuvent ainsi induire la prolifération des cellules ou la sortie du cycle cellulaire, la croissance ou l'arrêt de la croissance, et protéger les cellules de l'apoptose ou au contraire induire la mort cellulaire. Cette diversité peut être due au fait que le récepteur p75^{NTR} possède la particularité d'induire différentes voies de signalisation selon qu'il est ou non associé aux récepteurs de haute affinité pour les NT, selon les cellules où il est exprimé, et selon la présence ou l'absence d'un de ses ligands.

- Les voies aboutissant à la survie ou à la différenciation cellulaire

Plusieurs voies de signalisation peuvent être activées par le récepteur p75^{NTR}

- Translocation nucléaire de NF- κ B

L'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- κ B répond à des stimuli variés tels que l'exposition à des cytokines, des ultraviolets, et des produits bactériens ou viraux (Ghosh et Karin, 2002).

Une réponse possible des cellules dont le p75^{NTR} est activé, est la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau. Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la survie cellulaire (O'Neill et Kaltschmidt, 1997). Ainsi, l'activité de NF- κ B peut être augmentée en présence de NGF dans les cellules de Schwann exprimant p75^{NTR} mais pas le récepteur TrkA. Cette augmentation n'est pas détectable en présence de BDNF ou de NT-3 au niveau de ces cellules qui expriment les récepteurs TrkB et C. L'activation de NF- κ B par l'intermédiaire du récepteur p75^{NTR} a été montrée dans plusieurs autres types cellulaires (Hughes et al., 2001) et favorise généralement la survie cellulaire (Khursigara et al., 2001). A la suite de l'activation du récepteur p75^{NTR}, NF- κ B peut se fixer sur les régions régulatrices d'un gène cible codant la molécule d'adhérence des cellules neuronales L1, molécule qui intervient dans l'adhésion neurone-neurone, dans la croissance neuritique et

dans les interactions neurones-cellules de Schwann lors de la formation de la gaine de myéline (Itoh et al., 1995 ; Seilheimer et Schachner., 1987 ; Anton et al., 1994).

- La voie PI-3 kinase

Le récepteur p75^{NTR} peut activer la voie de la PI-3 kinase et de Akt. L'activation de la PI-3 kinase et d'Akt, en aval dans la voie de signalisation, est importante pour induire la survie cellulaire de façon indépendante ou dépendante des Trk (Ulrich et al., 1998). La PI-3 kinase est composée de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice, p85, et une sous-unité catalytique, p110. L'activation de Akt est associée à une augmentation, en amont, de la phosphorylation de tyrosines de différentes protéines dont la sous-unité régulatrice p85 de la PI-3 kinase. Il existe de multiples cibles pour Akt comme I κ B kinase 1 qui, une fois phosphorylée, joue un rôle dans l'activation de NF- κ B (Romashkova et Makarov, 1999), ainsi que d'autres protéines comme la caspase-9 (Cardone et al., 1998), Bad ou CREB (*Cyclic AMP response element binding protein*) (Du et Montminy, 1998).

A coté de ces voies de survie, le récepteur p75^{NTR} peut induire la mort des cellules. Ainsi, le récepteur p75^{NTR} peut avoir un effet pro-apoptotique *in vitro* mais également *in vivo* dans différents types cellulaires. Il est cependant important de remarquer qu'il est capable d'induire la mort des cellules en présence ou non d'une NT, c'est-à-dire de façon ligand-dépendante ou indépendante (Barrett et Georgiou, 1996).

IV. Les modèles expérimentaux d'étude de l'homocystéine

Compte tenu de l'importance que revêt la participation de l'homocystéine dans diverses pathologies, différents travaux ont été dévolus au développement de modèles d'étude.

IV.1. Modèles génétiques

Plusieurs modèles cellulaires et animaux ont été développés pour étudier les causes conduisant à une augmentation de l'homocystéine et, par la suite, les conséquences sur le métabolisme et/ou sur le devenir des cellules et des tissus.

IV.1.1. Modèle de souris CBS *knockout*

Les cas les plus courants d'homocystinurie sont causés par un déficit congénital en cystathionine- β -synthase (CBS), enzyme limitante dans la voie de transsulfuration et qui permet la condensation irréversible de l'homocystéine et la sérine. Les cas d'homozygotie *cbs* $-/-$ représentent une naissance sur 300 000. Les manifestations cliniques des homozygotes comprennent un retard mental, une ostéoporose, des anomalies du squelette et un foie anormalement gras. Une artériosclérose prématurée et un thromboembolisme sont caractéristiques chez les homocystinuriques et les complications thromboemboliques sont les causes de mort les plus fréquentes chez ces patients. Plusieurs études ont montré que les patients souffrant de maladies artérielles coronariennes ont des homocystéinémies plus élevées que des sujets contrôles. Il fallait donc déterminer si ces augmentations plasmatiques d'homocystéine étaient une cause de maladies cardiovasculaires ou une conséquence de ces maladies. Les modèles animaux existant avant 1995 ne permettaient pas de conclure dans un sens ou dans l'autre, et ce sont les travaux de Watanabe et al. (1995) qui ont abouti au développement d'un modèle de souris transgénique déficiente en CBS (*cbs* $-/-$, ou *CBS KO*). Ce modèle est aujourd'hui couramment utilisé dans les différentes études qui traitent de la toxicité de l'homocystéine. Il ne sera détaillé ici que le modèle CBS KO car les animaux hétérozygotes *cbs* $+/-$ ne présentent pas de différences notables avec le type sauvage dans les conditions normales de nutrition.

- Caractéristiques morphologiques et biochimiques des souris CBS *knockout*

Les premières études menées par l'équipe de Watanabe ont montré qu'au moment du sevrage (J21), le nombre de souris sauvages et d'hétérozygotes était proche du ratio attendu 1:2 (80:151). Cependant, le nombre d'homozygotes était significativement plus faible, 42 obtenues contre 77 attendues ($P < 0,001$) et ce nombre tombait à 18 à 4 semaines et à 15 au bout de 8 semaines. Ces données laissent penser que l'inactivation du gène *cbs* n'affecte pas la survie embryonnaire mais a une forte incidence durant la période postnatale.

La croissance des mutants est correcte jusqu'à ~ J7 puisqu'il n'y a pas de différence notable au niveau du poids. En revanche, les homozygotes montrent un retard de poids vers le J14 qui ne sera pas compensé par la suite. La courbe de survie montre une chute importante entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine chez les animaux mutants homozygotes.

La survie des animaux est donc un facteur limitant pour les études sur les effets à long terme de l'homocystéine. Une autre caractéristique de ces souris transgéniques est l'apparition

systematique de stéatose hépatique. Cette pathologie traduit un dysfonctionnement du métabolisme lipidique et c'est un point qui a soulevé de nombreuses interrogations concernant le lien potentiel entre l'homocystéine et l'accumulation de lipides dans les hépatocytes.

Il apparaît clairement que l'inactivation du gène de la CBS entraîne des modifications profondes dans l'équilibre cellulaire puisque, en dehors de la survie, la morphologie des animaux transgéniques est affectée. Il en va de même pour les différents métabolites qui gravitent directement ou non autour du métabolisme de l'homocystéine. La modification la plus attendue et la plus marquante est l'augmentation considérable des taux plasmatiques d'homocystéine chez les animaux *cbs* *-/-*.

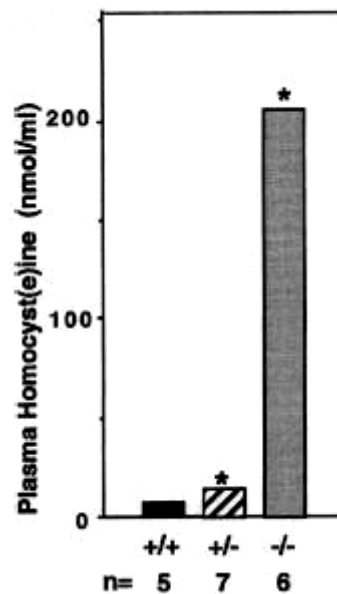


Figure 17 : Niveau d'Hcy plasmatique chez les souris CBS KO âgées de 21 jours. Les mâles et les femelles sont représentés et les valeurs sont de $6,1 \pm 0,8$ μM pour les sauvages (+/+, n = 5), $13,5 \pm 3,2$ μM pour les hétérozygotes (+/-, n = 7) et $203,6 \pm 65,3$ μM pour les homozygotes (-/-, n = 6), *P<0,001 (Watanabe, 1995)

Ces souris transgéniques servent actuellement de modèle pour l'étude des conséquences d'une hyperhomocystéinémie sévère sur le métabolisme des monocarbone, sur l'induction d'un stress oxydant, sur les effets proinflammatoires de l'homocystéine, etc.

IV.1.2. Autres modèles de souris transgéniques impliquant le cycle de reméthylation de l'homocystéine et conduisant à une stéatose hépatique

D'autres études ont conduit à l'établissement d'animaux transgéniques, notamment sur des protéines impliquées dans le cycle de reméthylation de l'homocystéine.

- *mat1A knockout* : Il s'agit de la forme hépatique postnatale de la MAT I/III codant pour la sous-unité catalytique $\alpha 1$. Ce modèle a été développé par Lu et al. (2001) et a montré une sensibilité à l'apparition d'une stéatose hépatique provoquée par une déficience en choline dès 3 mois, et une apparition spontanée de cette stéatose de type macrovésiculaire dès 8 mois. Les taux de SAM s'effondrent d'un facteur 4 chez les KO tandis que la SAH ne varie pas. On observe aussi une diminution du glutathion réduit et du glutathion oxydé, à l'origine d'une faiblesse dans la lutte contre le stress oxydant. Enfin, il y a induction de l'expression de certaines protéines liées au métabolisme de l'homocystéine, notamment la CBS et la BHMT.

- *mthfr knockout* : le modèle *mthfr* KO développé par (Chen et al. 2001) montre de nombreux retards de développement par rapport aux souris témoins ainsi que des stéatoses hépatiques macrovésiculaires. Les taux d'homocystéine augmentent d'un facteur 10 chez les KO pour atteindre $\sim 30 \mu\text{M}$ versus $3\text{-}5\mu\text{M}$ chez les sauvages. Les taux hépatiques et cérébraux de méthyltétrahydrofolate (produit de la MTHFR) sont aussi très largement diminués (~ 8 fois) chez les KO. Les taux de SAM ne varient pas mais on observe une augmentation des taux de SAH sûrement en lien avec l'accumulation d'homocystéine.

- *adk knockout* : l'Adénosine kinase catalyse la phosphorylation de l'adénosine en AMP. Cette réaction est prépondérante dans le métabolisme de l'adénosine car l'ADK possède une forte affinité pour ce substrat ($K_M = 0,2\text{-}2 \mu\text{M}$). Le modèle KO a été développé par Boison et al. (2002) et a montré également une stéatose macrovésiculaire qui se développe dès les premiers instants de la période postnatale. Cette modification entraîne un déséquilibre dans le métabolisme énergétique avec une diminution d'ATP hépatique tandis que les taux de SAM et SAH augmentent. L'invalidation du gène de l'ADK se traduit par une accumulation d'adénosine qui va perturber l'équilibre Hcy/SAH en favorisant la synthèse de SAH. La SAH va rétroinhiber les méthyltransférases SAM-dépendantes et ainsi conduire à l'accumulation de SAM.

- ***pent knockout*** : La Phosphatidyléthanolamine méthyltransférase catalyse la triple méthylation, SAM-dépendante, de la phosphatidyléthanolamine (PE) en phosphatidylcholine (PC). La PC est le phospholipide le plus répandu chez les mammifères et sa synthèse commence par la condensation en 3 temps de la choline avec le diacylglycérol. Une autre voie de synthèse utilise la triple méthylation de la PE par la PEMT exprimée seulement au niveau du foie. Walkey et Vance (1997) ont montré que la disruption de la PEMT empêche la transméthylation de la méthionine vers la synthèse de la phosphatidylcholine.

- ***mtr et dnmt knockout*** : Les travaux menés sur l'invalidation du gène de la mtr n'ont pas permis, pour l'instant, de produire de telles lignées car les animaux transgéniques pour la Méthionine méthionine synthase ne survivent pas au-delà de quelques jours de vie embryonnaire (Swanson et al., 2001). De la même manière, les souris déficientes en ADN méthyltransférases ne dépassent pas le stade embryonnaire (Li, et al., 1992).

Ces quelques exemples montrent qu'une déplétion dans l'une des protéines du cycle de l'homocystéine (y compris la CBS) va aboutir à l'apparition d'une stéatose hépatique, en parallèle avec une modification des taux de SAM et/ou de SAH. Il apparaît clairement que le potentiel de méthylation représenté par ce rapport SAM/SAH est déterminant dans ces modèles.

IV.2. Modèles nutritionnels

Les modèles nutritionnels sont relativement variés ; ils ont pour but commun de bloquer la voie de reméthylation de l'homocystéine pour favoriser son accumulation.

En regard du cycle de la méthionine et des différentes pathologies, de nombreuses équipes ont développé des modèles de rats ou de souris carencés en folates pour étudier, entre autres, les pathologies neurologiques (Kruman et al. 2002), immunologiques (Kim et al., 2002) ou cardiovasculaires (Zhang et al. 2004). Cette carence peut être également associée à une supplémentation en méthionine. La supplémentation en méthionine a pour effet d'inhiber l'activité de la méthionine synthase et donc d'accentuer l'accumulation d'homocystéine. La méthionine synthase peut être également inhibée par une réduction de son co-facteur, la vitamine B12 (Keating et al., 1988 ; Shane et al., 1977). Comme cela a été évoqué précédemment, une carence en vitamine B12 est relativement difficile à obtenir. En effet, les besoins sont faibles et une partie de la vitamine B12 se retrouve dans les excréments des rongeurs. Le rat étant connu pour être coprophage, ce fait est suffisant pour subvenir à ses besoins en vitamine B12. Deux stratégies sont par conséquent envisageables : soit stocker les animaux dans des cages

métaboliques (et donc limiter l'accès aux fécès), soit réaliser une gastrectomie (Brunaud et al., 2003).

Le blocage de la reméthylation de l'homocystéine peut également être obtenu en agissant sur la voie de la BHMT. Pour cela, Varela-Moreiras et al. (1995) ont carencé des rats en choline qui est un précurseur de la bétaine. Un tel régime favorise l'hyperhomocystéinémie en augmentant de 50% la concentration en SAH (Zeisel et al. 1989 ; da Costa et al. 2005).

IV.2.1. Modèles nutritionnels déficitaires en précurseurs méthylés

Le concept de régime *methyldeficient* (déficient en substrats méthylés) est apparu en 1975 avec les travaux de Tsai et Leveille qui maintenaient des rats à température ambiante ou au froid (2°C) en leur administrant un régime complet ou un régime déficient en choline. Dans le même temps, Lyman et Miljanich carenciaient des rats en méthionine et choline pour en mesurer les conséquences sur la teneur en phosphatidylcholine hépatique. Hoffman et Cornatzer développent en 1980 un régime déficient en choline, méthionine, folate et vitamine B12 afin d'observer, *in vitro*, le métabolisme de la choline à travers l'activité PEMT et la Choline kinase. Les résultats obtenus montrent un ralentissement global du métabolisme de la choline ainsi qu'une diminution des phénomènes de méthylation cellulaire. En 1983, l'équipe de Linell, développent un régime dépourvu de choline, méthionine et vitamine B12 afin d'évaluer la composition et la distribution tissulaire des différentes isoformes de vitamines B12. Ils en déduisent ainsi que la méthylcobalamine, cofacteur indispensable de la Méthionine synthase, est un métabolite cellulaire protégé. En effet, dans les périodes de carence, les taux de méthylcobalamine semblent stables par rapport aux autres isoformes de cobalamine. En 1988, Chandar et Lombardi développent un autre modèle à long terme de carence en choline et méthionine mais correctement pourvu en vitamine B12 et folates. Les rats soumis à ce régime développent dans 20-50% des cas des hépatocarcinomes en moins de 24 mois. En fait, la majorité des régimes méthyle-déficieux reposent sur une carence en choline et méthionine renforcée ou non par une carence en vitamine B12 ou folate. La plupart de ces modèles ont pour objet l'établissement d'un lien entre déficit en substrats méthylés, hypométhylation cellulaire et développement d'hépatocarcinome sans ajout de carcinogène.

IV.2.2. Modèles nutritionnels conduisant à une hyperhomocystéinémie

Plusieurs travaux ont été menés dans notre Laboratoire au cours de ces dernières années, portant notamment sur les besoins nutritionnels en vitamine B12. Une de ces études visait à

démontrer l'importance d'une supplémentation parentérale en vitamine B12 chez des patients déficients en Facteur intrinsèque (transporteur gastrique de la vitamine B12) ou ayant subi une gastrectomie totale ou partielle. Les premiers modèles nutritionnels et chirurgicaux développés par Brunaud et al. (2003) sur des rats Fisher F344 comportaient une cohorte de mâles adultes totalement déficients en vitamine B12. Pour obtenir cette déficience, une gastrectomie totale était pratiquée sur l'animal et cela en comparaison avec un modèle nutritionnel de carence (1-18 mois) en groupements méthyles. Les rats opérés sont dans l'incapacité d'absorber de la vitamine B12, et leur taux de mortalité est largement supérieur aux autres groupes. Pour autant, on peut observer une augmentation non significative de l'homocystéine plasmatique avec une perte de poids chez les animaux opérés. Les résultats obtenus sont décrits dans la partie *Résultats et discussion*.

Le deuxième modèle développé par Ayav et al. (2005) sur des rats Fisher F344 comportait une cohorte de mâles adultes thyroïdectomisés avec ou sans régime méthyle-déficient (B12, folates, méthionie et choline), durant deux mois. Le but était de comparer les niveaux d'homocystéine chez des animaux thyroïdectomisés par rapport un régime méthyle-déficient. Les résultats montrent une diminution du taux plasmatique de l'homocystéine chez les animaux thyroïdectomisés, à l'inverse d'autres travaux portant sur ce thème (Nedrebo et al., 1998). Par ailleurs, les taux plasmatiques des animaux déficients en vitamines B2, B9, B12 et choline montrent une augmentation de l'homocystéinémie.

Un autre modèle original à été développé au laboratoire par Blaise et al., en 2005 sur lequel des études sont encore menées actuellement. Il consiste à mettre des rates adultes en carence en donneurs de groupements méthyles avant la période gestationnelle et de prolonger cette carence jusqu'au sevrage de la portée. Le déficit est produit par un régime alimentaire appauvri en vitamines B12, B2, folates et choline. Le but est de reproduire les conséquences cliniques d'une carence maternelle.

Cette étude, contrairement aux travaux menés sur les souris génétiquement modifiées, notamment délétées du gène de la cystathionine béta-synthase, conserve l'environnement génétique et donc se rapproche des situations de malnutrition pendant la grossesse.

Les résultats révèlent que les nouveau-nés présentent un retard de croissance et des malformations squelettiques, ils développent une hyperhomocystéinémie modérée, en lien avec des perturbations du métabolisme hépatique de l'homocystéine et l'apparition d'une stéatose. Par ailleurs, la carence maternelle perturbe le développement neurocomportemental de la progéniture qui présente des scores inférieurs aux animaux témoins dans différents tests.

IV.2.3. Modèles combinés *cbs* +/- et régime hyperhomocystéinémian

Alors que les animaux hétérozygotes *cbs* +/- présentent une hyperhomocystéinémie modérée ($13,5 \pm 3,2$ versus $6,1 \pm 0,8$ μM chez les contrôles), sans anomalie morphologique apparente, les souris *cbs* +/- nourries avec un régime supplémenté en choline retrouvent des valeurs normales d'homocystéinémie (Schwan et al., 2004). En 2002, Baumbach et Lentz ont associé un régime riche en méthionine à des souris *cbs* +/-, régime qui entraîne une hyperhomocystéinémie, aussi bien chez les souris *cbs* +/+ que les *cbs* +/- (respectivement $17,2 \pm 4,6$ versus $21,2 \pm 3,9$ μM). Ce régime enrichi en méthionine n'est donc pas suffisant pour induire une hyperhomocystéinémie significativement plus forte chez les individus hétérozygotes. Depuis longtemps, l'augmentation de l'homocystéinémie chez des patients est associée à une déficience en folates et/ou vitamine B12 et c'est en toute logique qu'un modèle nutritionnel riche en méthionine et pauvre en folate a été associé à des souris hétérozygotes. Ainsi, parmi les utilisateurs de ce modèle on peut citer Vitvitsky et Banerjee (2004) dont les animaux *cbs* +/- soumis à ce régime ont des homocystéinémies >60 μM alors que les *cbs* +/+ étaient à ~ 20 μM . Dans des conditions normales de nutrition, ces souris ont respectivement des homocystéinémies à ~ 10 μM et ~ 6 μM .

IV.2.4. Modèles *Folbp1*^{+/-} et *Folbp1*^{-/-}

Spiegelstein et al 2002, ont mis en place un modèle de souris transgéniques *Folbp1*^{-/-}. L'absence de cette protéine impliquée dans le transport de l'acide folique présente des conséquences morphologiques sévères chez le fœtus, entraînant la mort *in utero*. Ces embryons présentent des anomalies sévères de fermeture du tube neural, ainsi que des malformations cranio-faciales telles que les fentes labio-maxillo-palatines (Tang et al., 2005 ; Spiegelstein et al., 2003).

Le sembrayons *Folbp1*^{+/-} hétérozygotes ne présentent pas d'anomalies morphologiques aussi sévère que chez les homozygotes, une grande partie des embrayons sont phénotypiquement non différents des embrayons sauvages (Tang et al. 2005).

OBJECTIFS

L'hyperhomocystéinémie est un facteur important dans le contexte de nombreuses pathologies, que celles-ci soient cardiovasculaires, neurologiques ou digestives. L'élévation de l'homocystéine peut être d'origine génétique mais aussi nutritionnelle, en raison d'une insuffisance de l'apport en vitamines B (folates, B12) qui interviennent comme cofacteurs indispensables dans le métabolisme des monocarbones. Alors que les risques sanitaires en lien avec l'homocystéine touchent toutes les classes d'âge, les perturbations du métabolisme des monocarbones peuvent être délétères pour le développement et la maturation du cerveau, avec des conséquences fonctionnelles. En effet, des études antérieures réalisées au Laboratoire sur un modèle de rats nés de mères nourries jusqu'à la fin de la période d'allaitement avec un régime carencé en précurseurs de groupements méthyles, parmi lesquels les folates et la vitamine B12, ont montré une accumulation relative d'homocystéine associée à une mort cellulaire par apoptose dans des structures cérébrales spécifiques, telles que l'hippocampe et le cervelet. Ceci s'accompagnait de déficits cognitifs et de troubles locomoteurs perdurant à long terme, en dépit d'un retour des animaux à un régime alimentaire normal après le sevrage.

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'un déficit en ces micronutriments sur les cellules neuronales, en termes de prolifération, différenciation, survie cellulaire et plasticité, ainsi qu'aux mécanismes sous-jacents.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé deux modèles cellulaires. Le premier d'entre eux correspond à une lignée de progéniteurs neuronaux issus de l'hippocampe d'embryons de rat. Notre choix se justifie par le fait que ces cellules présentent les principales caractéristiques des neurones de l'hippocampe au cours du développement *in vivo* et par le fait que les cellules de l'hippocampe sont particulièrement sensibles aux facteurs environnementaux – dont l'homocystéine – et sont le plus souvent affectées dans les pathologies associant des troubles de la cognition. Après une caractérisation approfondie de ce modèle, celui-ci a été utilisé pour étudier l'impact d'une carence en folate.

Le second modèle a été développé au Laboratoire pour étudier les effets d'un défaut de l'apport en vitamine B12 qui, chez l'homme, affecte le développement et les fonctions cérébrales. En effet, il n'existait pas jusqu'alors de modèle cellulaire pertinent de carence en B12 car les besoins de la cellule sont très faibles et, dans les modèles *in vitro*, sont aisément couverts par la vitamine B12 présente dans le sérum de veau fœtal nécessaire pour l'entretien des cellules en culture.

Pour remédier à cela, des chercheurs du Laboratoire ont conçu un plasmide permettant l'expression d'une protéine chimère composée du transporteur plasmatisque de la vitamine B12,

la transcobalamine II (TCII), et une protéine d'ancrage membranaire d'origine végétale, l'oléosine. Ainsi, le modèle que nous avons exploité consiste en une lignée issue de neuroblastome de souris (NIE-115) transfectée de manière stable avec le plasmide pour permettre, par l'expression de la protéine chimère sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique, la séquestration de la vitamine B12, et ainsi assurer la carence.

Conformément aux objectifs que nous nous sommes fixés, la section expérimentale du mémoire de thèse se décline en trois parties qui s'articulent autour de trois publications :

1. Etude du devenir des progéniteurs de l'hippocampe H19-7 – Différenciation et intégration neuronale : analyse des voies de signalisation impliquées ;
2. Etude d'un déficit en folate sur la prolifération, la différenciation et la plasticité synaptique des progéniteurs neuronaux de l'hippocampe ;
3. Effets d'une carence en vitamine B12 obtenue par transfection stable de la protéine chimère Transcobalamine II-Oléosine sur la prolifération et la différenciation des cellules de neuroblastome NIE-115.

RESULTATS

1^{ère} PARTIE : Etude du devenir des progéniteurs de l'hippocampe H19-7 – Différenciation et intégration neuronale : analyse des voies de signalisation impliquées

I. Objectifs de l'étude

Cette première étude visait avant tout à caractériser de manière approfondie, en termes de survie, différenciation et mort cellulaire associée, le modèle de progéniteurs hippocampiques H19-7 destiné à l'étude des conséquences d'un déficit en folates. Elle présentait toutefois un intérêt double, une fois replacée dans le contexte de la médecine régénérative.

En effet, dans le cadre de la lutte contre les pathologies cérébrales, différentes stratégies ont été développées en faisant appel à la transplantation de cellules souches ou à l'activation de progéniteurs endogènes dans les zones du cerveau présentant une dégénérescence. Celles-ci rencontrent un succès souvent mitigé, en particulier en lien avec les capacités d'intégration des cellules exogènes ou néoformées dans les circuits neuronaux, ainsi qu'avec leur devenir à long terme. Afin d'améliorer les performances de telles approches, il apparaît nécessaire de développer des modèles d'étude pertinents visant à mieux caractériser les propriétés de ce type de cellules et évaluer leur potentiel thérapeutique.

A cet égard, les progéniteurs neuronaux issus de l'hippocampe se présentent comme des candidats de choix, d'une part parce qu'ils sont normalement programmés pour générer des neurones et, d'autre part, du fait que l'hippocampe – structure clé dans les processus cognitifs et la neuroplasticité – est fréquemment le siège de pertes cellulaires dans les atteintes neurodégénératives.

Etant donné que très peu d'études se sont penchées sur les événements cellulaires régissant leur devenir après induction de la différenciation, nous en avons analysé les différentes étapes. En complément, nous avons testé l'aptitude de ces cellules à intégrer un réseau neuronal pré-existant.

II. Publication#1 : Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus* (2009), DOI: 10.1002/hipo.20690.

III. Synthèse de la publication

La lignée H19-7/IGF-IR est issue de l'hippocampe d'embryons de rat de 17 jours. Les cellules ont été immortalisées par la transfection du virus SV40 (*Simien Virus 40*), portant une dénaturation thermosensible dans le gène spécifiant l'antigène T. C'est une lignée pure, composée uniquement de progéniteurs neuronaux qui prolifèrent à la température permissive (34°C) et en présence de l'antigène T actif.

Sans apport exogène de facteurs de croissance, l'induction de la différenciation cellulaire à la température restrictive de 39°C a permis l'obtention d'une population neuronale homogène, comme le révèle l'expression des différents marqueurs testés : Neurofilament 68, NeuroD, NeuN, vimentine, GFAP et PSA-NCAM, avec une augmentation progressive de l'expression des synapsines I et II impliquées dans la régulation des vésicules synaptiques, suggérant que les cellules se développent en neurones matures présentant des capacités synaptogéniques. Par ailleurs, les neurones différenciés ont été identifiés comme étant glutamatergiques (positifs à l'anticorps dirigé contre le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT2), un phénotype très répandu dans l'hippocampe *in vivo*. Un autre critère suggérant la fonctionnalité des cellules est représenté par l'expression de la protéine PSD-95 (*Post-Synaptic Density protein 95*), normalement présente au niveau postsynaptique des synapses excitatrices et qui participe à la mise en place des épines dendritiques.

Si les progéniteurs se différencient en neurones fonctionnels, il apparaît que ce processus s'accompagne, comme pendant les étapes du développement *in vivo*, d'une sélection cellulaire drastique au cours des heures qui suivent. En effet, la quantification de l'ATP révèle qu'environ 60% des cellules meurent dans les 24h après induction de la différenciation. Nos résultats ont montré que cette mort cellulaire est de type apoptotique et met en jeu la voie Erk1/2-dépendante de la mort par apoptose via la voie intrinsèque mitochondriale. Ceci est conforté par la balance d'expression des différentes protéines de la famille Bcl-2, la libération de cytochrome *c* par les mitochondries et l'activation de la caspase-9 puis de la caspase-3, pour finalement aboutir à la fragmentation de l'ADN, étape ultime dans la mort cellulaire par apoptose.

Quant aux neurones survivants, le profil temporel des protéines étudiées par Western-blot suggère qu'ils expriment fortement Akt et phospho-Akt, ainsi que Bcl-2 et Bcl-XL. Cette augmentation des protéines de survie s'accompagne d'une diminution significative de l'activité des caspases.

Dans nos conditions de culture, probablement en raison d'un environnement trophique inadapté pour la survie à plus long terme, les neurones différenciés finissent à leur tour par mourir. De manière intéressante, la protéine pro-apoptotique DAP kinase (*Death-associated*

protein kinase), qui appartient à une famille de kinases régulées par le complexe calcium/calmoduline et qui est très impliquée dans la mort neuronale au cours du développement, est fortement stimulée 24h après le début de la différenciation, tandis qu'apparaît la seconde vague de mort cellulaire. Ceci s'accompagne d'une élévation des niveaux d'expression de p38 et de phospho-p38, phénomène qui coïncide avec la réactivation des caspases.

Collectivement, ces résultats suggèrent que différentes voies de signalisation sont successivement recrutées pour régir le devenir des progéniteurs neuronaux après induction de leur différenciation. Il faut en particulier souligner que la mort cellulaire ultime serait orchestrée par l'activation de deux kinases indépendantes, la DAP kinase et p38 MAP kinase. La participation de p38 semble confortée par l'amélioration significative de la survie cellulaire observée à 24h lorsque les cellules sont traitées avec le PD169316, un inhibiteur spécifique de p38. Aucun inhibiteur de DAP kinase n'étant disponible, à notre connaissance, sur le marché, nous n'avons pas été en mesure d'évaluer de la même façon la participation de cette kinase dans la mort des neurones différenciés.

Enfin, lorsque les progéniteurs sont ensemencés *in vitro* sur des cultures primaires d'hippocampe d'embryons de rat, il apparaît qu'un nombre non négligeable de cellules H19-7 différenciées (identifiables par un marquage préalable des noyaux au BrdU) sont présentes et viables après 6 jours de co-culture. Les investigations menées à l'aide d'anticorps spécifiques ont montré que les neurones H19-7 ont établi des communications fonctionnelles avec les cellules en culture primaire, suggérant leur intégration dans le réseau initial. De plus, des observations similaires ont été faites lorsque les cellules H19-7 étaient mises en présence de cultures primaires de neurones corticaux, indiquant qu'elles peuvent s'incorporer de la même manière dans un réseau de phénotype différent (Figure 1).

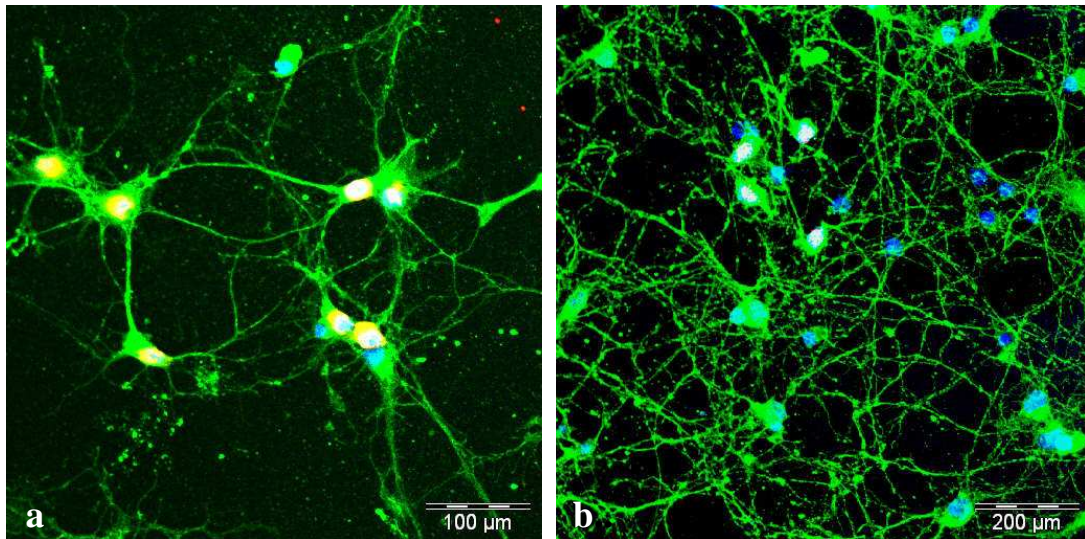


Figure 1 : Co-cultures : cultures primaires de cortex et progéniteurs neuronaux H19-7 :
a. Marquage de la protéine postsynaptique PSD-95, **b.** marquage de la protéine
présynaptique Synaptotagmine I

En conclusion, outre la possibilité offerte d'étudier les mécanismes régissant les processus de prolifération, différenciation et mort cellulaire des progéniteurs neuronaux, la lignée H19-7 présente des critères qui semblent tout à fait appropriés pour des études de thérapie régénérative, comme la greffe de progéniteurs dans différents modèles lésionnels, en particulier de l'hippocampe, chez le rongeur *in vivo*.

2^{ème} PARTIE : Etude d'un déficit en folate sur la prolifération, la différenciation et la plasticité synaptique des progéniteurs neuronaux de l'hippocampe

I. Objectifs de l'étude

Les études de santé publique et expérimentales ont clairement identifié l'importance du métabolisme des macronutriments dans la survenue des maladies neurodégénératives, métaboliques, cardiovasculaires et du cancer. Les micronutriments donneurs de méthyles impliqués dans le cycle des monocarbones (cycle de l'homocystéine) jouent un rôle modulateur de premier plan dans l'association des déterminants nutritionnels avec ces pathologies. Un déficit en ces cofacteurs aboutit à des niveaux élevés d'homocystéine, ce qui représente un facteur de risque pour diverses pathologies du système nerveux central, telles que les anomalies de fermeture du tube neural ou la survenue de la maladie d'Alzheimer chez les sujets âgés (Mattson et Shea, 2003 ; Blaise et al., 2007).

La principale source d'acide folique provient de l'alimentation ; les folates participent à la biosynthèse et au métabolisme des acides aminés et sont nécessaires au développement normal du système nerveux.

Il va de soi que le devenir des progéniteurs neuronaux est influencé par toutes sortes de facteurs, parmi lesquels figurent les facteurs nutritionnels, et en particulier les micronutriments. Etant donné que le déficit en acide folique a été décrit comme inhibant la prolifération des cellules progénitrices *in vivo* chez l'adulte et de progéniteurs neuronaux embryonnaires *in vitro* (Kruman et al., 2005), et compte tenu de la forte sensibilité de l'hippocampe à l'homocystéine (Blaise et al., 2007), nous avons choisi d'étudier les effets d'une déficience en folate sur la prolifération, la différenciation et la plasticité neuronale sur les progéniteurs hippocampiques H19-7.

II. Publication#2 : Folate deficiency affects hippocampal neuronal progenitor proliferation, differentiation, and synaptic plasticity. Journal of Neuroscience, soumise.

Folate deficiency affects hippocampal neuronal progenitor proliferation, differentiation, and synaptic plasticity

Nassila Akchiche^{1,2}, Jean-Luc Daval^{*1,2}, Grégory Pourié^{1,2}, Violette Koziel^{1,2}, Jean-Marc Alberto^{1,2}, Romain Rivet^{1,2}, Sandra Audonnet^{1,2}, Jean-Louis Guéant^{1,2,3} and Carine Bossenmeyer-Pourié^{*1,2}

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

***Running title:* Hippocampal progenitor fate under folate deficiency**

***Author for Correspondence:* Dr C. Bossenmeyer-Pourié, PhD, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, FRANCE**

Phone: (33) 3 83 68 33 01 ; Fax : (33) 3 83 68 32 79 ; E-mail: carine.pourie@scbiol.uhp-nancy.fr.

Acknowledgements: N.A. is indebted to the “Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale” and the “Région Lorraine” for support.

Keywords: neuron progenitor, proliferation, differentiation, apoptosis, plasticity, folate, homocysteine.

ABSTRACT

The fate of neuroprogenitors may be influenced by various factors, including micronutrients. Among them, folate is required for normal brain development. It acts as a cofactor in the one-carbon metabolism, and folate shortage has been associated with elevated levels of homocysteine that is known as a neurotoxin and a risk factor for various pathologies. According to the importance of folate status in neuronal homeostasis, we studied the consequences of folate deficiency on H19-7 rat neuronal progenitors. Folate deprivation was obtained by using culture media lacking B9 starting from 24h before induction of cell differentiation. Treatment was shown to alter one-carbon metabolism, leading to increased homocysteine concentrations. Whereas proliferation and migration capacities were reduced in deficient cells, folate shortage sensitized progenitors to differentiation-associated apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway, a process involving PP2A repression and cyclin E elevation. Also, differentiation and synaptic plasticity were dramatically affected, with reduced neurite outgrowth and ectopic expression of various cell components such as PSA-NCAM, vesicular glutamate transporter VGLUT2, and synapsins I and II. Synaptic dysfunction was additionally suggested by reduced PSD-95 clustering, an indicator of synaptic activity and integrity. Therefore, in the context of the potential use of neuronal progenitors in regenerative strategies, our observations suggest that folate status should be taken into account to improve cell survival and plasticity.

Introduction

Because of the biological potential of neural stem cells and progenitors in neural repair, there has been much excitement about the possibility of recruiting or transplanting these cells to replace damaged or lost neurons in the brain. However, such cells need to be carefully characterized and studied in depth to define their relevance for cell therapy. On the one hand, effort for depicting cellular mechanisms controlling neuronal outcome must be pursued and, on the other hand, environmental factors may have critical effects. In this respect, the micronutrient folate (vitamin B9) acts as a cofactor in the metabolism of homocysteine – a sulfur-containing amino acid that has been described as a neurotoxin (Kruman et al., 2000; Obeid and Herrmann, 2006). In the one-carbon metabolism, metabolic product of folate, 5-methyltetrahydrofolate, provides a methyl group that is used to reconvert homocysteine back to methionine through the transmethylation pathway (Finkelstein, 1998). A disturbance of the one-carbon metabolism (homocysteine cycle) leads to elevated levels of homocysteine, which represents a risk factor for various pathologies, e.g. cardiovascular diseases, defects in brain development, and dementia including Alzheimer's disease (Mattson and Shea, 2003; Blaise et al., 2007). A deficiency in methyl donors and/or precursors has been reported to induce alterations of brain microvasculature, neuronal and glial apoptosis, hippocampus atrophy as well as cognitive impairments in rodents (Troen et al., 2008, Daval et al., 2009). More specifically, folate deficiency was described to inhibit the proliferation of adult hippocampal progenitor cells *in vivo* and of embryonic neuroprogenitor cells *in vitro* (Kruman et al., 2005), whereas insufficient dietary folate could make newly-generated neurons sensitive to apoptosis (Kruman et al., 2002).

By using the rat H19-7 embryonic cell line that has been conditionally immortalized with a temperature-sensitive SV40 large T antigen (Eves et al., 1992), we have recently reported molecular mechanisms sequentially involved in the outcome of hippocampal neuronal progenitors *in vitro* after induction of their differentiation. We also showed that when they were cocultured with primary hippocampal neurons, a significant number of differentiated H19-7 cells

were able to survive and to develop cell-cell communication, suggesting that H19-7 neuronal cells may constitute an interesting tool for cell therapy studies in rodents (Akchiche et al., 2009). According to the importance of folate status in neuronal homeostasis, the present study aimed to investigate the consequences of folate deficiency on the outcome of H19-7 progenitors after induction of their differentiation.

Materials and methods

Culture conditions

H19-7 cells (H19-7/IGF-IR cell line, ATCC catalog No. CRL-2526, Manassas, VA) were conditionally immortalized from embryonic day 17 rat hippocampi with a temperature sensitive SV40 large T antigen, according to the procedure described by (Eves et al., 1992).

Cells were cultured in 24-well plates (Falcon, Dutscher, Brumath, France) precoated with poly-L-lysine (15 µg/mL, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose, supplemented with 10% fetal calf serum, 50 units/mL penicillin, 50 units/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate. The cells were plated at a density of 3×10^5 cells per well (1.5×10^5 cells/cm²), and were allowed to proliferate at the permissive temperature of 33°C in humidified atmosphere consisting of 95% air / 5% CO₂. Selection was maintained with 200 µg/mL G418, a neomycin analogue. All compounds were obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Folate-deficiency was induced by using a DMEM solution lacking vitamin B9 (Invitrogen).

After 24h, the cells were washed and shifted to the non-permissive temperature (39°C) for induction of their differentiation in DMEM (with or without vitamin B9 for control and folate-deficient cells, respectively)-high glucose medium containing 1% fetal bovine 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. The experimental protocol has been summarized in Figure 1.

Vitamin and homocysteine concentrations

In order to characterize the experimental model, concentrations of folate, vitamin B12 and homocysteine were determined in both control and folate-deficient cultures as well as in the various fluids used for culturing the cells (see Table 1). At various time points, cultured cells were harvested and then lysed at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3) containing

protease inhibitors (Proteases inhibitor cocktail, Sigma Chemicals, and proteins were quantified according to Bradford (1976).

Concentrations of folate and B12 were monitored by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals, Versailles, France), according to (Chery et al., 2002). Homocysteine concentrations were measured by fluorescent polarization immunoassay (IMX system, Abbott, Fornebu, Norway) (Amouzou et al., 2004).

Activities of enzymes related to homocysteine metabolism

Homocysteine can be either remethylated to methionine by methionine synthase (MTR), with the participation of methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR, folate cycle) or metabolized by cystathionine β -synthase (CBS) through the transsulfuration pathway. MTR activity was monitored by a method adapted from (Chen et al., 1995), and CBS activity by a method adapted from Taoka et al. (1998), as previously described by (Blaise et al., 2005). MTHFR activity was measured as reported by (Kutzbach and Stokstad, 1971). Each enzymatic activity was measured on samples corresponding to 400 μ g of total proteins.

Since one main function of methionine cycle is the transmethylation of a large number of substrates, including DNA, by using S-adenosylmethionine (SAM) as a methyl donor, and because homocysteine is generated from the hydrolysis of S-adenosylhomocysteine (SAH), itself resulting from SAM demethylation (Finkelstein, 1998), the concentrations of SAM and SAH were monitored in cell extracts by high-performance liquid chromatography (HPLC). Cell pellet was washed with PBS, and cytoplasmic fraction was extracted with buffer lysis and proteins precipitated with perchloric acid solution (3%). The mixture was thoroughly mixed and sonicated for 1 min on ice. The homogenate was then centrifuged to 12,000 $g/4^{\circ}\text{C}/10$ min and the supernatant filtered through 0.45 μ m. The separation is based on the Miller method (1994). The sample was injected (20 μ L) in a HPLC system that consisted in a high pressure pump (TSP, P1000XR), an autosampler (TSP, AS100), a C18 column (lichrospher OD2, 5 μ m, 250x4 mm) maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$ at a flow rate of 0.75 mL/min (105 bars). The mobile phase contained

NaH₂PO₄ (50 mM, pH 3.2), heptane sulfonic acid (10 mM) and a gradient of acetonitrile (10-20 % from 0 to 20 minutes). The signal was measured by UV absorbance (254 nm, TSP, UV200). The amounts of SAM and SAH were calculated by using a range of standards.

Cell viability and migration

Cell viability was assessed by the measurement of cellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) using the CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay (Promega, Madison, WI) as previously described by (Akchiche et al., 2009). Additional experiments were carried out by using MTT and Trypan blue methods (Guckian et al., 1978; Denizot and Lang, 1986)

For the monitoring of cell migration according to the method reported by, (Liang et al., 2007) cells were plated at a density of 5×10^5 cells per well, in 6-well plates, and were allowed to proliferate at the permissive temperature as described above, in the presence or in the absence of folate. 24h later, a "scratch" was produced in the middle of the well, and half of the cells were removed by means of a rubber policeman. Cells were then observed and photographed everyday, and the average distance of migration was assessed by using the Cell® analysis software (Olympus, Rungis, France).

Immunohistochemical studies

Dissociated cells were cultured on glass coverslips that had been coated overnight with 15 µg/mL poly-L-lysine (Sigma-Aldrich). At various time points after induction of differentiation, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Cells were then blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin (30 min, 25°C) and incubated overnight at 4°C under agitation with one of the following antibodies: anti-NeuroD (goat polyclonal, 1/300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-NeuN (mouse monoclonal, 1/100, Chemicon International, Millipore, Guyancourt, France), anti-vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2, mouse monoclonal, 1/200, Chemicon International), anti-polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM, mouse monoclonal, 1/150, AbCys SA, Paris, France), anti-synapsin I (rabbit

polyclonal, 1/100, Calbiochem, VWR International, S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France), anti-synapsin II (rabbit polyclonal, 1/100, Abcam, Paris, France), anti-postsynaptic density-95 kDa (PSD-95, rabbit polyclonal, 1/200, Abcam), anti-synaptotagmin I (luminal domain, clone 604.2, mouse monoclonal, 1/50, Synaptic Systems, Göttingen, Germany). After a washing step, immunoreactivity was depicted by incubation in the presence of a corresponding secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1 h at 25°C (1/1 000, Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France). Coverslips were mounted with Vecta Mount AQ aqueous mounting medium (Clinisciences, Montrouge, France).

Immunofluorescence visualization and unbiased cell counts were performed with a BX51WI microscope (Olympus), and analyzed by Cell[®] analysis software. The amounts of cells exhibiting any of the selective markers were calculated as a percent of total cells after counterstaining of cell nuclei by the fluorescent dye 4,6-diamidino- 2-phenylindole (Dapi, 0.5 µg/mL in PBS, Sigma-Aldrich). In all cases, control experiments were conducted by processing cultured cells in the same way except that the primary antibody was omitted.

The presence of apoptosis was selectively assessed in cultured cells previously fixed in 4% paraformaldehyde (15 min at room temperature) by the Apostain[®] method using monoclonal antibody to single-stranded DNA (F7-26 generated from calf thymus ssDNA, AbCys SA) after DNA denaturation by heating in the presence of 50% formamide at 56°C for 30 min, as originally described by (Frankfurt and Krishan, 2001). After washing in PBS, and incubation for 30 min in PBS containing 1% bovine serum, cells were incubated at 37°C for 30 min with Apostain F7-26 monoclonal antibody (AbCys SA, 1/10). They were then rinsed with PBS and incubated for 1 h with AlexaFluor-conjugated anti-mouse IgM (1/750, Molecular Probes), and cell nuclei were counterstained by Dapi.

Mitochondrial membrane permeability was evaluated by the MitoCapture[™] assay kit (Calbiochem), as previously described (Akchiche et al., 2009). The assay is based on the

disruption of the mitochondrial inner-membrane electrochemical potential using a fluorescent cationic dye.

Western blot studies

Cultured cells were washed with ice-cold PBS. They were then solubilized in RIPA lysis buffer containing 140 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) SDS, and protease inhibitors (Roche Applied Science, Meylan, France), lysed by 3 cycles of freezing/thawing and finally centrifuged at 4°C for 30 min at 15,000 g. The protein concentration in the supernatant was determined using the BCA protein assay kit. Samples (20 µg) were mixed with an equal volume of 2x Laemmli buffer, denatured by heating the mixture for 5 min at 100°C, and then resolved by 8% or 12% SDS-PAGE. Separated proteins were transferred using a Mini Trans-Blot cell onto polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore), and the membranes were blocked for 1 h with Trisbuffered saline (pH 7.4) and 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST buffer) containing 5% (w/v) non-fat dry milk. The PVDF membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBST buffer containing 5% non-fat dry milk as follows: anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), anti-MTR (goat polyclonal, 1/500, Abcam), anti-MTHFR (mouse monoclonal, 1/3,000, Interchim, VWR International, France), anti-PP2Ac (mouse monoclonal, 1/1,000, Cell Signaling Technology), anti-cyclin E (rabbit polyclonal, 1/1000, Santa-Cruz Biotechnology), anti-Cdk-2 (goat polyclonal, 1/3,000 Santa-Cruz Biotechnology), anti-cleaved caspase-3, Asp175 (rabbit polyclonal, 1/2,000 Cell Signaling Technology), anti-cleaved caspase-9, Asp353 (rabbit polyclonal, 1/2,000 Cell Signaling Technology). After being washed with TBST buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1/5,000, Molecular Probes). Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence protocol (ECL kit, Amersham Biosciences, Orsay, France). Quantity One software, associated with the VersaDoc imaging

system (Model 1000, Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Coquette, France), was used to quantify signals. Analyses were finally performed using GAPDH as internal standard.

Real-time quantitative RT-PCR analyses of synapsin I and synapsin II

Total RNA was purified from cultured cells, using the RNeasy Lipid Tissue kit following the recommendations of Qiagen (Courtaboeuf, France) which include treatment with DNase. To assess possible contamination of the RNA samples by DNA, reactions were also performed in the absence of Omniscript RT enzyme (Qiagen). The PCR was performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and the Light Cycler instrument from Roche Diagnostics (Manheim, Germany). Specific amplifications were performed using as primers: synapsin I forward, 5'-GAGGCCCTCCACAACCAG-3'; reverse, 5'-CTGCTGTGGGA CTTGGTAGG-3'; expected product size was 147 base pairs, and synapsin II forward, 5'-CATGGGTGTTTGCTCAGATG-3'; reverse, 5'-TCTCTCGGTGATTGGGGTAG-3'; expected product size was 96 base pairs.

Quantification was performed using polymerase II (POLII) as internal standard with the following primers: forward, 5'-GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC -3'; reverse, 5'-CCGCAAAGTACCTGGACCACTCAACA-3'; expected product size is 90 pairs. Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products.

Temperature cycling for synapsin I, synapsin II and polymerase II (POLII) run proceeded as follows: 15 min at 95 °C to activate the enzyme, followed by 43 cycles at 95°C for 10 s, 57°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 of synapsin I or synapsin II mRNA and internal standard, respectively, using the RelQuant software (Roche Diagnostics, Manheim, Germany).

Statistical analyses

Data were prospectively collected and analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkeley, CA). Reported as means \pm standard deviation, raw data were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. A p -value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Folate deficiency affects the one-carbon metabolism in progenitors and is associated with elevation of cellular homocysteine levels

As expected, cellular concentrations of vitamin B9 were considerably reduced in cells cultured with DMEM lacking this compound (Figure 2a), despite the presence of B9 in foetal calf serum (Table 1). In parallel, the level of vitamin B12 was slightly elevated in 13h-differentiated neurons, and homocysteine amounts were increased by more than two-fold (Figures 2b-c). Homocysteine accumulation was amplified by the lack of CBS activity in these cells (Figure 2f). Consequently, SAM concentration and MTHR activity were significantly lower, while MTR activity was maintained (Figures 2d-g). This was preceded by a reduced expression of the two enzymes in early hours of differentiation, with no significant changes depicted at 13h (Figure 3). The data suggest that the decrease in SAM was due to the deficient synthesis of methyltetrahydrofolate, which acts as the methyl donor to homocysteine in the MTR-dependent synthesis of methionine, the precursor of SAM. Finally, the methylation index reflected by the SAM/SAH ratio dropped in folate-deficient differentiated neurons (Figure 2i).

Folate deficiency inhibits proliferation and migration of hippocampal progenitors

At the permissive temperature of 33°C, progenitor cells continually proliferated until they reached confluence. As illustrated by Figure 4a, folate deficiency reduced significantly the number of proliferating progenitors. The rate of proliferation in deficient cells was reduced by 17% starting from the third day of culture after plating. At the same stage, the capacity of

migration and colonization of the deficient neuroprogenitors was reduced by 50% and remained subsequently lower than controls (Fig 4b).

Folate deficiency and homocysteine sensitize hippocampal progenitors to differentiation-induced cell death through activation of the intrinsic mitochondrial apoptosis signaling pathway

After induction of differentiation, cell viability gradually decreased under control conditions; around 60% of cells died within 13h, and almost 90% by 48h (Figure 5a). The percentage of Apostain-positive cells – indicative of apoptosis-associated single-strand DNA – increased as a function of time (Figure 5b). Folate deficiency increased significantly the number of apoptotic cells and appeared to accelerate differentiation-associated cell death. In parallel, total catalytic Protein phosphatase 2A (PP2Ac) expression was high in H19-7 cell extracts collected at the time of induction of differentiation, and then decreased 13h later. By contrast, PP2Ac was dramatically repressed in deficient cells starting from the induction of differentiation (Figure 5c). As shown by Figures 5d-e, differentiation of hippocampal progenitors in control conditions was associated with a stable expression of cyclin E, and a decreased expression of cdk2 in 13h-differentiated neurons. Folate deficiency enhanced cyclin E expression in the first hours of differentiation without changes in cdk2 levels. Conversely, cdk2 expression was repressed at 13h in deficient cells, suggesting an arrest of the cell cycle progression, while cyclin E levels remained high.

The characterization of mitochondrial transmembrane permeability, as determined by the MitoCapture™ assay kit, revealed the progressive disruption of mitochondrial membrane potential in cells dying following induction of differentiation (Figure 6a). In folate-deficient progenitors, the loss of mitochondrial membrane potential was more pronounced at 13h and 24h of differentiation, times at which a significant increase in the number of Apostain-positive cells was recorded (Figure 5b).

Figure 6b shows that the expression of active caspase-9 and caspase-3 was highly stimulated in folate-deficient cells.

Folate deficiency affects progenitor differentiation, and impairs neuron plasticity and synaptic function

As compared to control conditions, folate deficiency did not affect the temporal expression of neuronal markers – NeuroD for immature neurons and NeuN for mature neurons (Figures 7a-c).

In folate-deficient cells, PSA-NCAM, involved in cellular migration and axonal growth, was less expressed and its presence was more restricted to cell bodies, with very few molecules in neurites. Moreover, the analysis of cell morphology during differentiation revealed that folate deficiency was associated with a lower appearance of typical neuronal morphology (Figure 7d).

Further phenotypic characterization of cells by using specific antibodies allowed to show that fully differentiated neurons were glutamatergic both in control and in deficiency conditions, as shown by the presence of VGLUT2 (Figure 8a). However, in folate-deficient cells, the localization of VGLUT2 expression was restricted mainly to the cell bodies and was dramatically lower in neuritis as compared to controls. The same observation was made concerning the localization of synapsin I and synapsin II, two proteins implicated in the regulation of synaptic vesicles for neurotransmitter release (Figure 8a). In control cells, but not in deficient ones, synapsin I was largely present in axons and dendrites, and synapsin II in axons. Moreover, deficiency was associated with reduced amounts of synapsin I mRNA after 13h of differentiation (Figure 8b).

Impaired differentiation of deficient progenitors was further suggested by a significant reduction of the total number of cell processes and of the length of dendrites, without patent modification of axons (Figure 9a).

Functional capacities of differentiated hippocampal neurons were reflected by the expression of PSD-95 normally present at the postsynaptic side of excitatory synapses and which plays a key role in the regulation of glutamate receptor targeting and trafficking (Li and Sheng, 2003;

Petralia et al., 2005) (Figure 9b) and by the labeling of the luminal part of synaptotagmin I, a Ca^{2+} -binding protein enriched in synaptic vesicles and that is known to be essential for synaptic vesicles exocytosis and endocytosis in neurons (Sudhof et al., 2004). Since PSD-95 clustering could be directly linked to neuronal activity, the index of PSD 95 clustering density was additionally assessed in cultured cells. Whereas, a high index was found in control cells at 13h after induction of differentiation, clustering was very sparse in folate-deficient cells (data not shown), further suggesting impaired synaptic activities in these latter cells.

Discussion

The fate of neuroprogenitors may be influenced by various factors, including their microenvironment, growth factors, neurotransmitters and nutrients. In the present study, we demonstrate that folate deficiency that induces disturbance of the one-carbon metabolism along with homocysteine accumulation, can dramatically affect neuroprogenitor proliferation, differentiation and plasticity. This suggests that the folate-related impairment of the one-carbon metabolism may alter the maturation of hippocampal neurons and jeopardize the promising beneficial effect of grafting neural progenitors. These effects may be related to the resulting increased concentration of homocysteine, the decreased concentration of SAM or both. Indeed, homocysteine is known to exert neurotoxic effects. In addition, it is the end-product of the hydrolysis of SAH by a reversible reaction catalyzed by SAH hydrolase. Consequently, the increase of homocysteine leads to enhanced levels of SAH. This participates to the decrease of the SAM/SAH ratio, in combination with the impaired synthesis of SAM. This ratio is determinant in the transmethylation reactions involved in epigenetic mechanisms and in the synthesis of many substrates. In this respect, SAM is the substrate of transmethylases and SAH is the most potent physiological inhibitor of these enzymes. Beside these metabolic effects, folate deficiency was associated with a paradoxical increase of vitamin B12 that has been already

noticed in other folate deficient models (Blaise et al., 2007). This increase may correspond to an adaptive process, which would deserve further characterization.

Other studies have previously shown that folate promotes proliferation and reduces differentiation of progenitors (Kruman et al., 2005; Zhang et al., 2008). These findings are consistent with the well-known role of folate as a nutrient essential for the development of the central nervous system (van der Put et al., 2001; Ellinson et al., 2004). Folate deficiency may also contribute to various neurological disorders such as depression and dementia (Clarke, 2006; (Mattson and Shea, 2003). A part of the beneficial neurological effects of folate would involve the stimulation of neural stem cells and progenitor proliferation.

Folate is essential for the one-carbon metabolism involving remethylation of homocysteine to generate methionine, the precursor of SAM. The latter that serves as the primary methyl donor for methylation of DNA and other cellular components (Forges et al., 2007). Since DNA methylation enables proper gene expression, it is likely that folate acts through DNA methylation to regulate the expression of genes implicated in neuroprogenitor proliferation and differentiation. Notch signaling is known to control proliferation and differentiation of neural stem cells and progenitors. It has been reported that folate would affect cell proliferation and differentiation by activating Notch signaling (Zhang et al., 2008).

The folate-related impairment of homocysteine remethylation and the subsequent elevation of homocysteine result in vitro in apoptosis of neuroprogenitors (Kruman et al., 2005). Therefore, impairment of the one-carbon metabolism may be critical in the death of differentiated neurons and in the repression of neurogenesis. This suggests specific mechanisms by which folate deficiency and homocysteine can adversely affect the brain functions and plasticity.

Folate deficiency and homocysteine were reported to promote apoptosis and to sensitize hippocampal neurons to excitotoxicity, oxidative stress and amyloid toxicity without activation of the mitochondrial pathway (Kruman et al., 2000; Kruman et al., 2002). In our study, folate deficiency sensitizes neuroprogenitors and promotes cell death associated with differentiation

through the activation of the mitochondrial apoptosis pathway. Indeed, we report an increase in the loss of mitochondrial transmembrane potential and activation of caspases 9 and 3. Cyclin E overexpression has been associated with Notch pathway to coordinate cell fate (Simon et al., 2009). In folate-deficient cells, we observed an increase in cyclin E expression as soon as the first hours of differentiation. Homocysteine was reported to render neurons more vulnerable to excitotoxicity by inducing DNA damage (Kruman et al., 2000). Ectopic expression of cyclin E, the most important G1 cyclin after terminal mitosis induces re-entry into the S-phase and, in the context of impairment of the one-carbon metabolism, abnormal DNA synthesis. Re-entry in the cell cycle of post-mitotic neurons is a critical element of the response to DNA damage, and, if the cells are not able to correctly repair DNA, this process is followed by neuronal death (Kruman et al., 2004 ; Akchiche et al., 2009).

We have previously shown that activation of Erk1/2 pathway in response to induction of differentiation promotes mitochondrial apoptosis of H19-7 progenitors, whereas Akt was involved in the survival of remaining cells (Akchiche et al., 2009). Protein phosphatase 2A (PP2A), a major cellular serine threonine phosphatase, can either induce or prevent apoptosis, via Akt, depending on what other signals the cell is receiving (Silverstein et al., 2002 ; Andrabi et al., 2007). PP2A has been shown to be activated by methylation of its catalytic subunit, and its activation occurs in response to DNA damage. In folate deficiency conditions, PP2Ac expression decreased after induction of differentiation. PP2A was shown to regulate the activities of G1 cyclin-dependent kinases (Yan and Mumby, 1999) and, in our study, could be directly linked to cyclin E overexpression and G1-S phase transition. Thus, the decrease of PP2A in folate deficient H19-7 cells could participate to the sensitization of progenitors to differentiation-induced death.

Synaptic transmission and plasticity are very sensitive to environmental factors and, accordingly, synaptic dysfunction and degeneration occur early in the pathogenesis of various neurological diseases (Mattson et al., 2000). Folate can enhance excitability of hippocampal circuits by

presynaptic disinhibition of GABAergic neurons (Otis et al, 1985), whereas folate and SAM modulate synaptic activity of cortical neurons in vitro (Serra, 2008). But it is not known how folate and homocysteine modify synaptic plasticity and function. In our study, we showed that folate deficiency dramatically impaired progenitor differentiation, plasticity and synaptic activity. As a consequence, dendrites processes were found to be particularly affected. Indeed, dendritic spines are the primary recipients of excitatory input in the central nervous system, and maturation of functional post-synaptic compartments involves specialized machinery for clusters in dendrites which then will form part of functional synapses (Bourne and Harris, 2008). The level of PSD-95 clustering could directly be linked to neuronal activity and synaptic integrity in hippocampal neurons (Farías et al., 2009), and its level was significantly reduced in folate-deficient differentiating progenitors. The same observation was made for the luminal domain of synaptotagmin I which has been shown to directly label recycling synapses in neuronal cultures (Kraszewski et al., 1995).

The differentiation of neurons involves marked reorganization of the cytoskeleton involving actin filaments which regulate growth cone behaviors, and microtubules, which regulate the elongation and stabilization of axons and dendrites (Otis et al., 1985; Mattson, 1999). Synaptic cargo trafficking is essential for synapse formation, function and plasticity (Schlager and Hoogenraad, 2009). In order to transport synaptic cargo, such as synaptic vesicle precursors and signaling proteins, to their site of action, neurons make use of molecular motor proteins. These motors operate on the microtubule and actin cytoskeleton at both pre- and post-synaptic sites. Thus, changing microtubules and actin dynamics is sufficient to alter axon and dendrite specification and development (Conde and Caceres, 2009). In the present study, impairment of dendritic processes in folate-deficient neurons was associated with a reduced synapsin I expression. Moreover, in these cells, synapsin I, synapsin II and VGLUT2 were mainly localized in cell bodies, with much less expression in neurites, suggesting an alteration in vesicular transport. Indeed, decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters, VGLUT1,

VGLUT2 and VGAT (vesicular GABA transporter) were reported in synapsin I and II-deficient mice (Bogen et al., 2006), and development of glutamatergic synaptic vesicles as well as presynaptic plasticity have been shown to be synapsin-dependent (Bogen et al., 2009; Coleman and Bykhovskaia, 2009). Therefore, we hypothesize that folate deficiency can impair synapse function and plasticity through reduced expression of synapsin I and changes in microtubules and actin dynamics which alter neurite development and vesicular transport. In good agreement, low folate intake was related to failure of post-translational methylations of the cytoskeleton required for neural tissue differentiation (Bjorklund and Gordon, 2006), and it was reported that pharmacological disruption of the actin cytoskeleton increased receptor-mediated folate uptake in cultured cells (Lewis et al, 1998). Moreover, homocysteine would induce Alzheimer's disease-like hyperphosphorylation of tau, a microtubule-associated protein, through inactivation of PP2A in the rat hippocampus (Zhang et al., 2008).

Conclusion

The present study reports for the first time that folate deficiency can sensitize neuroprogenitors to differentiation-associated death via activation of mitochondrial apoptosis pathway. In addition, folate shortage appeared to impair neuronal differentiation with abnormal neurite outgrowth, finally leading to synaptic dysfunctions.

Cell therapy replacement, and more precisely neuronal grafting, is presently used in patients with neurodegenerative disorders like Parkinson's and Alzheimer's diseases (Waldau and Shetty, 2008). Recent data indicate, however, that grafted cells become progressively functionally damaged, suggesting transmission of the pathology from host to grafted cells (Li et al, 2008). Importantly, these neurodegenerative diseases have been associated with low folate levels and hyperhomocysteinemia. In accordance with these observations, our data suggest that, in the context of neuronal grafting, dietary folate should be taken into account, and eventually corrected to improve cell survival and plasticity.

References

- Akchiche N, Bossenmeyer-Pourie C, Pourie G, Koziel V, Nedelec E, Gueant JL, Daval JL (2009) Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: Signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus*.
- Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL (2004) High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 79:619-624.
- Andrabi S, Gjoerup OV, Kean JA, Roberts TM, 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.
- Bjorklund NK, 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, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL, Daval JL (2005) Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* 57:777-782.
- Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170:667-679.
- Bourne JN, Harris KM (2008) Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 31:47-67.
- Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R (1995) Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 270:19246-19249.
- Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmoutaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL (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.
- Coleman WL, Bykhovskaia M (2009) Rab3a-mediated vesicle recruitment regulates short-term plasticity at the mouse diaphragm synapse. *Mol Cell Neurosci* 41:286-296.
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- Ellinson M, Thomas J, 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; quiz 385-377.
- Eves EM, Tucker MS, Roback JD, Downen M, Rosner MR, Wainer BH (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.
- Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:S40-44.

- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13:225-238.
- Frankfurt OS, Krishan A (2001) Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 49:369-378.
- Guckian JC, Christensen WD, Fine DP (1978) Evidence for quantitative variability of bacterial opsonic requirements. *Infect Immun* 19:822-826.
- Kraszewski K, Mundigl O, Daniell L, Verderio C, Matteoli M, De Camilli P (1995) Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the luminal domain of synaptotagmin. *J Neurosci* 15:4328-4342.
- Kruman, II, Mouton PR, Emokpae R, Jr., Cutler RG, Mattson MP (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* 16:1055-1059.
- Kruman, II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20:6920-6926.
- Kruman, II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R, Jr., Gorospe M, Mattson MP (2004) Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41:549-561.
- Kruman, II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1752-1762.
- Kutzbach C, Stokstad EL (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 250:459-477.
- Li Z, Sheng M (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:833-841.
- Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2:329-333.
- Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26:137-146.
- Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J (1994) Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem J* 298 (Pt 2):415-419.
- Obeid R, Herrmann W (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 580:2994-3005.
- Petralia RS, Sans N, Wang YX, Wenthold RJ (2005) Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 29:436-452.
- Schlager MA, Hoogenraad CC (2009) Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol Brain* 2:25.
- Serra E (2008) Duloxetine and pregabalin: safe and effective for the long-term treatment of fibromyalgia? *Nat Clin Pract Neurol* 4:594-595.
- Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC (2002) Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4221-4226.

- Simon F, Fichelson P, Gho M, Audibert A (2009) Notch and Prospero repress proliferation following cyclin E overexpression in the *Drosophila* bristle lineage. *PLoS Genet* 5:e1000594.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Waldau B, Shetty AK (2008) Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain. *Cell Mol Life Sci* 65:2372-2384.
- Zhang XM, Zhu SW, Duan RS, Mohammed AH, Winblad B, Zhu J (2008) Gender differences in susceptibility to kainic acid-induced neurodegeneration in aged C57BL/6 mice. *Neurotoxicology* 29:406-412.

Table 1: Concentrations of vitamin B9, vitamin B12 and homocysteine in the various fluids used for culturing H19-7 neuronal progenitors.

	Vitamin B9 (nmol/L)	Vitamin B12 (pmol/L)	Homocysteine (μ mol/L)
Control DMEM	10 000	n.d.	n.d.
B9-Deficient DMEM	n.d. ^{**}	n.d.	n.d.
Foetal calf serum	30.0 \pm 6.4	680.0 \pm 1.4	4.25 \pm 0.03
Proliferation medium (Control)	10 000	40.0 \pm 5.6	0.43 \pm 0.02
Proliferation medium (B9-Deficient)	2.5 \pm 0.2 ^{**}	40.0 \pm 0.8	0.38 \pm 0.01
Differentiation medium (Control)	11 000	n.d.	0.01 \pm 0.01
Differentiation medium (B9-Deficient)	0.25 \pm 0.01 ^{**}	n.d.	0.03 \pm 0.02

n.d. = not detectable. All measurements were done three times. Statistically significant differences between control and B9-deficient conditions: ^{**} $p < 0.01$

Legends to Figures:

Figure 1: Summary of the experimental procedure (adapted from Eves et al., 1992).

Figure 2: Analysis of the main determinants of homocysteine metabolism in 13h-differentiated cells.

MTHFR: methylene-tetrahydrofolate reductase; MTR: methionine synthase; CBS: cystathionine β -synthase; SAM: S-adenosylmethionine; SAH: S-adenosylhomocysteine. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$. Data are reported as means \pm S.D. and all values were obtained from three separate experiments.

Figure3: Western-blot analysis of the expression of enzymes related to homocysteine metabolism.

Panel a: temporal profile of MTHFR expression during differentiation in control and folate-deficient cells.

Panel b: temporal profile of MTR expression during differentiation in control and folate-deficient cells. Whereas one representative blot is presented for illustration, densitometric data were obtained from three separate experiments and are reported as means \pm S.D. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$; statistically significant differences from 0h time point (n=3): $^{\circ}p \leq 0.05$.

Figure 4: Decreased proliferation and migration in folate-deficient neuroprogenitors.

Panel a: Temporal changes in cell proliferation reflected by the number of cells. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$; statistically significant differences in function of the proliferation time $^{\circ}p \leq 0.01$ (n=9).

Panel 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.

The average distance of migration was assessed by using Cell analysis software (Olympus, France). Results were obtained from three independent experiments, with each assay comprising a minimum of 10 visual fields at 40x magnification. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$. All data are reported as means \pm S.D.

Figure 5: Increased differentiation-induced apoptosis by folate deficiency through PP2A repression and cyclin E elevation.

Panel a: Temporal changes in cell viability. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$; statistically significant differences from 0h time point: ° $p \leq 0.01$ (n=9).

Panel b: Percent of apoptotic cells reflected by Apostain immunostaining. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$; statistically significant differences from 0h time point: °° $p \leq 0.01$ (n=9).

Panels c-e: Western-Blot analyses of PP2A, cyclin E and Cdk2, respectively, at the time of induction of differentiation (0h) and then 6h and 13h later. Whereas one representative blot is presented for illustration, densitometric data were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: ** $p \leq 0.01$; statistically significant differences from 0h time point: ° $p \leq 0.05$ and °° $p \leq 0.01$. All data are reported as means \pm S.D.

Figure 6: Sensitization of progenitors by folate deficiency to differentiation-associated apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway.

Panel a: changes in the mitochondrial membrane potential, as depicted by the MitoCapture detection kit (Calbiochem). Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$; statistically significant differences from 0h time point: °° $p \leq 0.01$. Panel b: western-blot analysis of active caspase-3 and caspase-9 expression. Densitometric data were

obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$; statistically significant differences from 0h time point: $^{\circ}p \leq 0.05$. All data are reported as means \pm S.D.

Figure 7: Characterization of H19-7 neuronal cells after induction of differentiation.

Panel a: Immunohistochemical labeling of various neuronal markers at 13h after induction of differentiation: NeuroD for immature neurons, NeuN for mature neurons, and PSA-NCAM, a marker for neuronal migration which is transiently present in immature migratory neural cells.

Panel b-c: Temporal changes in the expression patterns of neuronal markers NeuroD (b) and NeuN (c)

Panel d: Evolution in the achievement of specific neuronal morphology at 6h and 13h after induction of differentiation.

Results were obtained from three independent experiments, with each assay comprising a minimum of 10 visual fields at 40x magnification. All data are reported as means \pm S.D.

Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: ** $p \leq 0.01$; statistically significant differences from 0h time point: $^{\circ}p \leq 0.05$ and $^{\circ\circ}p \leq 0.01$.

Figure 8: Profile of synaptic marker expression after induction of differentiation.

Panel a: Immunohistochemical labeling of the synaptic markers, synapsin I and II and of the vesicular glutamate transporter VGLUT2 at 13h after induction of differentiation.

Panel b: Temporal changes in synapsin I and II mRNA levels after induction of differentiation.

All data are reported as means \pm S.D. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$; statistically significant differences from 0h time point: $^{\circ}p \leq 0.05$ and $^{\circ\circ}p \leq 0.01$ (n=9).

Figure 9: Assessment of neuronal plasticity.

Panel a: Number of neurites present at 6h and 13h after induction of differentiation, and neurite length measured at 13h after induction of differentiation. The length of axons and dendrites was assessed by using Cell analysis software (Olympus, France). Results were obtained from three independent experiments, with each assay comprising a minimum of 10 visual fields at 40x magnification. All data are reported as means \pm S.D. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$.

Panel b: Immunohistochemical labeling of markers of synaptic plasticity and activity, PSD-95 and synaptotagmin I (luminal domain), at 13h after differentiation. Illustration of the decrease of the apparent PSD95 clustering is available as supplementary data.

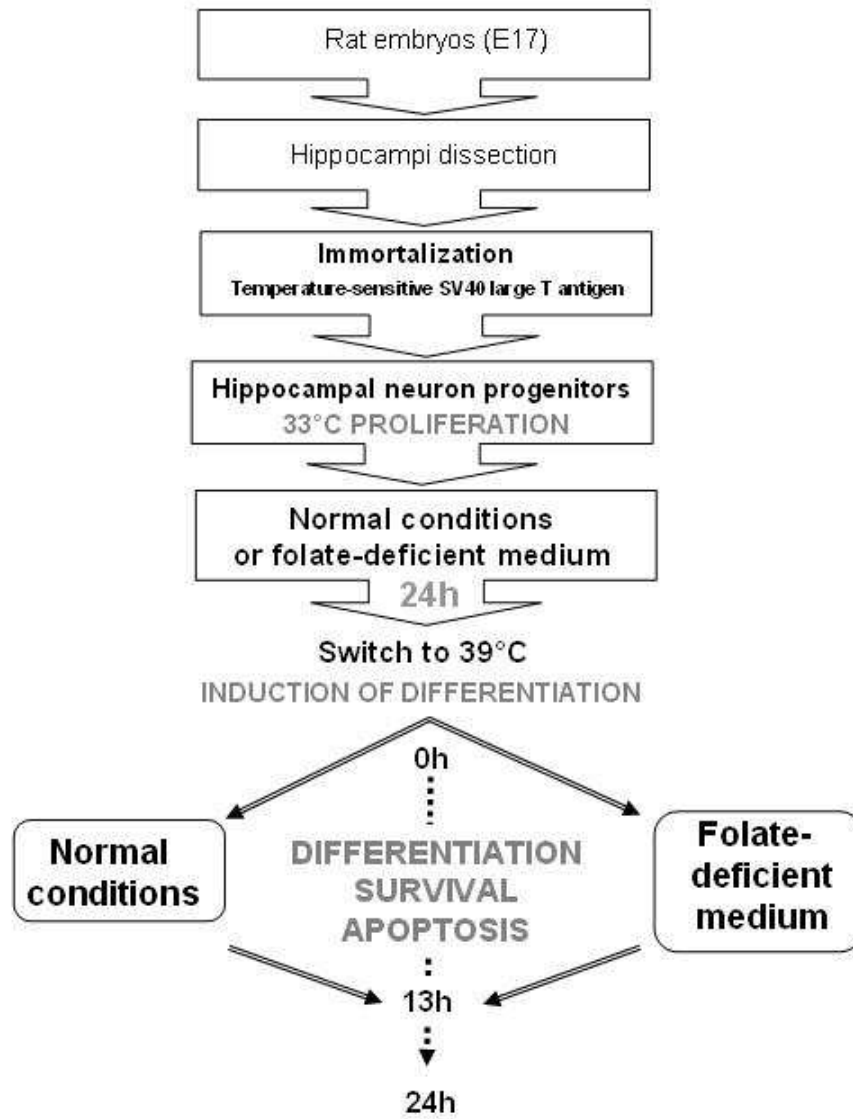


Figure 1: Summary of the experimental procedure (adapted from Eves et al., 1992)

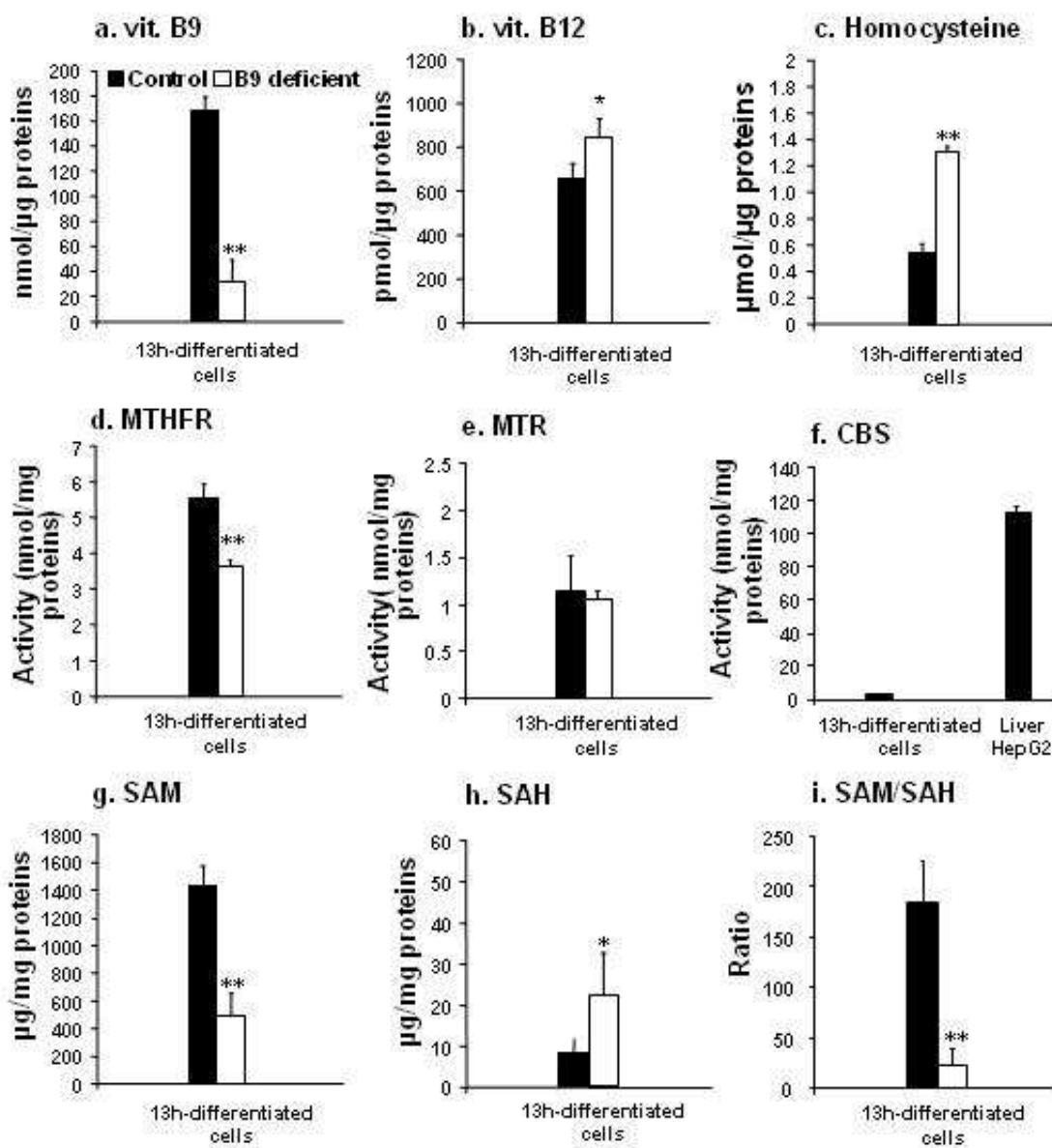


Figure 2: Analysis of the main determinants of homocysteine metabolism in 13h-differentiated cells

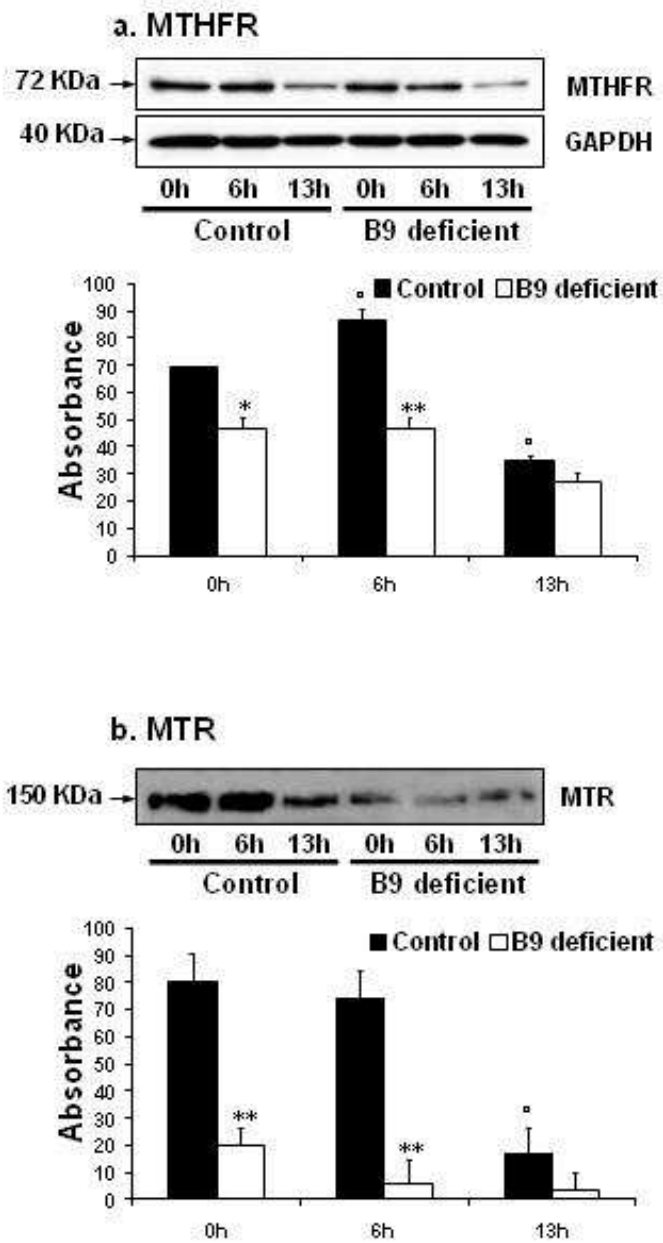


Figure3: Western-blot analysis of the expression of enzymes related to homocysteine metabolism.

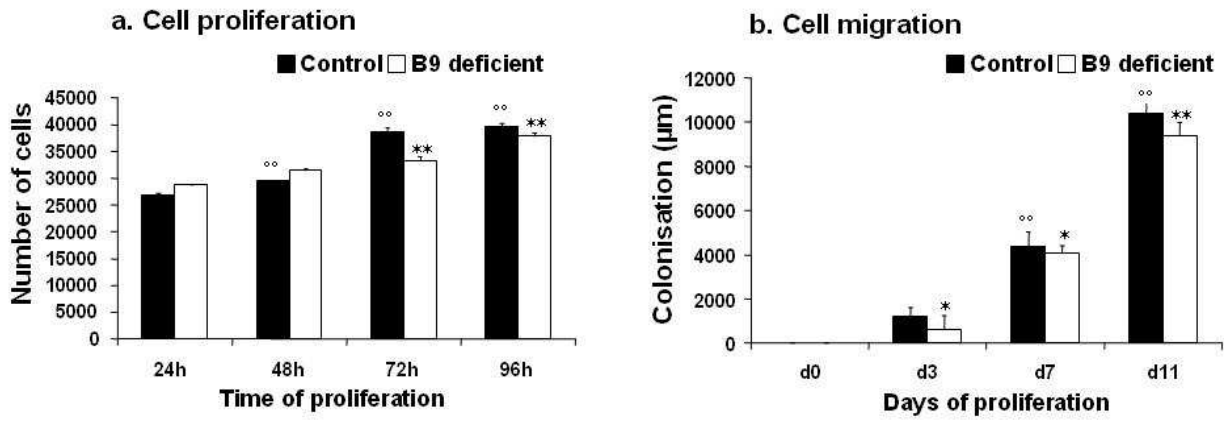


Figure 4: Decreased proliferation and migration in folate-deficient neuroprogenitors

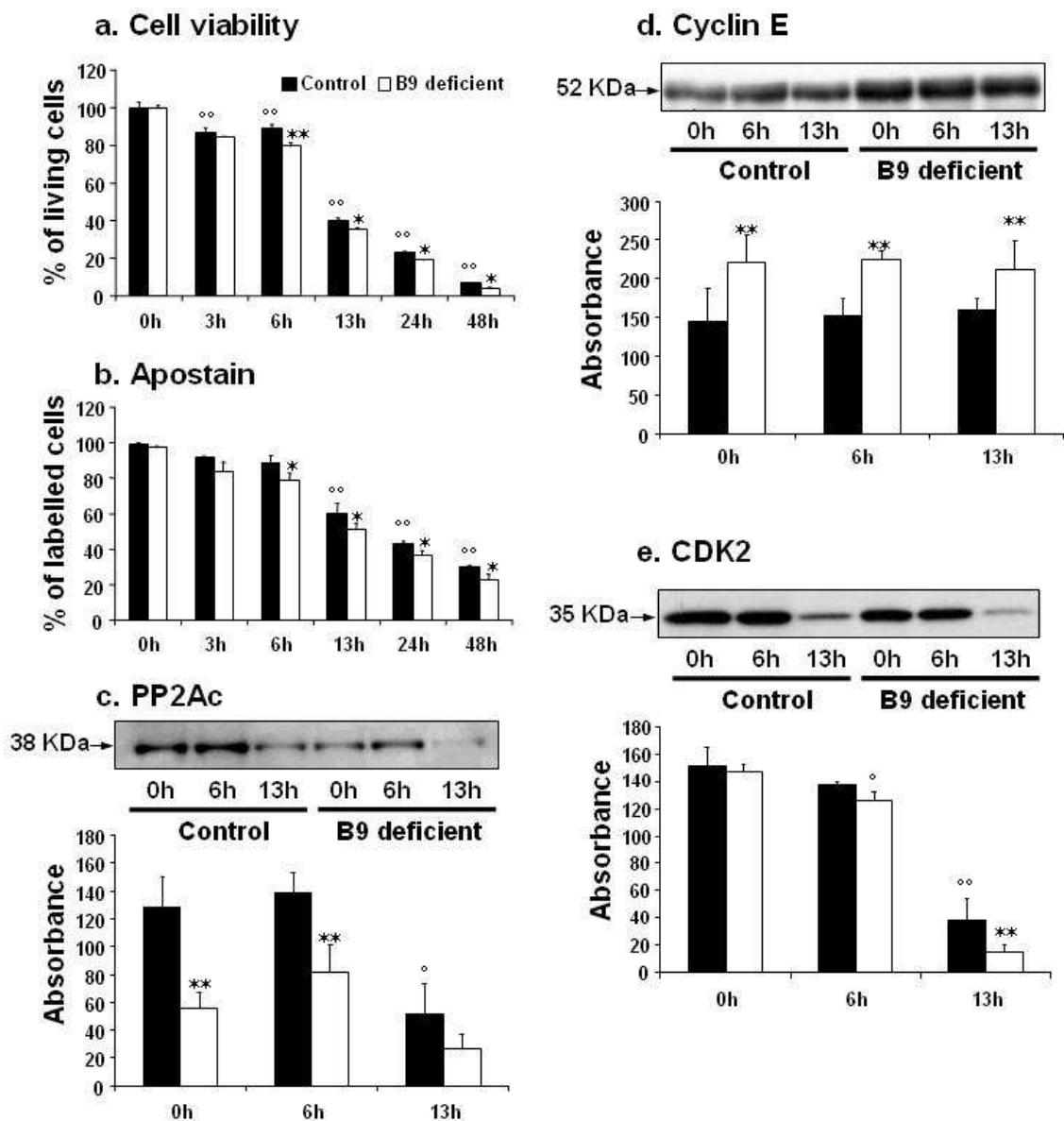


Figure 5: Increased differentiation-induced apoptosis by folate deficiency through PP2A repression and cyclin E elevation.

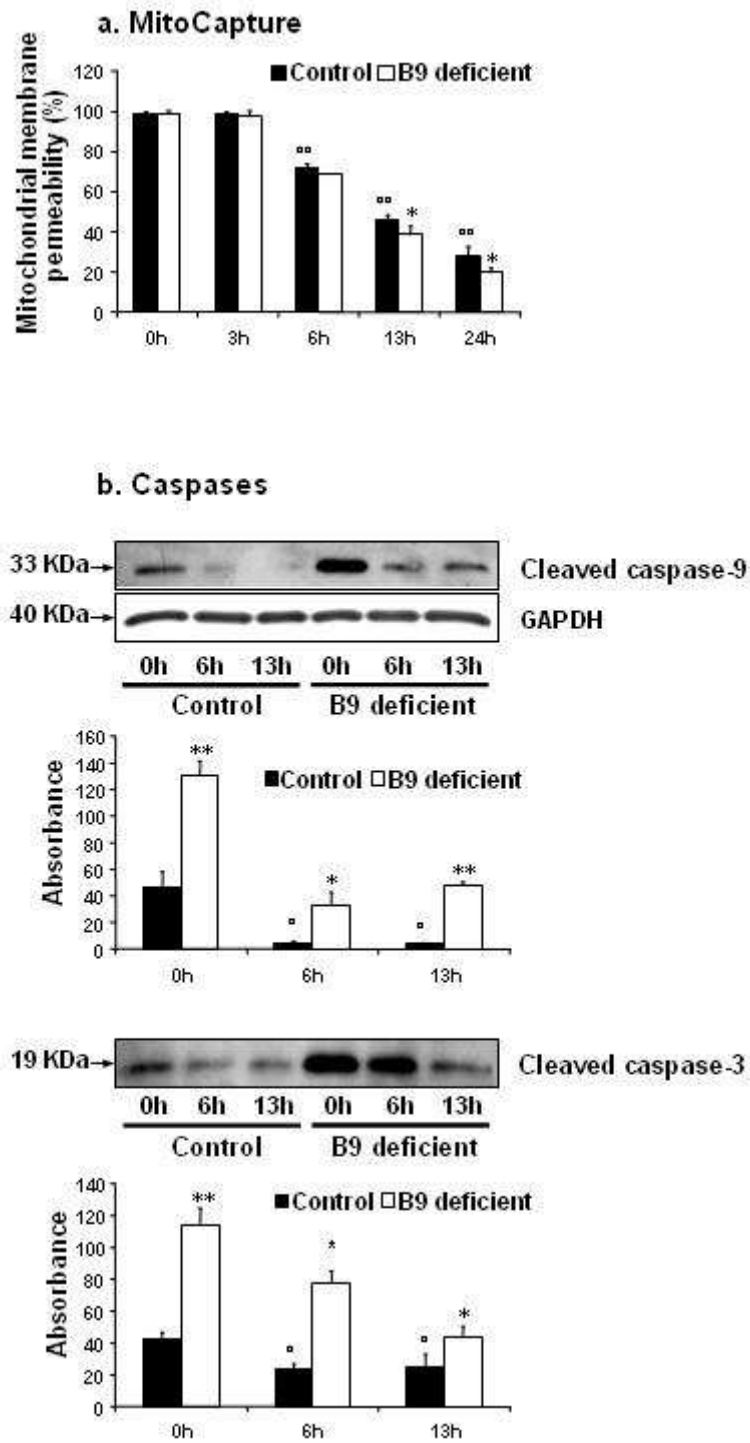


Figure 6: Sensitization of progenitors by folate deficiency to differentiation-associated apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway

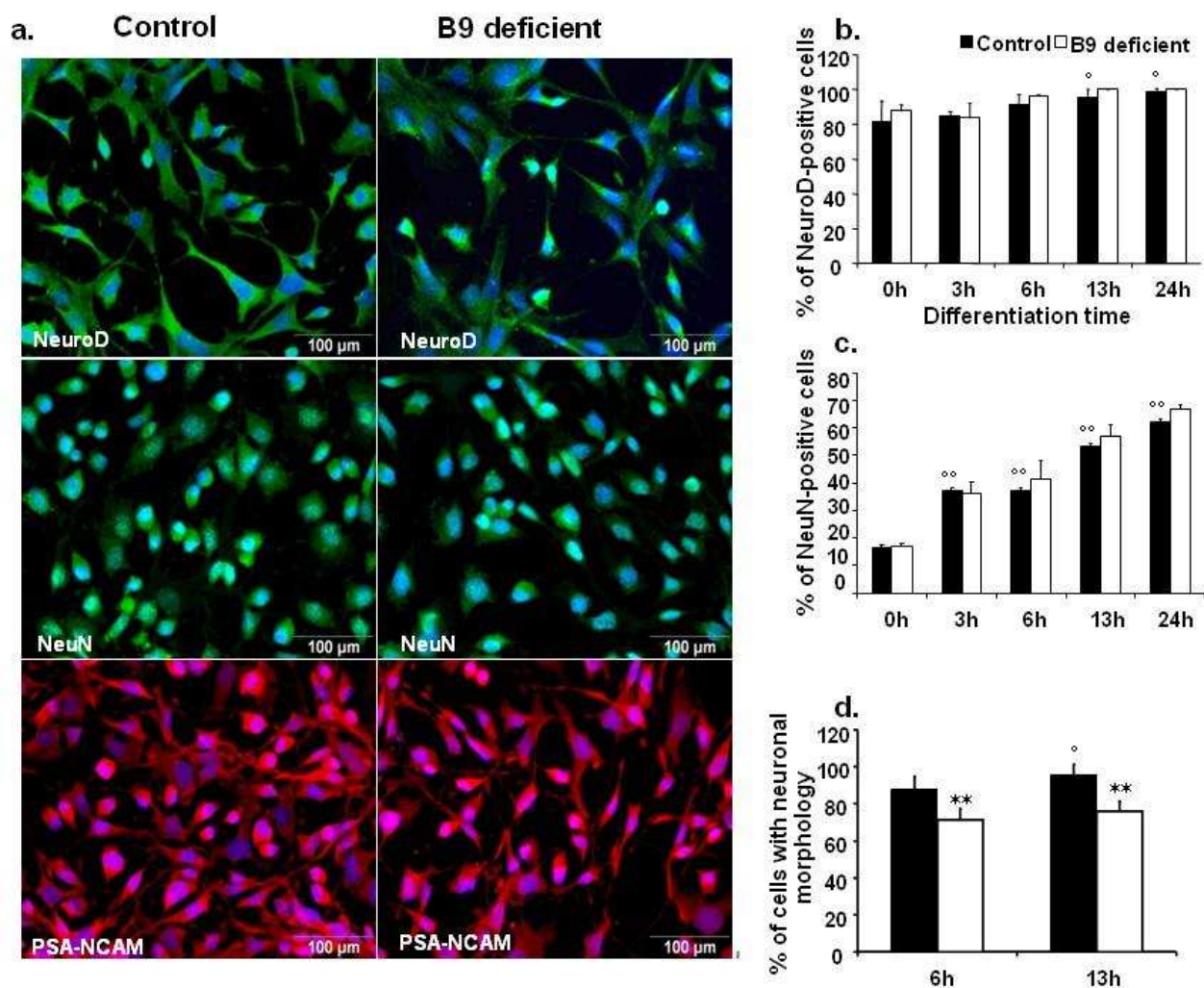


Figure 7: Characterization of H19-7 neuronal cells after induction of differentiation

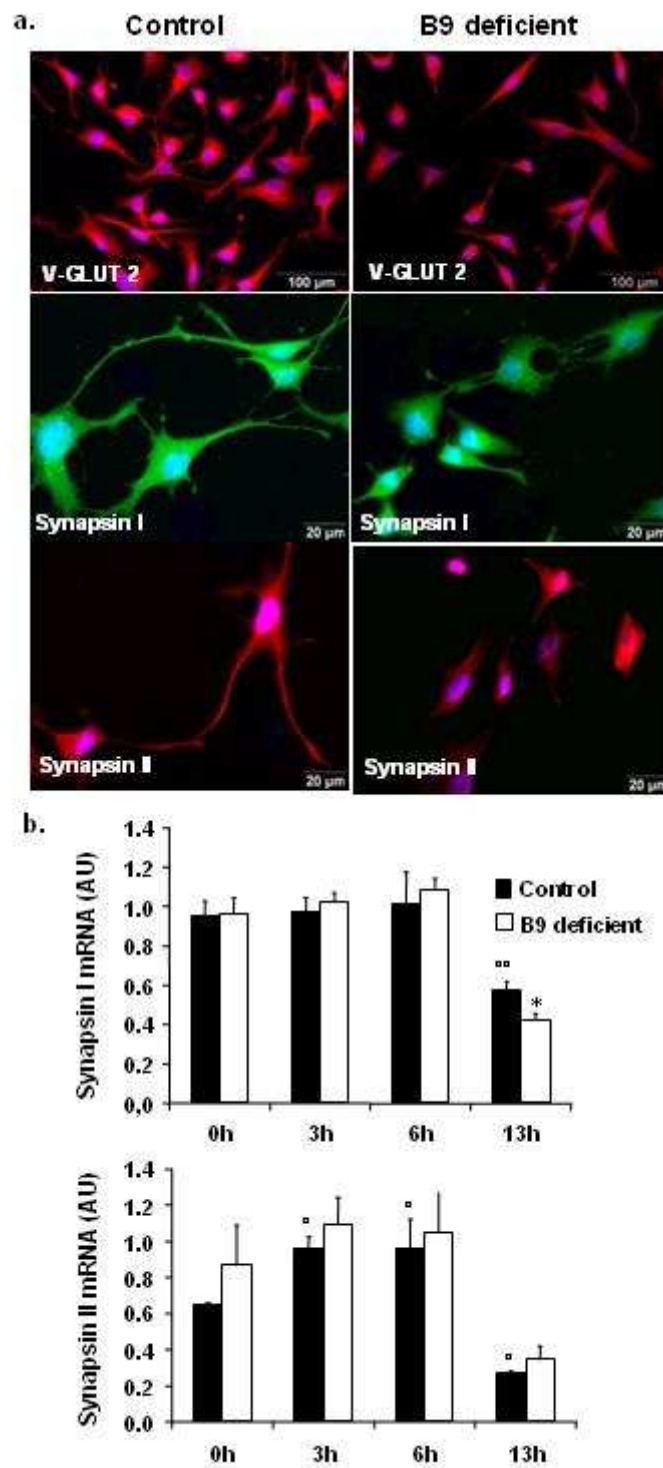


Figure 8: Profile of synaptic marker expression after induction of differentiation

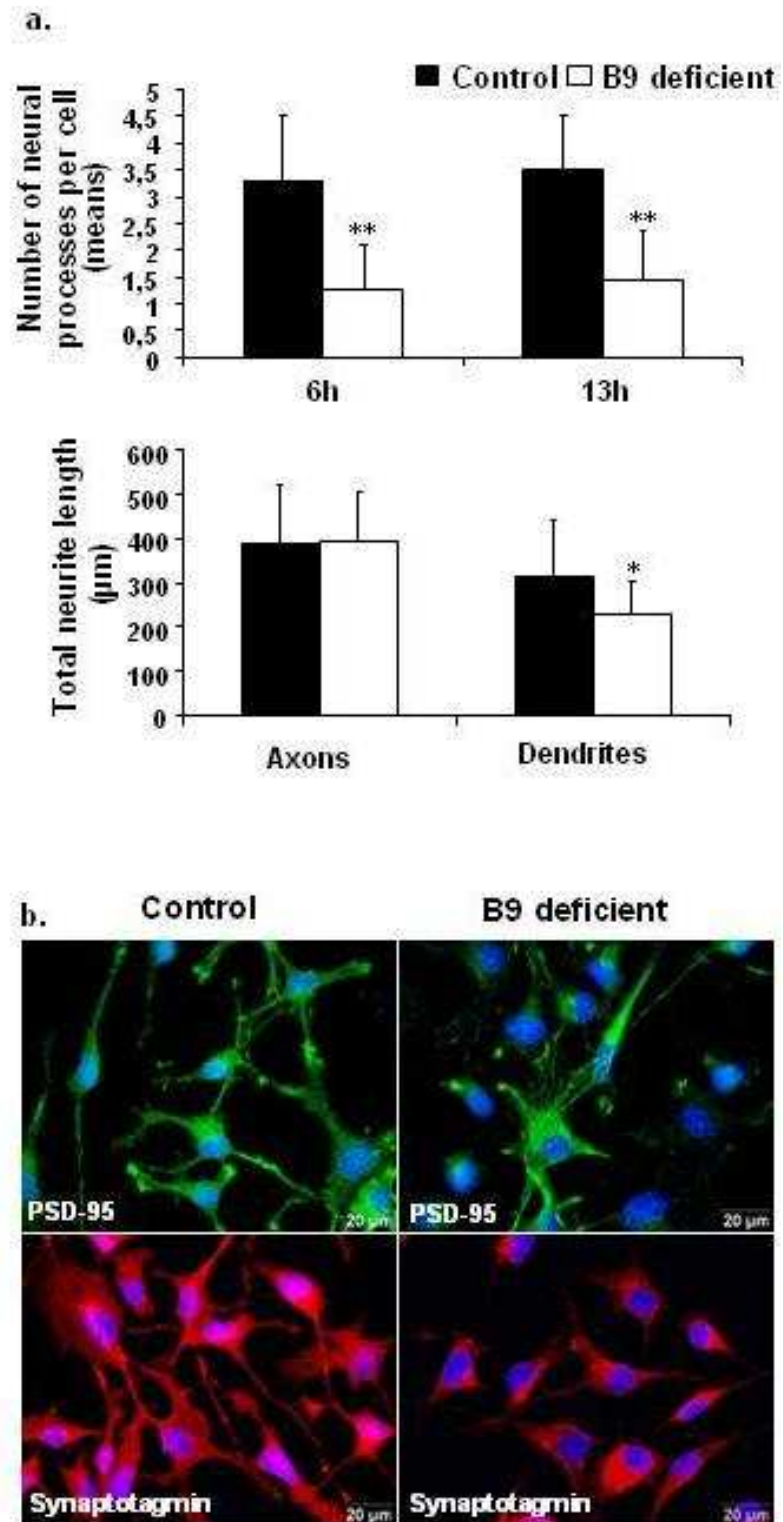


Figure 9: Assessment of neuronal plasticity

III. Synthèse de la publication

La privation en folate a été obtenue par l'utilisation de milieux dépourvus en vitamine B9. Ce traitement s'est traduit par une chute de la concentration intracellulaire en folates. Comme cela a été décrit précédemment dans le cerveau *in vivo* (Blaise et al., 2007), ceci a eu pour conséquence des perturbations des enzymes du métabolisme des monocarbone (MTHFR et MTR), aboutissant à une forte élévation de la teneur en homocystéine, laquelle se trouve amplifiée par l'absence d'activité CBS dans les progéniteurs (voie de transsulfuration qui préside au catabolisme de l'homocystéine). On observe également une chute du ratio SAM/SAH, c'est-à-dire de l'index de méthylation, dans les cellules différenciées.

Non seulement la carence en B9 affecte la prolifération des progéniteurs avant induction de la différenciation, mais elle ralentit leur capacité migratoire. Au cours de la période de différenciation, la survie des cellules est moindre dans les cellules carencées. En fait, la carence apparaît sensibiliser les neurones à la mort cellulaire associée à la différenciation : l'apoptose se trouve amplifiée, ce qui est confirmé par l'activation des caspases 9 et 3. Ce processus ferait intervenir une répression de 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. En relation avec PP2A, il a également été rapporté récemment que l'homocystéine exerce des effets toxiques sur les neurones par l'hyperphosphorylation des protéines tau via l'inactivation de PP2A (Zhang et al., 2008).

De manière générale, la carence en folates ne modifie pas le profil d'expression des marqueurs neuronaux. Toutefois, différents arguments suggèrent que la différenciation des cellules est fortement perturbée. En effet, le pourcentage de cellules présentant des prolongements cellulaires ainsi que la longueur des dendrites sont significativement réduits dans les cellules déficientes en folate. De même, la PSA-NCAM – qui est non seulement impliquée dans la migration mais régule la croissance axonale – est moins exprimée et sa localisation est davantage restreinte aux corps cellulaires. Ce type de localisation ectopique se retrouve également pour le marqueur glutamatergique VGLUT2 et les synapsines I et II. Enfin, une altération de la plasticité et de l'activité synaptique est fortement suggérée par l'expression de la synaptotagmine I et du PSD-95 pour lequel la formation de clusters, un index de l'activité synaptique, est réduite.

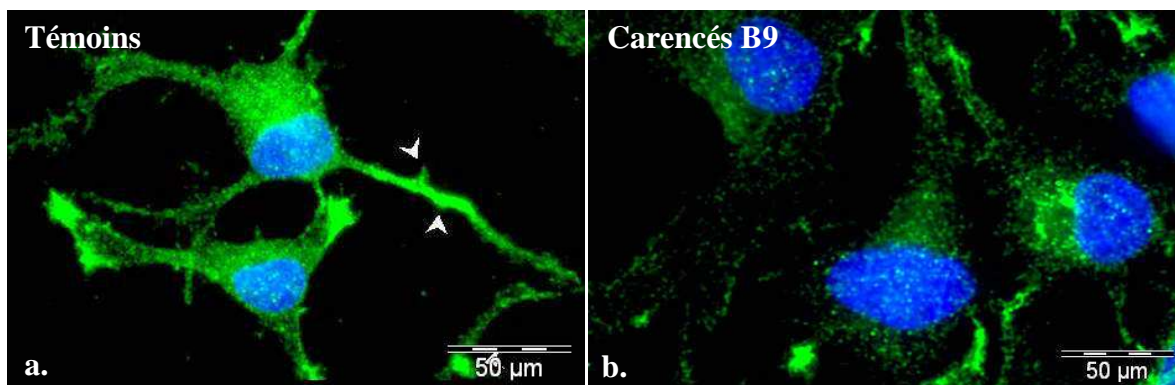


Figure 1 : Mise en évidence de la réduction du « clustering » du PSD-95 postsynaptique (en vert) dans les neurones carencés en vitamine B9 par comparaison aux témoins. Les noyaux (en bleu) sont contre-marqués au Dapi.

En conclusion, notre étude a révélé pour la première fois qu'une déficience en folate sensibilise les neuroprogéniteurs à la mort cellulaire associée à la différenciation, via la voie intrinsèque mitochondriale. De plus, la carence en folate perturbe la différenciation cellulaire et engendre des dysfonctionnements synaptiques. Selon différentes études, les folates agiraient sur la prolifération et la différenciation des neurones par une activation de la voie Notch (Zhang et al., 2008), aussi serait-il intéressant d'étudier cette voie de signalisation dans notre modèle.

Enfin, ces observations concernant l'impact d'un déficit en folate sur le devenir des progéniteurs neuronaux nous incitent à penser que le statut nutritionnel en folates est un élément à prendre en considération dans toute tentative de thérapie réparatrice faisant appel à ce type de cellules.

3^{ème} PARTIE : Effets d'une carence en vitamine B12 obtenue par transfection stable de la protéine chimère Transcobalamine II-Oléosine sur la prolifération et la différenciation des cellules de neuroblastome NIE-115

I. Objectifs de l'étude

La vitamine B12 (Cobalamine, Cbl) est un micronutriment indispensable et son déficit conduit, chez l'homme, à une anémie pernicieuse et affecte le développement et la fonction cérébrale. Les effets vont d'un déclin cognitif jusqu'à des neurodégénérescences sévères, sans que l'on en connaisse les mécanismes. Afin de préciser les bases moléculaires des conséquences d'une déficience en vitamine B12, un projet a été entrepris à l'aide d'un modèle original développé au Laboratoire et produisant une déplétion sévère en vitamine B12 sur une lignée cellulaire issue de neuroblastome murin.

Un plasmide permettant l'expression d'une protéine chimère composée du transporteur plasmatique de la vitamine B12, la transcobalamine II (TCII), qui correspond à une des protéines les plus affines pour la vitamine B12, a été construit. Cependant, ce transporteur plasmatique est une protéine sécrétée reconnue par tous les types cellulaires pour délivrer la vitamine B12. Pour permettre la séquestration de la B12, il était nécessaire d'ancrer cette protéine dans la membrane cellulaire. La protéine d'ancrage choisie est l'oléosine, une protéine d'origine végétale. Cette association engendre l'expression de la protéine chimère sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (Figure 1). Le choix de ce modèle repose sur des travaux antérieurs du Laboratoire sur la transcobalamine et sur le clonage du gène de l'oléosine de l'arachide. Plusieurs constructions chimériques ont été réalisées (Figure 2).

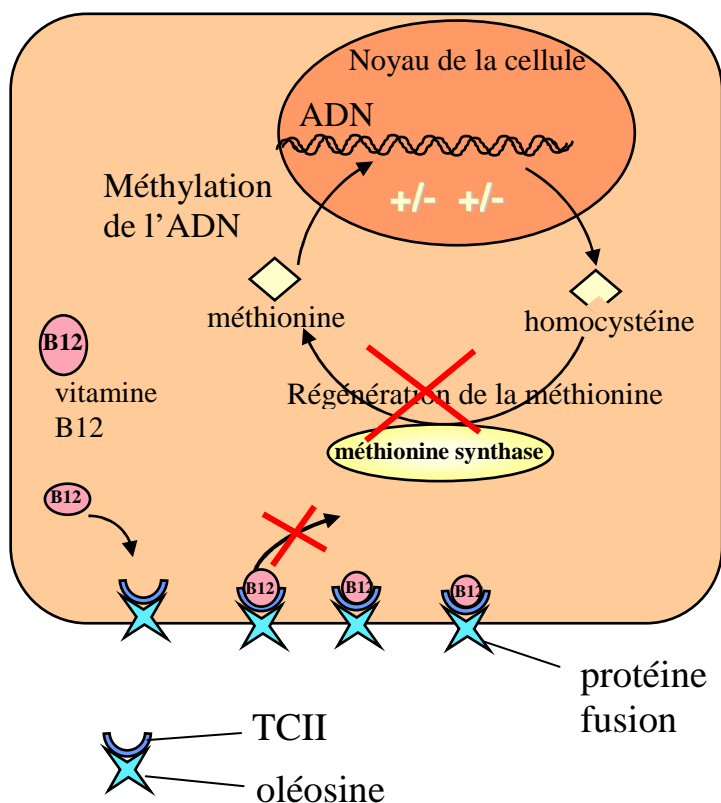


Figure 1 : la protéine fusion composée de la TCII, transporteur plasmatique de la cobalamine (B12), et de l'oléosine, protéine transmembranaire plasmatique, peut s'ancrer dans les membranes et capturer la vitamine B12 libre de la cellule. La protéine fusion bloquerait ainsi l'association de la vitamine B12 à la méthionine synthase entraînant une inhibition de cette enzyme et une diminution de la méthylation de l'ADN.

Construction de vecteurs d'expression des protéines chimères de l'oléosine et de la Transcobalamine :

Dans un premier temps, l'ADNc de la protéine chimère est transféré dans un vecteur à forte expression chez les mammifères. L'ADNc fut amplifié avec des amorces possédant des sites de restriction aux extrémités et dans l'amorce sens il a été inséré en amont du codon initiateur la séquence de Kozak indispensable pour une traduction efficace. Le produit de PCR et le vecteur d'expression de mammifère (plasmide pcDNA₃) sont digérés puis sont ligués ensemble.

Trois nouveaux plasmides ont été construits: le pcDNA₃-TCII-oléosine (TCII sans codon stop), le pcDNA₃-oléosine-TCII (TCII sans séquence signal) pour comparer l'efficacité de la construction inversée, et le pcDNA₃-oléosine pour vérifier que la capacité de liaison à la vitamine B12 n'est pas une conséquence de l'insertion de l'oléosine dans la membrane cellulaire. Il a donc été utilisé comme contrôle des expériences de transfection, le plasmide pcDNA₃-TCII construit par le Dr Fares Namour (Namour et al., 2001; Namour et al., 2003) et le pcDNA₃ natif.

Afin de s’assurer que ni l’amplification par PCR, ni l’insertion dans le plasmide, ni l’amplification bactérienne après la transformation n’avaient engendré de modifications de la séquence d’origine de la protéine chimère, des séquençages de la zone de jonction entre TCII et l’oléosine ainsi que les séquences au niveau de l’insertion des ADNc des différentes protéines chimères ont été réalisés. Aucune modification de la séquence n’a été observée dans les différents plasmides construits.

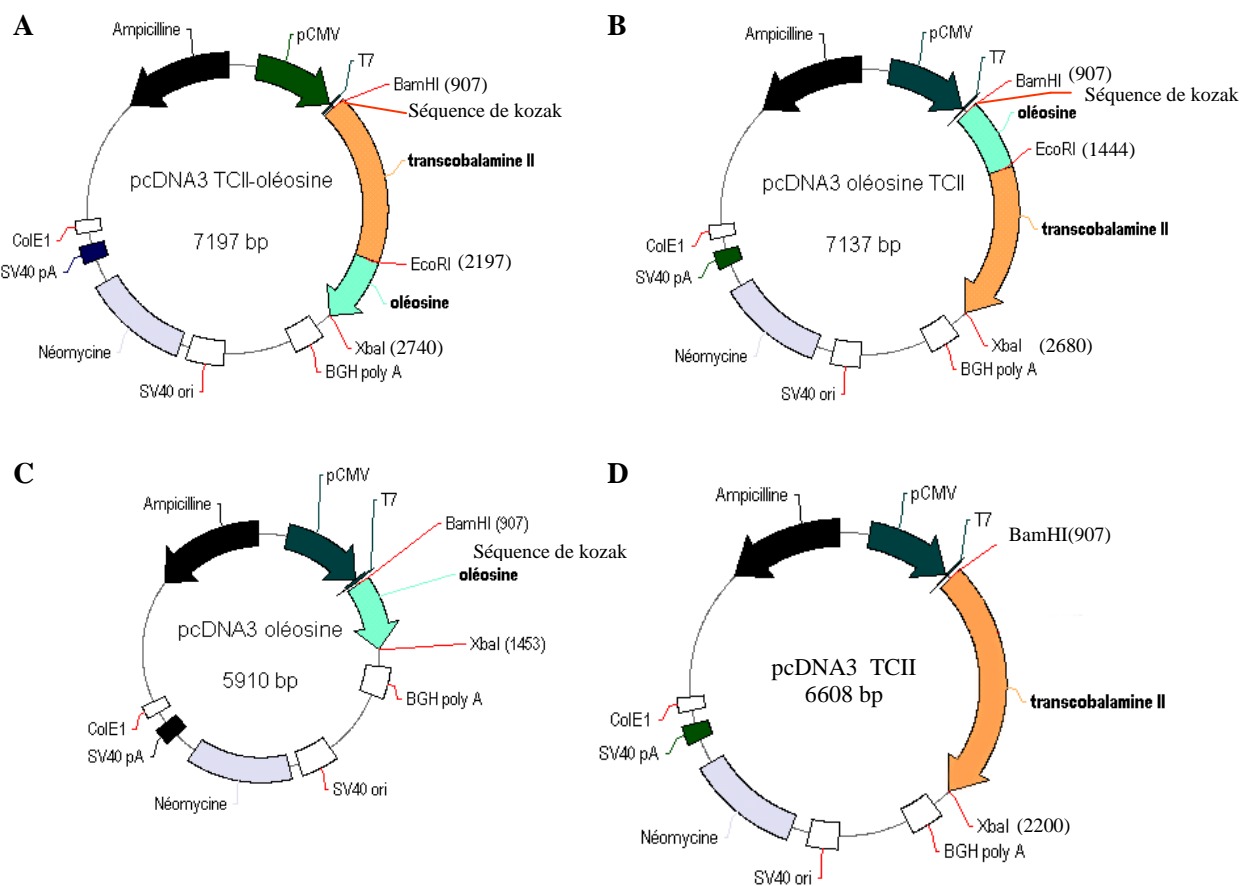


Figure 2 : Présentation des différentes constructions contenant la protéine chimère et la protéine TCII ou oléosine seule. Les tailles des différents transgènes : (A) TCII-oléosine 1818 pb, (B) oléosine –TCII 1758pb, (C) oléosine 528 pb et (D) TCII 1293 pb.

II. Publication#3 : Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, acceptée.

Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE

Shyue-fang Battaglia-Hsu*

Nassila Akchiche*

Nicole Noel*

Jean-Marc Alberto*

Elise Jeannesson*

Jean-Luc Daval*

Jean-Louis Guéant*†

*Inserm U954, Nutrition-Gene-Environmental exposure, Faculté de Médecine, Nancy-Université, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54505, France and † IRCCS Associazione Oasi Maria S.S.

– Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina (EN), Italy

Correspondance to JLG, Inserm U954, Nutrition-Gene-Environmental exposure, Faculté de Médecine, Nancy-Université, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54505, France, tel +33383683292, Fax +33383683279, mail jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr.

Manuscript information: 28 text pages, 6 figure pages.

Abbreviations:

Adam: protein with a disintegrin and metalloprotease domain

Akt: Akt/PKB, Protein kinase B

B12: vitamin B12

Cbl: Cobalamin

CDK: cyclin-dependent kinase
ER: endoplasmic reticulum
ERK: extracellular signal-regulated kinase
GSK: Glycogen Synthase Kinase
Hcy: homocysteine
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MMA: methylmalonic acid
NTR: neurotrophin receptor
PSD: postsynaptic densities
PP2A: Protein phosphatase 2A
RIP: regulated intramembraneous proteolysis
SAM: S-adenosylmethionine
SAH: S-adenosylhomocysteine
TACE: TNF-alpha converting enzyme
TC: transcobalamin
TO: TC-oleosin
TrkA: Tyrosine kinase A
TIMP: tissue inhibitors of metalloproteinases

Abstract

Vitamin B12 (cobalamin, Cbl) is indispensable for proper brain development and functioning, suggesting neurotrophic effects beside its well-known importance in metabolism. The molecular basis of these effects remains hypothetical, one of the reasons being that no efficient cell model has been made available for investigating the consequences of B12 cellular deficiency in neuronal cells. Here, we designed an original approach by stable transfection of NIE115 neuroblastoma cells to impose the anchorage of a chimeric B12 binding protein, transcobalamin-oleosin (TO) to intracellular membrane. This model produced an intracellular sequestration of B12 evidenced by decreased methyl-Cbl and S-adenosylmethionine and increased homocysteine and methylmalonic acid concentrations. B12 deficiency affected the proliferation of NIE115 cells through an overall increase in catalytic PP2A, despite its demethylation. It promoted cellular differentiation by improving initial outgrowth of neurites and, at the molecular level, by augmenting the levels of proNGF and p75^{NTR}. The upregulation of PP2A and proNGF triggered changes in ERK 1/2 and Akt, two signaling pathways that influence the balance between proliferation and neurite outgrowth. Compared with control cells, a two-fold increase of p75^{NTR} regulated intramembraneous proteolysis (RIP) was observed in proliferating TO cells ($p < 0.0001$) that was associated with an increased expression of two TACE secretase enzymes, Adam 10 and Adam 17. In conclusion, our data show that B12 cellular deficiency produces a slower proliferation and a speedier differentiation of neuroblastoma cells through interacting signaling pathways that are related with increased expression of PP2A, proNGF and TACE.

\body Introduction

Vitamin B12 (B12, also named cobalamin, Cbl) deficiency has long been associated with pernicious anaemia (1) and neurological disorders that can range from minor behavior changes to severe neurodegenerative disorders (2). Molecular mechanisms are still lacking to explain how

the deficiency can bring about all the symptoms observed. Indeed, only two enzymes are B12-dependent in mammalian cells: the mitochondrial enzyme L-methylmalonyl-coenzyme A mutase (EC 5.4.99.2) and the cytoplasmic homocysteine methyltransferase, also referred as methionine synthase (EC 2.1.1.13). Inferences are thus based on the two direct consequences of B12 deficiency: the accumulation of methylmalonic acid (MMA) and homocysteine (Hcy). Up to now, the consequences of B12 deficiency in brain have been difficult to evidence because of the experimental limitations of the classical cell models. Indeed, the minute amount of vitamin B12 needed by cells can be provided in vitro by B12 from the fetal calf serum, which can bind the “autocrine” B12 carrier protein, transcobalamin (TC) (3,4).

To delineate the role of B12 in neurological disorders, we have designed a neuronal cell model made deficient in B12 through the stable expression of a chimeric protein associating TC with oleosin, a plant protein that is targeted to oil bodies via the endoplasmic reticulum (ER) (5). The expression of oleosin in reticulum remains when oleosin is heterologously expressed in mammalian cells (6). TC is the protein that displays the highest affinity for B12; it is constitutively secreted into plasma to bind the circulating vitamin B12, is internalized into cells via receptor-mediated endocytosis and subsequently addressed in cytosol and mitochondria (3,4, 7). We linked TC to the hydrophobic oleosin to sequester B12 in the cytosolic face of intracellular membranes. We have designed this approach to create cellular models deficient in vitamin B12 (8). The consequences were here studied to reveal the molecular mechanisms affecting growth and differentiation of neuronal cells (Fig. 1). Our results indicated that the B12 impaired metabolism induced by the overexpression of TC-oleosin influences interacting signaling pathways related to PP2A (Protein phosphatase 2A), pro-Nerve Growth Factor (NGF) and TNF- α converting enzyme (TACE) and consequently produces a slower growth and a speedier differentiation of NIE115 cells.

Results

We created several stable NIE115 cell lines that express TC-oleosin (TO), oleosin-TC (OT), and GFP-TC-oleosin (GTO), respectively (Fig. 2). The incorporation of the transgenes was verified by PCR with specific primers (Fig. 2B). As a control for transfection, another stable NIE115 line that expresses an unrelated membrane protein, VR1 (transient receptor potential vanilloid subfamily, member 1) was also created. The content of tyrosine hydroxylase remained unmodified in both proliferative and differentiation status of the stably transfected cells (Fig. 2C). Figure 2D shows the results of the radioactive B12 binding in both intact cells and lysed membrane fraction of the cells, after 20 minutes of incubation. The TO-expressing cells possessed the highest binding capacity to B12, while OT-expressing cells had a binding capacity similar to that of TRPV1-transfected and non-transfected wild type (WT) cells. The GFP construct enabled us to confirm the intracellular membranous localization of the fusion protein in the reticulum (Fig. 2E).

The concentration of Hcy and MMA in culture medium and cellular extract was higher in TO cells, compared with OT and WT cells (Fig. 3A). This indicated that the B12 intracellular sequestration impaired the B12-dependent activity of methionine synthase and of MMA mutase, respectively. We chose OT cells as a control here because both TO and OT were transfected cells overexpressing oleosin-containing proteins and cultivated in the same conditions. As shown in Figure 3, compared with OT-cells, TO cells displayed a statistically significant reduction in conversing CN-Cbl into methyl-Cbl, ado-Cbl and aquo-Cbl and in SAM/SAH ratio.

The rate of proliferation of TO cells was 5.5-fold reduced, compared to that of OT-transfected and WT cells (Fig. 4A). The reduction was less dramatic (1.5-fold) when performing these experiments in excess of vitamin B12 in culture medium (200 μ M).

This reduced rate could be related to an increase in PP2A (9). Indeed, both demethylated PP2A and total catalytic PP2A_C were increased in TO cells (Fig. 5A, B). We examined the level of ERK1/2 and p38 because the PP2A-dependent MAPK pathway is known to regulate the cellular

proliferation and differentiation processes (10). Phospho-ERK1/2 levels were significantly reduced in the B12-lacking TO cells, while the variation in p38 occurred only at the 5D stage by comparison with OT cells (Fig. 5D,E,F). Total CDK2 level in TO cells appeared reduced in cells upon differentiation (Fig. 5G), probably reflecting the inactivation of ERK1/2 in a specific cyclin E-dependent way (Fig. 5H). Cyclin D was not affected (data not shown).

The B12-lacking TO cells started their outgrowth of neurites earlier than OT and WT cells and had an increased level of PSD 95 at day 5 of differentiation (Fig. 4B,C,D). This effect was abolished when adding 200 μ M of B12 in the culture medium. This observation translated into a slightly longer mean neurite length when the outgrowth of neurites was quantified under constant cell density. We found that, once triggered to differentiate, TO cells had an increased level of pro-NGF, compared to OT (Fig. 6A). Tyrosine kinase A (TrkA) receptor, functionally depending on NGF, was unchanged (Fig. 6B), while the p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}), being part of this receptor complex, was upregulated in proliferating TO cells (Fig. 6C). Upregulation and activation of the Akt cascade has been linked to the differentiation of human neuroblastoma cells (11, 12). In our model, total Akt and phospho-Akt, detected by an anti-phospho S473 Akt, were both found increased in TO cells (Fig. 6D, E). Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) is a key downstream effector of Akt that can be reactivated by PP2A (13). However, no significant difference could be observed between the two TO and OT cell lines for both phospho-GSK-3 β and total GSK-3 β (phospho-GSK3 β : p=0.477, 0.869 and 0.537 for P, 3D and 5D cells, respectively, and total GSK-3 β : p=0.934, 0.473 and 0.133 for P, 3D and 5D cells). This suggests that other pathways may counterbalance the influence of Akt (14).

Western blot analysis of p75 neurotrophin receptor (p75^{NTR}) additionally revealed the presence of regulated intramembraneous proteolysis (RIP) in proliferating cells (15), with an almost two-fold increase, compared with the control OT cells (Fig. 6C). Such RIP of the p75^{NTR} involves the family of TNF-alpha converting enzyme (TACE). Consequently, two TACE enzymes most implicated in brain were examined: Adam 10 and Adam 17. Figures 6F and 6G

show an increase of at least 20% in both Adam 10 and Adam17 in proliferating TO cells. For 5D TO cells, a nearly 40% higher expression than control in Adam 17 was found.

Discussion

Our experimental cell model was designed to identify the molecular mechanisms of B12 impaired cellular metabolism related to proliferation and early differentiation. It appeared to be not adapted for evaluating the effects of B12 in fully differentiated NIE115 neuroblastoma cells since they became detached and died once reaching fully differentiation status. We compared TO with OT cells rather than with wild type cells because (i) they only differed by the B12 binding capacity of the expressed chimera and subsequent B12 impaired metabolism, (ii) both cell lines were cultivated in the presence of G418 aminoglycoside, a condition that cannot be used for wild type cells. The lack of B12 trapping effect in OT cells suggests that the integration of TC in the chimera modified the conformation of its N-terminal domain (7, 8).

Recently, we showed that the stable transfection with TO produces a dramatic decrease of methyl B12 and of methionine synthase activity in the cytosol fraction of Caco2 and NIE 115 cells (8). Here, the B12 impaired metabolism in the whole cell lysates of TO cells was confirmed by the decreased conversion of B12 into methyl-Cbl, ado-Cbl and aquo-Cbl, the accumulation of both Hcy and MMA, and the reduction of succinic acid and SAM/SAH ratio in the whole cell lysate. OT and WT cells proliferated at a much higher speed than TO cells, while neurite outgrowth and PSD 95 expression were significantly higher in TO cells than in WT and OT cells. Only OT cells could be considered as a valid control of TO cells for the mechanistic study of B12 deficiency, since they were cultivated also with G418. Taken together, these lines of evidence suggest that reduced proliferation and earlier differentiation of the transfected TO NIE 115 cells are linked, at least in part, to B12 impaired metabolism.

The molecular effects of B12 impaired metabolism are summarized in Fig.1B. Total catalytic PP2A_c actually increased in TO cells despite the relative demethylation of its C-terminal leucine residue, which was reported to have key functional consequences (16). This relative demethylation could result either from a deficient transmethylation due to the decreased SAM/SAH ratio, or from the activation of a methylesterase by homocysteine accumulation (17). Our data suggested that the reduction in growth of the TO cells was mediated by an inhibition of the MAPK/ERK1/2 pathway through PP2A_c upregulation, as reported in vitro and by knock out experiments in *Drosophila* Schneider 2 cells (18, 19). The increased homocysteine produced in our model had similar effects on MAPKs than those obtained with exogenously added homocysteine, with inactivation of Erk1/2 and inhibition of Erk1/2-dependent expression of cyclin E (20).

The effects of TO transfection on neurite outgrowth and the increased level of PSD 95 are consistent with an influence of B12 impaired metabolism on neuroplasticity. PSD 95 is a major component of postsynaptic densities (PSD) that promotes dendrite spine formations and multiple axon connections (21). It is expressed in the NIE-115 cell line only after differentiation (22). We examined the level of proNGF in TO and OT cells since neurotrophins trigger differentiation of NIE-115 cells. We found that once triggered to differentiate, TO cells augmented rapidly their proNGF level, in contrast to OT cells (Fig. 6A). ProNGF has been demonstrated to induce neurite outgrowth, albeit to a lower extent than NGF (23, 24). Following nerve stimulation, ProNGF is released along with proteases that independently cleave proNGF to NGF (25). For neurite outgrowth, in addition to NGF, evidence points to the participation of the p75^{NTR} neurotrophin and Akt pathways. Earlier works suggest that NGF, TNF-alpha and their receptors may all be involved in regulating the proliferation and differentiation of B12-lacking cells (26, 27). NGF can induce the synthesis of TNF-alpha through NF-κB in neurons, and TNF-alpha can induce the expression of NGF in glia. The receptors for these factors include the

heteromeric and monomeric NGF receptors containing TrkA and p75^{NTR}, the latter being upregulated in TO cells.

Adam-17 and Adam-10 are TACE secretases that activate pro-TNF-alpha. The expression of TACE has been documented in neurons (28). The increases of Adam-10 and Adam-17 reported in TO cells have to be considered with earlier studies in both B12-deficient human and animals that had shown the presence of higher level of TNF-alpha in the cerebrospinal fluid (29, 30, 31). We did not find any change in TNF-alpha transcription level in TO (data not showed). However, our data suggest that TNF-alpha may be augmented in the cerebrospinal fluid because of the increased TACE activity. TACE can be regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). TIMPs are regulated by methylation and have been associated with either brain trauma or neurodegenerative diseases (32, 33, 34, 35). However, the role of TIMP in TACE expression remains an open question, as we have not been successful in detecting either TIMP1 or TIMP3 at the protein level.

The very effects of B12 deficiency, in particular the up-regulation of p75^{NTR}, TACE, increased RIP of the p75^{NTR} by TACE as well as the production of NGF are consistent with the earlier outgrowth of neurites upon differentiation of the TO cells. This is in agreement with the studies by Ahmed et al. and Logan et al. (36, 37), who showed that in dorsal root ganglion culture and optic nerve, TACE induced the RIPs of Nogo-66 receptor and of p75^{NTR} that disinhibit the outgrowth of neurites and promote their branching. The RIP of Nogo-66 receptor was not present in our culture system (data not shown), indicating that the RIP of p75^{NTR} alone is sufficient for disinhibiting neurite outgrowth, at least in NIE115 cells.

In conclusion, our results showed that impaired cellular metabolism of B12 influences cell cycle progression and differentiation of neuroblastoma cells through interacting signaling pathways related with the increased expression of PP2A, proNGF and TACE.

Materials and methods

PCDNA3 plasmids for mammalian cells. The oleosin sequence was determined as described previously (38). The schematics of the recombinant plasmids are given in fig. 2A. The preparation of plasmids, the transfection, the RT-PCR and primers for PCR verification of the transgene in the stably transfected NIE115 cells and the characterization of the fusion proteins have been described recently (8).

Cell culture

The NIE115 cells are neuroblastoma cells chosen here as a neuronal model (39). The number of cell passages was limited to 5 after the establishment of the stable cell lines. B12 binding was found constant within the 5 passages used for the experiments. This assay was performed before all cell experiments. The cell number was evaluated using the classical trypan blue method using a haemocytometer. For proliferation studies, cells were cultured in a medium containing 90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/L glucose (Gibco, supplemented with sodium pyruvate) and 10% FCS at 37 °C in an atmosphere of air (95%) and carbon dioxide (5%). For differentiation studies, one day prior to the initiation of differentiation, cells were trypsinized gently and replated in cultured dishes at a density of $4-8 \times 10^4$ per 60 mm Petri dish. The differentiation medium contained 2% FCS and 1.25% DMSO (Sigma) in Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/L glucose. We have quantified the neurite amount and length using the NeuroJ plugin developed for the imageJ program (© Erik Meijering). Briefly, cells were grown and differentiated for up to 96 hours in 65mm culture dishes to a constant density of 130-150 cells per optical field (4X plan, Olympus BX51WI). The living cells were fixed and stained using the Neurite Outgrowth Assay Kit (Millipore, France) and then photographed by Olympus digital camera for quantitative analysis by NeuroJ. The neurite number and the neurite length were the sum of all cells examined in the optical field. The data reported were obtained from five independent experiments. Penicillin and streptomycin were added to all media; G418 at 1mg per ml was included in the culture medium for the cells

stably transfected with all pCDNA₃-based vectors. The VR1 construct used as a transfection control expresses a non-specific cationic channel (40) and was a gift from Dr. Dejian Ren of the University of Pennsylvania.

Radiolabeled B12 binding, SAM, SAH, Hcy, succinic acid and MMA determination

The binding of radiolabeled B12 in membrane extracts from cultured cell was determined in NIE 115 cells as described for Caco 2 cells (8). The method for determination of SAM and SAH was adapted from Miller et al. (41) as described previously (42). Hcy, succinic acid and MMA were determined by a single UPLC-MS/MS procedure adapted from previously published articles, with an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 μ m, 2.1x50 mm, Waters Corporation) (8, 43, 44).

Protein analysis by Western blot

Cells were lysed directly with a solution containing 0.05 M NaH₂PO₄ (pH8), 0.15 M NaCl, 0.1 M Imidazole, 0.5% Chaps and Complete™ (Roche) Protease Inhibitors. Lysates were then centrifuged twice at 5000g for 10 minutes. The protein concentration of the supernatant was determined using Advanced Protein Assay Reagent (Cytoskeleton) and BSA as standard protein. In general, 20 μ g of total protein was loaded per lane for SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Depending on the molecular mass of the protein, the stacking and the separating gel contained 4% and 8 to 12% of acrylamide, respectively. Proteins were electrotransferred onto PVDF membranes (Millipore) in 25mM Tris buffer containing 192 mM glycine and 20% (v/v) methanol. The membranes were then blocked with 5% non-fat milk for 1 hour at room temperature. The PVDF membrane was then probed overnight with various primary antibodies (all antibodies of the PI3K and ERK pathways, PP2Ac and demethylated PP2A were obtained from Cell Signaling Technology (USA); proNGF, p75^{NTR}, TrkA, Adam10, Adam17, and tyrosine hydroxylase were obtained from Millipore (France), CDK2, TIMP1 and 3 were obtained from Santa Cruz (USA), anti-postsynaptic density-95 kDa (PSD-95) from Abcam (USA). Appropriate secondary antibodies conjugated to HRP were used for detection with ECL or ECL

PLUS reagent (Amersham). Densitometric analysis was normalized to an arbitrary value of 1.0 that represented the maximal value recorded within each experiment series.

Statistics

All results were expressed as means \pm standard error (S.E.). The significance between the effects of culture conditions was determined by analysis of variance (ANOVA). Results of pair student's t test are denoted by asterisks (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

Footnote: designed and wrote the manuscript, JLG, SBS; analyzed data, SBS, JLG, NA, JLD; performed research, SBS, NA, JMA, NN; coordination, JLG.

Acknowledgments: Institutional grants were received from Inserm, Region Lorraine and ANR Nutrivigene (French national agency for research).

References

- (1) Russell JSR, Batten FE, Collier J (1900) Subacute combined degeneration of the spinal cord. *Brain* 23: 39-110.
- (2) Gillette Guyonnet S, et al. (2007) IANA task force on nutrition and cognitive decline with aging. *J Nutr Health Aging* 11:132-52
- (3) Pons L, Guy M, Lambert D, Hatier R, Guéant J (2000) Transcytosis and coenzymatic conversion of [(57)Co]cobalamin bound to either endogenous transcobalamin or exogenous intrinsic factor in caco-2 cells. *Cell Physiol Biochem* 10:135-48.
- (4) McLean GR, Quadros EV, Rothenberg SP, Morgan AC, Schrader JW, Ziltener HJ. (1997) Antibodies to transcobalamin II block in vitro proliferation of leukemic cells. *Blood* 89:235-42.
- (5) Hsieh K, Huang AH (2005) Lipid-rich tapetosomes in Brassica tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum. *Plant J* 43:889-99.
- (6) Hope RG, Murphy DJ, McLauchlan J (2002) The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J Biol Chem* 277: 4261-70.
- (7) Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen TE, Randaccio L (2006) Structural basis for mammalian vitamin B12 transport by transcobalamin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4386-91.
- (8) Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, Ortiou S, Chery C, Alberto JM, Arango-Rodriguez ML, Dumas D, Martinez-Fong D, Freund JN, Gueant JL (2009) Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One* 4:e6325.

- (9) Yan Y, Mumby MC (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* 274:31917-24.
- (10) Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 22:954-65.
- (11) López-Carballo G, Moreno L, Masiá S, Pérez P, Baretino D (2002) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277:25297-304.
- (12) Evangelopoulos ME, Weis J, Krüttgen A (2005) Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene* 24:3309-18.
- (13) Lee YI, Seo M, Kim Y, Kim SY, Kang UG, Kim YS, Juhn YS (2005) Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/dephosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta, and this dephosphorylation involves protein phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *J Biol Chem* 280:22044-52.
- (14) Hernández F, Avila J (2008) The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimers' disease. *FEBS Lett.* 582:3848-54.
- (15) Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, Hilaire M, Mellado W, Chao MV, Filbin MT (2005) MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 46:849-55.
- (16) Favre B, Zolnierowicz S, Turowski P, Hemmings BA (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated in vivo. *J Biol Chem* 269:16311-7.
- (17) Zhang CE, Tian Q, Wei W, Peng JH, Liu GP, Zhou XW, Wang Q, Wang DW, Wang JZ (2008) Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 29:1654-65.

- (18) Zhou B, Wang ZX, Zhao Y, Brautigan DL, Zhang ZY (2002) The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J Biol Chem* 277:31818-25.
- (19) Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC (2002) Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4221-6.
- (20) Rabaneda LG, Carrasco M, López-Toledano MA, Murillo-Carretero M, Ruiz FA, Estrada C, Castro C (2008) Homocysteine inhibits proliferation of neuronal precursors in the mouse adult brain by impairing the basic fibroblast growth factor signaling cascade and reducing extracellular regulated kinase 1/2-dependent cyclin E expression. *FASEB J* 22:3823-35.
- (21) Nikonenko I, Boda B, Steen S, Knott G, Welker E, Muller D (2008). PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol* 183:1115-27.
- (22) Oh JE, Karlmark Raja K, Shin JH, Pollak A, Hengstschläger M, Lubec G (2006). Cytoskeleton changes following differentiation of N1E-115 neuroblastoma cell line. *Amino Acids* 31:289-98.
- (23) Fahnestock M, Yu G, Michalski B, Mathew S, Colquhoun A, Ross GM, Coughlin MD (2004) The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem* 89:581-92.
- (24) Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, Raza S, Crutcher K, Thrasivoulou C, Simons P, Cowen T (2007) ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1119:208-15.
- (25) Bruno MA, Cuello AC (2006) Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6735-40.

- (26) Takei Y, Laskey R (2008) Tumor necrosis factor alpha regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells. *Mol Biol Cell* 19:855-64.
- (27) Evangelopoulos ME, Weis J, Krüttgen A (2005) Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal : HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene* 24:3309-18.
- (28) Skovronsky DM, Fath S, Lee VM, Milla ME (2001) Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques. *J Neurobiol* 49:40-6.
- (29) Buccellato FR, Miloso M, Braga M, Nicolini G, Morabito A, Pravettoni G, Tredici G, Scalabrino G (1999) Myelinolytic lesions in spinal cord of cobalamin-deficient rats are TNF-alpha-mediated. *FASEB J* 13:297-304.
- (30) Peracchi M, Bamonti Catena F, Pomati M, De Franceschi M, Scalabrino G (2001) Human cobalamin deficiency: alterations in serum tumour necrosis factor-alpha and epidermal growth factor. *Eur J Haematol* 67:123-7.
- (31) Scalabrino G, Carpo M, Bamonti F, Pizzinelli S, D'Avino C, Bresolin N, Meucci G, Martinelli V, Comi GC, Peracchi M (2004) High tumor necrosis factor-alpha levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann Neurol* 56:886-90.
- (32) Lorenzl S, Albers DS, Narr S, Chirichigno J, Beal MF (2002) Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 178:13-20.
- (33) Lorenzl S, Albers DS, Chirichigno JW, Augood SJ, Beal MF (2004) Elevated levels of matrix metalloproteinases-9 and -1 and of tissue inhibitors of MMPs, TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci* 218:39-45.

- (34) Hoe HS, Cooper MJ, Burns MP, Lewis PA, van der Brug M, Chakraborty G, Cartagena CM, Pak DT, Cookson MR, Rebeck GW (2007) The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. *J Neurosci* 27:10895-905.
- (35) Lee JK, Shin JH, Suh J, Choi IS, Ryu KS, Gwag BJ (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) expression is increased during serum deprivation-induced neuronal apoptosis in vitro and in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a potential modulator of Fas-mediated apoptosis. *Neurobiol Dis* 30(2):174-85.
- (36) Ahmed Z, Mazibrada G, Seabright RJ, Dent RG, Berry M, Logan A (2006) TACE-induced cleavage of NgR and p75NTR in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin. *FASEB J* 20:1939-41.
- (37) Logan A, Ahmed Z, Baird A, Gonzalez AM, Berry M (2006) Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain* 129:490-502.
- (38) Pons L, Chery C, Romano A, Namour F, Artesani MC, Guéant JL (2002) The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy* 57 (Suppl 72):88-93.
- (39) Marler KJ, Kozma R, Ahmed S, Dong JM, Hall C, Lim L (2005) Outgrowth of neurites from NIE-115 neuroblastoma cells is prevented on repulsive substrates through the action of PAK. *Mol Cell Biol* 25:5226-41.
- (40) Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.
- (41) Miller JW, Nadeau MR, Smith J, Smith D, Selhub J (1994) Folate-deficiency-induced homocysteinaemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem* 298:415-9.

- (42) Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170:667-79.
- (43) Ducros V, Belva-Besnet H, Casetta B, Favier A (2006) A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 44:987-90.
- (44) Hempen C, Wanschers H, van der Sluijs Veer G (2008) A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem* 391(1):263-70.

Legends

Figure 1. Experimental model of vitamin B12 cellular sequestration and proposed effects on the growth and the differentiation of neuronal cultured cells (adapted from reference 8). **A:** the schematic of the TO experimental model is shown. **B:** Vitamin B12 deficiency upregulates PP2Ac, proNGF and TACE. These reduce proliferation and promote differentiation of neuroblastoma cells by modulating the interacting down stream pathways including ERK1/2, Akt/PKB and p75^{NTR}.

Figure 2. Expression of transcobalamin-fused constructs in NIE115 cells. **A:** the schematics of the plasmids TO, OT and GTO are shown. **B:** the incorporation of the three plasmids in NIE115 cells in corresponding stable cell line was evaluated by PCR technique (see methods section for the specific primers). **C:** the relatively constant contents of the tyrosine hydroxylase in TO and OT cells indicate that these transfected cells remain as valid neuronal model (typical result). **D:** radiolabeled B12 (30,000 cpm at 300 μ Ci / μ g) was added to about 10^6 cells and then incubated for 20 minutes at either 37°C (intact cell) or 4°C (lyzed cell). Compared with OT, VR1 and WT, the expression of TO leads to an increased B12 binding capacity in either intact or lyzed cells ($p < 0.001$). The VR1 expressing cells serve as a control to normalize the B12 binding to the TO, OT and WT cells. (typical result out of 5 runs performed in 3 repeats. Mean and S.E. are indicated). **E:** the confocal image of the NIE-115 cells transfected with GTO shows that the expressed fusion protein is targeted to reticulum. **F:** three days after initiating the differentiation of the NIE115 cells, more extensive neurite outgrowth was evident in TO cells. Here cells were immuno-labeled with Adam17 antibody. The secondary antibody was coupled to Alexa 488 for visualization. Abbreviation: P for proliferation; 3D for 3 days after differentiation; 5D for 5 days after differentiation; WT for wild type NIE115 cells; BK for blank without DNA template; TC for transcobalamin.

Figure 3. Changes in B12-related parameters in TO cells. **A:** a higher concentration of Hcy in culture medium, higher content of MMA and lower content of succinic acid in cell extract was observed in TO, compared with OT and WT cells ($p < 0.001$). **B and C:** TO cells had a statistically significant reduction in their SAM/SAH ratio ($p < 0.001$), with a weaker change in SAM ($p = 0.020$) and no significant modification in SAH cellular level ($p = 0.116$). **C:** ^{57}Co -labeled Cbl ($\sim 300 \mu\text{Ci}$ per μg) at a concentration of $30,000 \text{ cpm}/\mu\text{l}$ was incorporated into culture medium ($30,000 \text{ cpm}/\text{mL}$ culture medium) for three days. The various forms of vitamin B12 in whole cell extracts were analysed by HPLC (described in ref 3). The total amount of radioactivity taken by each cell lines was considered as 100%. Absolute amount of radioactivity in $100\,000 \text{ g}$ pellet and supernatant of TO and OT extracts is showed in B. Significantly less Me-Cbl, Ado-Cbl and $\text{OH}_2\text{-Cbl}$ were formed in TO cells, as evidenced in C ($p < 0.001$). Abbreviation: CN-Cbl, cyano-cobalamin; Me-Cbl, methyl-cobalamin; Ado-Cbl, adenosylcobalamin; $\text{OH}_2\text{-Cbl}$, aquo-cobalamin; SAM, s-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine; Hcy, homocysteine. A-C: typical result out of 5 runs performed in 3 repeats. Mean and S.E. are indicated.

Figure 4. B12 deficiency leads to slower growth and earlier differentiation. **A:**

a significant reduced rate of proliferation was associated with the vitamin B12-deficient TO cells, compared with WT and OT cells. When adding $200 \mu\text{M}$ B12 in culture medium, the growth rate of TO cells became similar to that of WT and OT cells cultivated in normal B12 concentration (number of viable cells was counted by trypan blue exclusion method). **B, C:** upon change to differentiation medium, within forty-eight hours TO cells showed a more significant outgrowth of neurite than WT and OT cells; this was evident in total neurite number (B) and total neurite length (C). **D:** TO cells had an increased level of PSD 95 at day-5 of differentiation. See Materials and Methods for the analysis of neurite using NeuroJ program. The neurite number and the neurite length were the sum of all cells examined in the optical field (constant density of

130-150 cells). A: typical result out of 3 runs performed in 3 repeats. B-C: results from 5 independent determinations. Mean and S.E. are indicated.

Figure 5. Western blots for proteins relevant to neuronal cell growth.

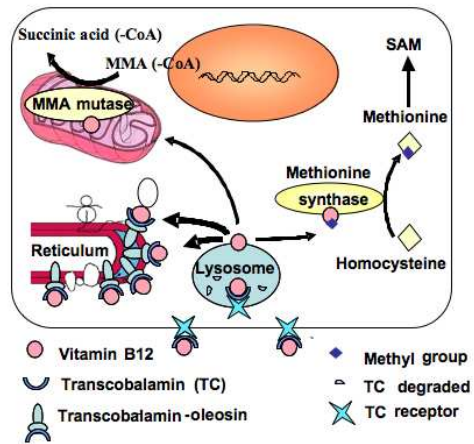
A: the level of total protein PP2Ac (phosphatase 2A, catalytic subunit) increase in all three cultured states of the TO cells ($p=0.0281$, 0.0012 , and <0.0001 for P, 3D, and 5D cells, respectively). **B:** The level of demethylated PP2Ac also increased in TO cells, with $p=0.0012$, 0.0082 , and 0.0006 for P, 3D and 5D cells, respectively. **C, D:** no difference of total ERK1/2 (**C**) could be observed between the TO and the OT cells; phospho-ERK1/2 level (**D**) was significantly reduced in TO cells (for total ERK1/2, $p=0.4226$, 0.3992 and 0.8563 and for phospho-ERK1/2, $p=0.01181$, $p<0.0001$ and $P<0.0001$ for P, 3D and 5D cells, respectively). **E, F:** for both total p38 (**E**) and phospho-p38 (**F**), an increase was visible at the 5D stage of the cells (for p38, $p=0.1087$, 0.6742 and 0.02038 and for P-p38, $p=0.2513$, 0.6881 and 0.0013 , respectively for P, 3D and 5D cells). **G:** The total amount of cyclin-dependent protein kinase 2 (CDK2) appeared reduced in TO cells in differentiated cells (for P, 3D and 5D cells: $p=0.2032$, 0.0005 , and 0.0004 , respectively), reflecting the growth retardation associated with the TO cells. **H:** a significant decrease was detected in cyclin E at 3D (for proliferating cells, $p = 0.394$; for 3D cells, $p = 0.0283$; for 5D cells, $p=0.709$). A-H: typical result out of 3 runs performed in 3 repeats. Densitometric analysis was normalized to an arbitrary value of 1.0 that represented the maximal value recorded within each experiment series. Mean and S.E. are indicated.

Figure 6. Western blots for proteins relevant to neurite outgrowth.

A: the level of proNGF increased very rapidly in TO cells upon differentiation instead of decrease, as in the case of OTcells (6A: $p=0.03$, 0.302 , <0.001 for P, 3D and 5D cells, respectively). **B:** for TrkA neurotrophin receptor, only the 140kD band was quantified since it represents the mature form of the functional NGF receptor. No difference could be detected

between TO and OT cells ($p=0.612, 0.841, 0.222$ for the P, 3D and 5D cells, respectively). However, in TO cells the 110 kDa form of the TrkA (underglycosylated immature precursor) was upregulated. **C:** the level of neurotrophin receptor $p75^{\text{NTR}}$ and its RIP appeared to increase dramatically in proliferating TO cells (upper band: $p<0.001, 0.443, 0.203$; lower band RIP: $p<0.001, 0.734, 0.245$, respectively for P, 3D and 5D cells). **D, E:** the level of total Akt (D) and S473 phospho-Akt (E) were in general increased in TO cells, especially the S473 phosphorylated form of Akt (for pan-Akt: $p=0.789, 0.033$ and 0.042 for P, 3D and 5D cells respectively; for p-Akt: $p<0.001, <0.0001$ and <0.0001 for P, 3D and 5D cells, respectively). **F:** the level of Adam 17 increase in TO cells in all states examined ($p=0.0111, 0.002, <0.001$ for P, 3D, 5D cells, respectively). **G:** the level of Adam 10 increased in proliferating but not differentiated TO cells ($p<0.001, 0.5931, 0.0576$ for P, 3D, 5D cells, respectively). A-C: typical result out of 3 runs performed in 3 repeats. Densitometric analysis as in figure 5. Mean and S.E. are indicated.

A



B

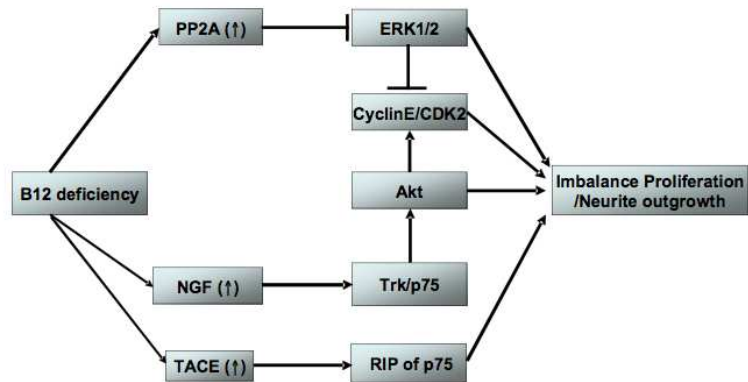


Figure 1. Experimental model of vitamin B12 cellular sequestration

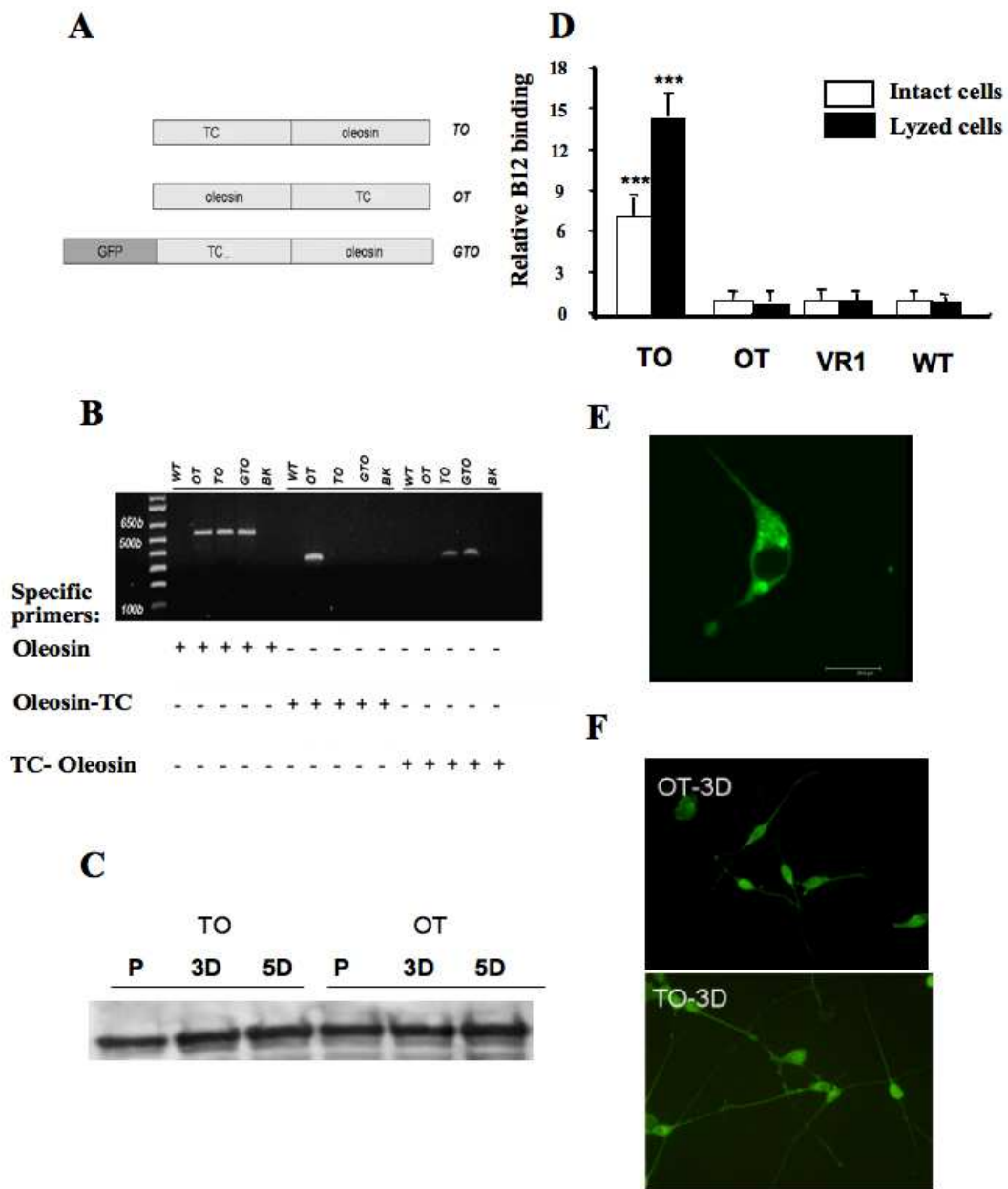


Figure 2. Expression of transcobalamin-fused constructs in NIE-115 cells

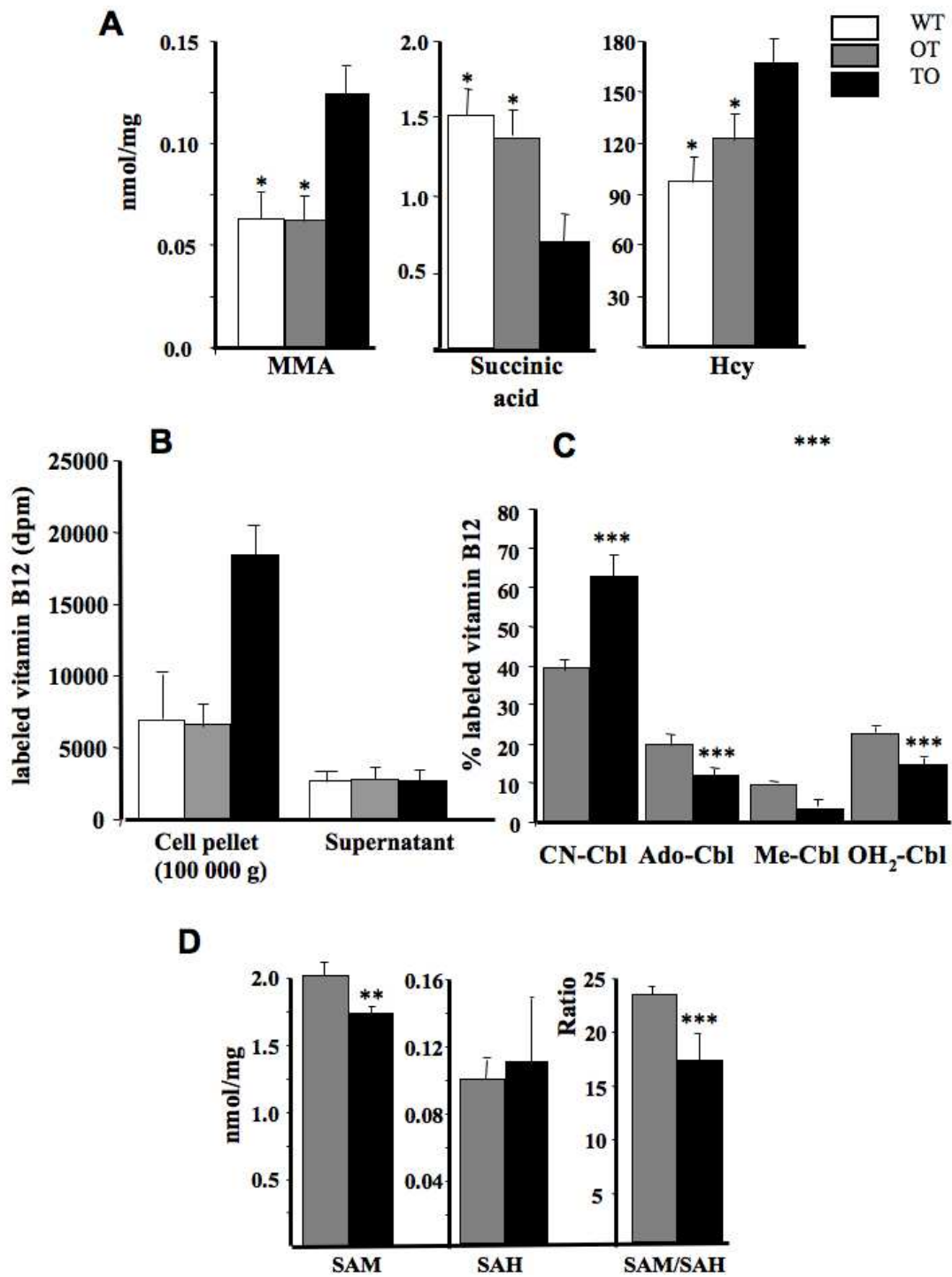


Figure 3. Changes in B12-related parameters in TO cells

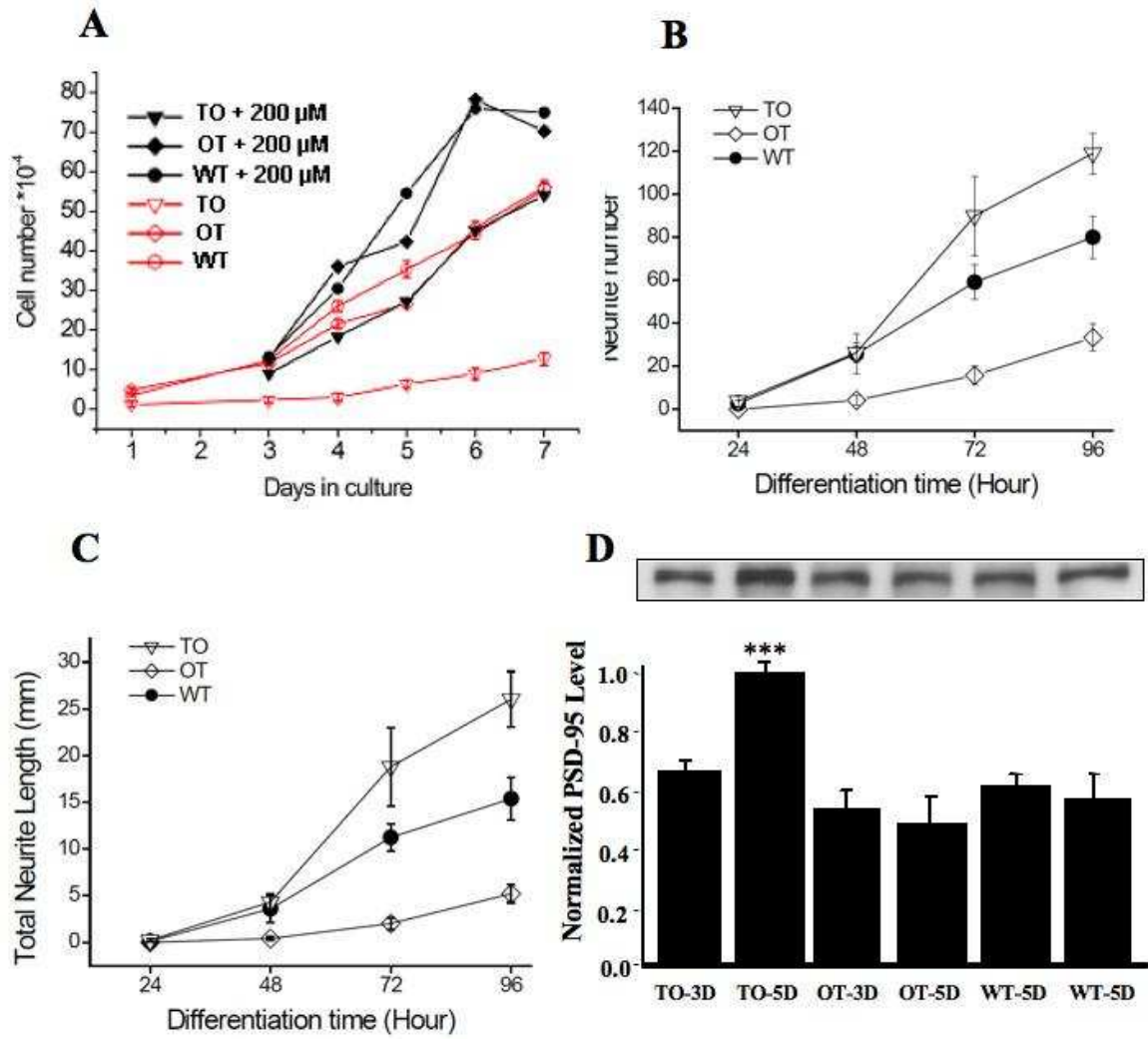


Figure 4. B12 deficiency leads to slower growth and earlier differentiation.

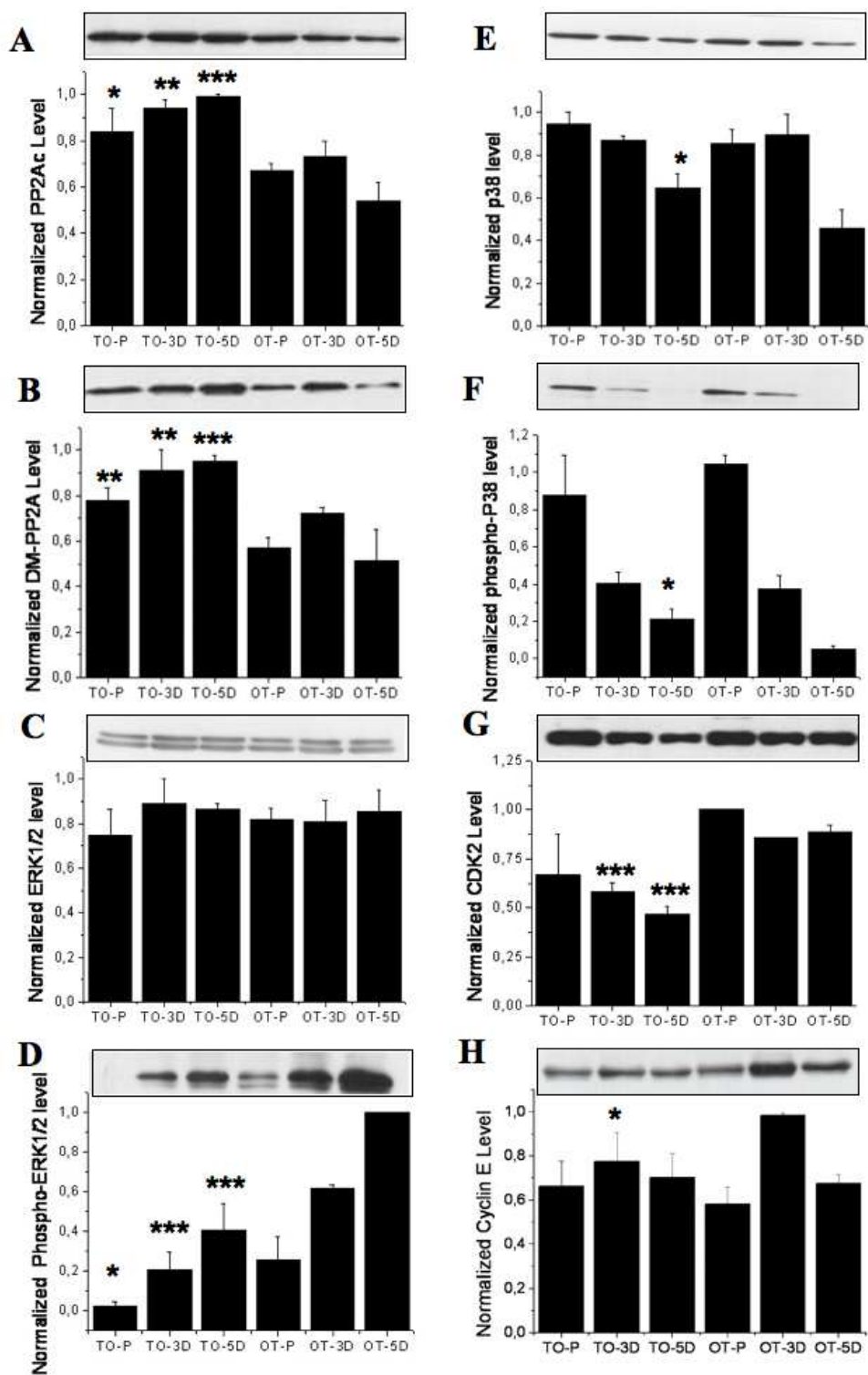


Figure 5. Western blots for proteins relevant to neuronal cell growth

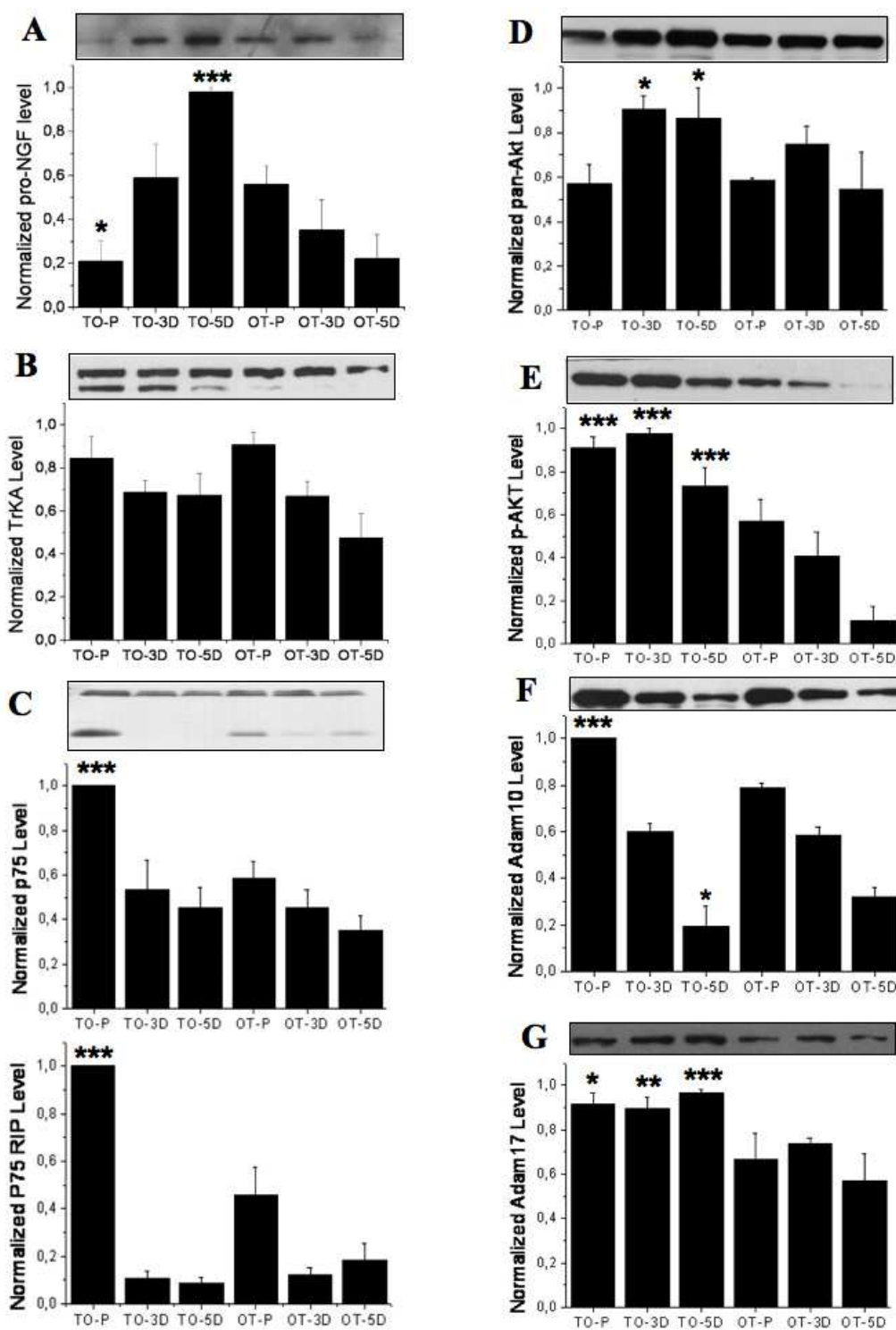


Figure 6. Western blots for proteins relevant to neurite outgrowth

III. Synthèse de la publication

La lignée de neuroblastome de souris NIE-115 a été transfectée de manière à permettre l'expression stable des protéines chimériques TCII-Oléosine, Oléosine-TCII, GFP-TCII-Oléosine. Par l'introduction du gène de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) en amont de cette séquence, créant une protéine de fusion fluorescente, il a été rendu possible localiser la protéine chimère dans la cellule. D'autre part, il a été utilisé un plasmide « RFP-ER » pour l'expression de la RFP (*Red Fluorescent Protein*) associée à une séquence ER (correspondant au peptide signal de localisation dans le réticulum endoplasmique). La co-transfection du plasmide GFP-TCII-oléosine et du plasmide RFP-ER a permis de co-localiser les deux produits d'expression au niveau du réticulum endoplasmique.

L'utilisation de Cbl radiomarquée a montré que les cellules transfectées avec le plasmide TCII-oléosine présentaient une capacité de fixation élevée de la vitamine, tandis que l'expression de la protéine chimère oléosine-TCII était sans effet. Nous supposons, dans ce dernier cas, que TCII présente une conformation inactive.

La déplétion en B12 dans les cellules « TCII-oléosine » conduit à une moindre conversion de la cyano-cobalamine (CN-B12) en méthyl-cobalamine et à une diminution du ratio S-adénosylméthionine/S-adénosylhomocystéine (SAM/SAH).

Une réduction de la prolifération cellulaire a été mise en évidence. Elle était associée à une augmentation de l'expression de PP2Ac (*protein phosphatase 2A*) et à une diminution de l'expression de CDK2. L'analyse de la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinases*) dépendante de PP2A, qui contrôle la prolifération et la différenciation, a révélé une diminution de l'expression de phospho-ERK1/2 dans les cellules « TCII-oléosine ». Ainsi, la diminution de la prolifération des cellules de neuroblastome déficientes en B12 semble être médiée par l'inhibition de la voie MAPK/ERK1/2 via l'activation de PP2A.

Par ailleurs, une augmentation de la protéolyse intramembranaire de p75^{NTR} dans les cellules en prolifération a été observée. Celle-ci implique la famille des métalloprotéases TACE et nous avons observé une augmentation de l'expression de Adam 10 et Adam 17, deux enzymes de cette famille majoritaires dans le cerveau.

Par conséquent, nos résultats indiquent que la vitamine B12, et plus particulièrement la méthyl-Cbl, agit non seulement en tant que cofacteur de la méthionine synthase mais participe aussi à la régulation de la progression du cycle cellulaire neuronal et à la différenciation des cellules. La déficience en B12 provoque une diminution de la prolifération et favorise la différenciation des cellules de neuroblastome, en lien avec les voies métaboliques impliquant PP2A, proNGF et TACE.

Cependant, le mécanisme de la réduction de prolifération médiée par p75^{NTR} n'est pas éclairci. Nous avons détecté dans les neuroblastomes NIE-115 déficients en B12 une surexpression de proNGF, le précurseur du NGF (*Nerve growth factor*). Ceci suggère que l'activation de p75^{NTR} via NGF serait plus élevée dans les cellules déficientes en B12. Les phosphatases telles que PP1 (*protein phosphatase 1*) et PP2A sont des kinases qui, jouant un rôle clé dans le processus de signalisation favorisant la croissance, au même titre que AKT ou les isoformes classiques et nouvelles de PKC (*Phospho Kinase C*), sont des candidats à l'activation de p75^{NTR} via NGF. Nous avons identifié dans notre modèle NIE-115 TCII-Oléosine PP2A comme étant une de ces protéines affectées, et nous avons associé sa surexpression à la perturbation de l'équilibre entre prolifération et différenciation.

Un autre point d'intérêt concerne TNF- α . En effet, le niveau de TNF- α augmente chez l'homme et l'animal déficients en vitamine B12. Dans notre étude cellulaire, l'augmentation de TNF- α est en partie liée à la surexpression de TACE, c'est-à-dire Adam 10 et Adam 17. Nous proposons que, dans les cellules déficientes en B12, l'action combinée de NGF (à partir de proNGF), p75^{NTR}, et TNF- α influencent de manière significative l'équilibre entre prolifération et différenciation des cellules. L'observation de la répression de ERK1/2 dans les neuroblastomes déficients en B12 est en accord avec cette hypothèse.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En raison de la présence permanente de cellules souches ou progénitrices dans des zones spécifiques du cerveau, il est maintenant admis que la réparation spontanée des tissus peut effectivement se produire en réponse à des situations lésionnelles. Toutefois, ce processus n'est pas suffisamment solide pour promouvoir une récupération du système nerveux central capable de pallier l'apparition de troubles cognitifs. Le développement de thérapies cellulaires de remplacement des cellules endommagées constitue, à l'heure actuelle, une alternative (Pluchino et al., 2005). Ceci nécessite la mise au point de modèles cellulaires appropriés pour élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation neuronale, la survie et l'incorporation dans les réseaux neuronaux du cerveau *in situ*.

Les cellules souches embryonnaires et adultes ont généré un domaine de recherche très actif. La compréhension des événements moléculaires contrôlant leur plasticité est essentielle au développement de la médecine régénératrice. L'étude des cellules souches embryonnaires et des cellules progénitrices permet une meilleure compréhension de la biologie du développement humain, mais apporte également un espoir grandissant dans le traitement de neuropathologies. Les thérapies cellulaires faisant appel à ce type de cellules permettraient de repeupler des zones du cerveau en cours de dégénérescence dans des maladies comme Parkinson ou Alzheimer ou encore de réparer la moelle épinière sectionnée. La découverte de cellules souches capables de générer des cellules neuronales nouvellement différenciées a ainsi permis de nouvelles options dans le traitement des neuropathies (Pluchino et al., 2005).

Ainsi, des transplantations de cellules souches nerveuses fœtales humaines dans le SNC lésé de rongeurs ou de primates non humains ont montré des améliorations significatives dans des modèles de maladies telles que l'attaque vasculaire cérébrale (Kelly et al., 2004; Roitberg et al., 2006), la maladie de Parkinson (Liker et al., 2003; Rafuse et al., 2005; Svendsen et al., 1996), la maladie de Huntington (Armstrong et al., 2000; Lee et al., 2005; McBride et al., 2004), les lésions de la moelle épinière (Iwanami et al., 2005; Tarasenko et al., 2007) ou l'épilepsie (Chu et al., 2004). Globalement, les cellules survivent de façon prolongée, migrent spécifiquement en direction des régions cibles, se différencient et établissent des connexions permettant une récupération fonctionnelle partielle.

Ces résultats encourageants doivent cependant être nuancés en vue des applications futures car un grand nombre de paramètres semblent influencer la survie, la migration et/ou la différenciation des cellules lors des transplantations. Parmi ces paramètres, on peut citer la durée d'amplification *in vitro* (Zietlow et al., 2005), le statut des cellules greffées (dissociées ou en

neurosphères), le nombre de cellules utilisées pour la greffe, le site d'injection et l'environnement (et notamment le statut nutritionnel) qui joue un rôle primordial, le délai entre l'initiation de la lésion et la greffe... Cette liste n'est pas exhaustive mais, au sein de celle-ci, l'hétérogénéité cellulaire apparaît clairement comme l'une des causes principales de variabilité. Dans la majorité des travaux cités, les cellules utilisées sont issues de cultures primaires de cerveau fœtal humain amplifiées *in vitro* pendant un temps plus ou moins long et greffées sans modifications préalables. Les populations sont donc constituées d'un mélange hétérogène et variable de cellules immatures, de cellules partiellement engagées dans une voie de différenciation et de cellules matures de lignages différents et/ou de sous-types cellulaires différents. Cet ensemble hétéroclite répond de manière inégale aux signaux environnementaux du SNC.

Des travaux ont en effet démontré que les cellules prédifférenciées répondaient de façon plus efficace que les cellules neuroépithéliales immatures lors de transplantations (Lepore et al., 2004). D'autre part, les cellules restreintes à un lignage particulier survivent mieux, migrent de façon sélective, s'intègrent activement dans le SNC et limitent les effets délétères liés à l'intégration superflue de cellules des autres lignages (Andressen et al., 2001; Han et al., 2002; Hofstetter et al., 2005; Muramatsu et al., 2005).

Des systèmes fondés sur des modèles développementaux ont récemment été élaborés pour orienter le devenir des cellules. Un certain nombre de protocoles a été établi *in vitro* pour engendrer des précurseurs neuronaux plutôt que gliaux, et inversement, à partir de cellules souches embryonnaires (ES), principalement (Brustle et al., 1999; Li et al., 1998; Mujtaba et al., 1999; Okabe et al., 1996). En outre, la différenciation *in vitro* de ces différentes classes de cellules a pu être poussée jusqu'au phénotype terminal. Ainsi, les cellules ES ont été spécialisées en neurones dopaminergiques (Lee et al., 2000), sérotoninergiques (Kim et al., 2002), GABAergiques (Barberi et al., 2003) ou en motoneurones (Wichterle et al., 2002). Le choix d'une lignée homogène de progéniteurs neuronaux se justifie dans le but de s'affranchir de ces contraintes. La lignée H19-7 que nous avons utilisée est issue de l'hippocampe, une structure impliquée dans des fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémoire (Stubley-Weatherly et al., 1996), et connue pour être particulièrement sensible et vulnérable à diverses situations physiopathologiques ou liées à l'environnement, engendrant des déficits cognitifs (Morrison et Hof, 2002 ; Blaise et al., 2007).

Dans notre modèle de progéniteurs, la différenciation neuronale est associée à une perte cellulaire importante par apoptose indépendante de la privation de sérum, qui permettrait l'élimination des cellules en excès ou inadaptées, comme c'est le cas *in vivo* au cours du

développement. Cela se produirait par l'intermédiaire de la voie mitochondriale intrinsèque initiée par ERK 1/2 et faisant intervenir les caspases 9 et 3. Les neurones nouvellement formés expriment des marqueurs de fonctionnalité et établissent des connexions cellulaires quand ils sont ensemencés sur des neurones d'hippocampe en culture primaire. Cela suggère que ces cellules présentent des propriétés leur permettant de se développer et de s'intégrer dans des réseaux neuronaux préexistants, augmentant ainsi de façon notable leur durée de survie. Dans ces circonstances, la culture primaire a été enrichie par environ 20% de neurones fonctionnels, suggérant des mécanismes de protection autocrine/paracrine. En effet, il semblerait que les contacts cellule-cellule soient d'une importance critique, puisque la viabilité des cellules H19-7 n'a pas été améliorée par leur seule mise en contact avec du milieu de culture issu des cultures primaires. De plus, les connexions entre les cellules H19-7 et les neurones des cultures primaires sont clairement mises en évidence par l'immunomarquage des protéines PSD-95 et synaptotagmin I qui suggèrent la présence de synapses fonctionnelles.

La méthylcobalamine, la forme méthylée de la vitamine B12 (cobalamine), est indispensable à l'activation de la méthionine synthase, une enzyme dépendante du cycle des folates et nécessaire à la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine. En effet, elle agit de concert avec le 5-MTHF (méthyle tétra-hydrofolate) pour recycler l'homocystéine en méthionine et prévenir ainsi en partie l'élévation des taux d'homocystéine. La méthionine est, à son tour, nécessaire à la synthèse de la S-adenosylméthionine, un donneur universel de groupements méthyles qui participe de ce fait à de nombreuses réactions de transméthylation impliquées dans les mécanismes épigénétiques. Un défaut de fonctionnement de la méthionine synthase conduit à l'accumulation d'homocystéine dans le sang. (Razin et Kantor, 2005). Il a été rapporté que l'hyperhomocystéinémie augmente la vulnérabilité des neurones au stress oxydant, à l'apoptose et à l'excitotoxicité, via l'activation des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et métabotropes (mGlu) du glutamate et la perturbation de l'homéostasie calcique qui en résulte (Kruman, et al. 2000).

L'expression des enzymes du métabolisme de l'homocystéine est par ailleurs influencée par le stress oxydant. Un taux élevé d'homocystéine a été associé aux maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

Les déficiences en folates ou en B12 sont connues pour affecter les fonctions cérébrales. Des études épidémiologiques et expérimentales ont établi un lien entre déficience en folates et diverses pathologies neurodégénératives, parmi lesquelles les accidents vasculaires cérébraux, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Mattson et Shea, 2003). La carence en acide

folique semble également contribuer à d'autres troubles neurologiques comme la dépression (Clarke et al., 2006 ; Mattson et Shea, 2003).

Outre les risques d'avortement spontané, la carence en folates chez la femme enceinte constitue un facteur de risque de plusieurs malformations congénitales chez le nouveau-né, particulièrement les anomalies de fermeture du tube neural (spina-bifida) (Ray et Blom, 2003). Il est aujourd'hui bien documenté qu'une supplémentation en acide folique pendant la période périconceptionnelle réduit significativement le risque d'anomalie de fermeture du tube neural (Longo et al., 2009). Les personnes âgées constituent également un groupe à risque de déficience en folates, ceci pouvant contribuer aux anémies, aux troubles de la mémoire, du sommeil et du comportement observés. Une telle carence pourrait, de plus, être associée avec un risque plus élevé d'accident vasculaire cérébral, de syndrome cérébelleux, de déclin cognitif dans cette population.

Des études ont révélé que le cerveau en cours de développement est particulièrement vulnérable à une réduction des apports en ces nutriments, mais sa plasticité élevée pourrait faciliter son adaptation, contrairement au cerveau adulte

Plusieurs types de déficience nutritionnelle peuvent avoir des cibles cérébrales communes, rendant difficile l'identification d'une signature spécifique à un nutriment donné, d'où notre intérêt à développer des modèles cellulaires pertinents pour l'étude des conséquences d'un déficit en B12 ou en folates.

Une grande majorité des études s'intéressant aux folates ont rapporté l'existence d'une relation significative entre des taux sanguins bas en cette vitamine et des performances cognitives inférieures à la normale (Blaise et al., 2005). Les taux sanguins de folates et de B12 ont été inversement corrélés à ceux de l'homocystéine. L'accumulation de ce métabolite de la méthionine, engendrant une hyperhomocystéinémie modérée, a des effets multiples aux niveaux cellulaire et moléculaire (stress oxydant, altérations des fonctions vasculaires et de l'expression génique...), qui pourraient jouer un rôle dans le risque de survenue de pathologies neurodégénératives, notamment celles associées au vieillissement.

Les folates sont impliqués dans le développement normal du système nerveux, incluant la neurogenèse et la mort cellulaire programmée (apoptose physiologique). Le devenir des neuroprogeniteurs peut être influencé par divers facteurs, y compris leur microenvironnement, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs et également les éléments nutritifs. Dans notre étude, nous avons montré que la carence en folates, qui induit bien une perturbation du

métabolisme des monocarbones avec une élévation des taux d'homocystéine, affecte considérablement la prolifération, la différenciation et la plasticité des progéniteurs H19-7. Ceci suggère qu'une baisse des folates alimentaires pourrait avoir pour conséquence des modifications de la maturation des neurones de l'hippocampe au cours du développement mais pourrait aussi potentiellement compromettre les greffes de progéniteurs neuronaux *in situ* dans le cadre de thérapies régénératrices. D'autres études ont déjà montré que les folates favorisent la prolifération des progéniteurs (Kruman et al., 2005; Zhang et al., 2008). Ces résultats sont cohérents avec le rôle bien connu des folates comme des nutriments essentiels pour le développement du système nerveux central (Van der Put et al, 2001 ; Ellinson et al., 2004). Une partie des effets neurologiques bénéfiques des folates passerait par la stimulation des cellules souches neurales et la prolifération des progéniteurs.

De nombreuses voies moléculaires régulent le développement du SNC. Ces voies sont activées ou inhibées par différents facteurs extrinsèques et intrinsèques. Parmi ces voies, la voie Notch est apparue comme un mécanisme majeur de signalisation au cours du développement du SNC. (pour revue, voir (Guillemot, 1999)). La voie de signalisation Notch est connue pour contrôler la prolifération et la différenciation des cellules souches et des progéniteurs neuronaux. Il a été rapporté récemment que les folates exerceraient leur influence sur la prolifération cellulaire et la différenciation de cellules souches neuronales au moins en partie par l'activation de cette voie (Zhang et al., 2008). De ce fait, une des perspectives de notre travail serait l'étude de la régulation de la voie Notch dans les progéniteurs neuronaux H19-7 carencés en folate.

S'il est connu qu'une carence en folate diminue la prolifération des neuroprogéniteurs, l'impact sur la différenciation et la plasticité de ces cellules n'avait pas encore été décrit. Nous avons montré que la carence en folate nuit à la différenciation et à la plasticité des progéniteurs hippocampiques, avec un défaut de la croissance et de la mise en place des neurites, conduisant finalement à des dysfonctionnements synaptiques. Ces mécanismes s'accompagnent d'un trouble du transport vésiculaire, mis en évidence par l'accumulation de VGLUT2, de la synapsine 1 et de la synapsine 2 prédominante dans le corps cellulaire plutôt que dans les prolongements neuronaux, suggérant une anomalie dans la formation et la mise en place du cytosquelette des neurites. En effet, des travaux récents ont relié l'hyperhomocystéinémie à une hyperphosphorylation de Tau, une MAP (*Microtubule Associated Protein*) servant à la stabilisation des microtubules, principalement dans les axones, et dont le rôle dans la maladie d'Alzheimer est bien documenté (Lim et al., 2005). De ce fait, il serait intéressant d'étudier dans notre modèle l'atteinte du cytosquelette, les cibles principales touchées par la carence en folate et d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Parmi l'ensemble des thérapies de remplacement cellulaire, c'est la greffe neuronale qui est actuellement utilisée chez les patients souffrant de la maladie de Parkinson (Waldau et Shetty, 2008). Des données récentes indiquent toutefois que les cellules greffées perdent progressivement leur fonctionnalité et finissent par acquérir le phénotype pathologique, suggérant une transmission de la pathologie de l'hôte vers les cellules greffées (Li et al., 2008). Un fait important dans le contexte de nos études, est que les maladies neurodégénératives liées à l'âge ont été associées à de faibles niveaux de folates et à la présence d'une hyperhomocystéinémie.

Conformément à ces observations, nos données suggèrent que, dans le cadre de greffes neuronales, le statut en folates devrait être pris en compte, et éventuellement corrigé pour améliorer la survie cellulaire et la plasticité des greffons.

Par ailleurs, les cellules neuronales H19-7 semblent constituer un bon outil pour les études de thérapie cellulaire chez les rongeurs. Aussi, la prochaine étape consistera à greffer expérimentalement ces progéniteurs neuronaux dans l'hippocampe de rats présentant des lésions de cette structure, comme dans le modèle de carences nutritionnelles décrit par Blaise et al., (2007), et tester le potentiel de récupération fonctionnelle par des études électrophysiologiques et à l'aide de tests neurocomportementaux.

Une autre partie de notre travail a porté sur les conséquences d'une carence en B12 dans un modèle cellulaire expérimental conçu pour identifier les mécanismes moléculaires par lesquels la B12 exerce son influence sur la prolifération et la différenciation neuronale.

Il est avéré que les réserves en vitamines B12 sont élevées et qu'une carence s'installe très lentement. La carence en vitamine B12 est généralement associée à un apport insuffisant, comme dans le cas d'un régime végétarien strict. Contrairement à la carence en vitamine B9, il faut plusieurs mois pour voir apparaître les premiers signes de déficit en cobalamine. La carence en vitamine B12 engendre des effets hématologiques et neurologiques. On observe une asthénie, une anorexie et un amaigrissement. Les signes généraux des anémies s'associent à ceux de la carence en vitamine B12. La macrocytose est le premier signe de carence en vitamine B12, elle apparaît avant l'anémie.

En dehors des apports alimentaires, les pathologies en lien avec la vitamine B12 peuvent être classées en trois catégories : les défauts d'absorption (Maladie de Biermer, ou anémie pernicieuse congénitale, pathologie auto-immune), (pour revue Thauvin-robinet et Rose, 2007), de transport (déficit héréditaire en facteur intrinsèque, FI, ou anémie pernicieuse congénitale) et

d'utilisation de la vitamine (le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck, ou anémie congénitale mégalo-blastique. Cette maladie est due à une anomalie du récepteur du complexe FI-B12) (Whitehead, 2006).

Le déficit en B12 est caractérisé par un taux d'hémoglobine faible. Ceci s'explique par un trouble de l'hématopoïèse, la vitamine B12 étant indispensable à la synthèse de l'ADN. D'autres répercussions peuvent être engendrées par une carence en vitamine B12, comme des atteintes neurologiques, en lien avec des défauts de myélinisation. En effet, la formation de la myéline est en partie dépendante de la vitamine B12. Des déficiences en cette dernière conduisent à des lésions nerveuses, à des pertes de mémoire, des problèmes de coordination, et une baisse des facultés intellectuelles. La méthylcobalamine est la forme de vitamine B12 préférentiellement utilisée par les gaines de myéline.

La carence en B12 entraîne une anomalie du métabolisme des folates. En effet, le blocage de la méthionine synthase (enzyme B12-dépendante) cause l'accumulation de 5-MTHF non métabolisable par les cellules, entraînant une déficience indirecte en folates.

Bien qu'une majorité des études soit en faveur d'une relation entre folates, homocystéine, à un degré moindre la vitamine B12, et le risque de maladies neurodégénératives, il est encore difficile d'affirmer la causalité de cette relation. Aussi, la mise en place d'un modèle cellulaire de déficience sévère en vitamine B12, tel que le nôtre, peut constituer un premier élément de réponse. Ce modèle ne semble toutefois pas être totalement adapté pour évaluer l'ensemble des effets de la vitamine B12 sur les cellules de neuroblastome murin NIE-115 totalement différenciés, car lorsqu'elles atteignent le statut différencié, les cellules se détachent et meurent.

Les cellules OT et les cellules sauvages (WT) prolifèrent à une vitesse beaucoup plus élevée que les cellules TO (déficientes en B12), alors que la croissance des neurites et l'expression de PSD-95 sont significativement plus élevées dans les cellules TO que dans les WT ou les cellules OT. Seules les cellules OT pourraient être considérées comme un contrôle de validité des cellules pour l'étude mécanistique de la carence en vitamine B12, car elles ont été cultivées dans les mêmes conditions que les TO en présence de G418.

Prises ensemble, les données sous-entendent que la carence en B12 réduit la prolifération et induit la différenciation des cellules TO. Nous avons associé ces mécanismes à une inhibition de la voie des MAPK/ERK1/2 régulée par PP2Ac, comme précédemment rapporté *in vitro* sur des cellules *knock-out* de la Drosophile Schneider (Zhou et al., 2002 ; Silverstein et al., 2002). Dans notre modèle, la déficience du métabolisme cellulaire de la vitamine B12 engendre des effets sur la progression du cycle cellulaire et la différenciation des cellules NIE-115 au travers des interactions avec des voies de signalisation liées à l'expression accrue de la PP2A, proNGF et TACE.

Les maladies neurodégénératives constituent un grave problème de santé publique. En effet le nombre de patients atteints ne cesse de croître alors que peu de thérapies efficaces sont disponibles. L'accroissement du nombre de malades est lié à l'allongement de l'espérance de vie. Les progrès réalisés dans les domaines de la biologie moléculaire, de l'imagerie cellulaire et de la bioinformatique ont permis de développer de nombreux modèles animaux pertinents afin de mieux appréhender les mécanismes.

L'implication de l'homocystéine, de la vitamine B12 et des folates dans les maladies neurodégénératives suggère que la participation des vitamines du groupe B dans le métabolisme des monocarbones joue un rôle essentiel dans la physiopathologie du système nerveux. L'ensemble de nos travaux montre qu'une altération du métabolisme des monocarbones réprime la neurogenèse et induit des troubles de la différenciation neuronale. Ceci suggère l'existence de mécanismes précis par lesquels les déficits en folates, en vitamine B12 et/ou l'homocystéine peuvent affecter le fonctionnement du cerveau et sa plasticité.

Il serait intéressant d'étudier ces mécanismes dans nos différents modèles cellulaires à l'aide d'approches utilisant l'imagerie calcique et les techniques d'électrophysiologie. Il serait également judicieux d'étendre ces travaux à des modèles *in vivo*, en particulier le modèle de rats nés de mère carencée en précurseurs de méthyles qui a été développé au Laboratoire (Blaise et al., 2005). Dans ce modèle, les jeunes rats développent une hyperhomocystéinémie modérée qui reflète bien les conséquences cliniques d'une carence maternelle. Ils présentent un retard du développement fonctionnel cérébral illustré par des tests d'évaluation neurocomportementale, associé à une prise de poids moindre par rapport aux animaux non carencés. D'autre part, l'hyperhomocystéinémie qui résulte de la carence apparaît corrélée à une diminution de l'activité de la méthionine synthase et à une altération globale du métabolisme des monocarbones (Blaise et al. 2007).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramova N, Charniga C, Goderie SK, Temple S (2005) Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells. *Dev Biol* 283:269-281.
- Ayav A, Alberto JM, Barbe F, Brunaud L, Gerard P, Merten M, Gueant JL. Defective remethylation of homocysteine is related to decreased synthesis of coenzymes B2 in thyroidectomized rats. *Amino Acids*. 2005 Feb;28(1):37-43.
- Adinolfi LE, Ingrosso D, Cesaro G, Cimmino A, D'Anto M, Capasso R, Zappia V, Ruggiero G (2005) Hyperhomocysteinemia and the MTHFR C677T polymorphism promote steatosis and fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 41:995-1003.
- Allen RH, Seetharam B, Podell E, Alpers DH (1978) Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 61:47-54.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287-293.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41:683-686.
- Amano T, Richelson E, Nirenberg M (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:258-263.
- Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, 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.
- Anello G, Gueant-Rodriguez RM, Bosco P, Gueant JL, Romano A, Namour B, Spada R, Caraci F, Pourie G, Daval JL, Ferri R (2004) Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 15:859-861.
- Araki A, Sako Y, Ito H (1993) Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis* 103:149-157.
- Armstrong RJ, Watts C, Svendsen CN, Dunnett SB, Rosser AE (2000) Survival, neuronal differentiation, and fiber outgrowth of propagated human neural precursor grafts in an animal model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 9:55-64.
- Bailey LB, Gregory JF, 3rd (1999) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129:919-922.
- Barak AJ, Beckenhauer HC (1988) The influence of ethanol on hepatic transmethylation. *Alcohol Alcohol* 23:73-77.
- Barak AJ, Tuma DJ, Beckenhauer HC (1985) Ethanol, the choline requirement, methylation and liver injury. *Life Sci* 37:789-791.
- Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 21:1200-1207
- Barrett GL, Georgiou A (1996) The low-affinity nerve growth factor receptor p75NGFR mediates death of PC12 cells after nerve growth factor withdrawal. *J Neurosci Res* 45:117-128.
- Baumbach GL, Sigmund CD, Bottiglieri T, Lentz SR. Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Circ Res*. 2002 Nov 15;91(10):931-7
- Beck WS, Ochoa S (1958) Metabolism of propionic acid in animal tissues. IV. Further studies on the enzymatic isomerization of methylmalonyl coenzyme A. *J Biol Chem* 232:931-938.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2:469-475.
- Begum N, Ragolia L (1996) cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 271:31166-31171.

- Begum N, Ragolia L (1999) Role of janus kinase-2 in insulin-mediated phosphorylation and inactivation of protein phosphatase-2A and its impact on upstream insulin signalling components. *Biochem J* 344 Pt 3:895-901.
- Benson RE, Rappazzo ME, Hall CA (1972) Late transport of vitamin B 12 by transcobalamin II. *J Lab Clin Med* 80:488-495.
- Beutler B, Cerami A (1988) Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem* 57:505-518.
- Ben-Ari Y (1992) Effects of anoxia and aglycemia on the adult and immature hippocampus. *Biol Neonate* 62:225-230.
- Bhardwaj A, Aggarwal BB (2003) Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* 23:317-332.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33:2643-2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38:3751-3757.
- Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL, Daval JL (2005) Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* 57:777-782.
- Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170:667-679.
- Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G (2001) Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem* 47:1102-1104.
- Bloom J, Cross FR (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:149-160.
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11:529-541.
- Boison D, Scheurer L, Zumsteg V, Rulicke T, Litynski P, Fowler B, Brandner S, Mohler H (2002) Neonatal hepatic steatosis by disruption of the adenosine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6985-6990.
- Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39:615-647.
- Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL (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 RM, Anello G, Spada R, Romano A, Fajardo A, Caraci F, Ferri R, Gueant JL (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.
- Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 17:37-49.
- Brattstrom L, Zhang Y, Hurtig M, Refsum H, Ostensson S, Fransson L, Jones K, Landgren F, Brudin L, Ueland PM (1998) A common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and longevity. *Atherosclerosis* 141:315-319.
- Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro RC, Graves V, Yoder M, Wagner J, Vadhan-Raj S, Benninger L, Rubinstein P, et al. (1992) Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4109-4113.
- Brunaud L, Alberto JM, Ayav A, Gerard P, Namour F, Antunes L, Braun M, Bronowicki JP, Bresler L, Gueant JL (2003) Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion* 68:133-140.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285:754-756.

- Buchet D, Buc-Caron MH, Sabate O, Lachapelle F, Mallet J (2002) Long-term fate of human telencephalic progenitor cells grafted into the adult mouse brain: effects of previous amplification in vitro. *J Neurosci Res* 68:276-283.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501.
- Burgering BM, Coffey PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376:599-602.
- Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I (1992) Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 326:69-70.
- Butz LW, du Vigneaud V. The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *J Biol Chem* 1932; 99: 135-42.
- Chanarin I, Deacon R, Lumb M, Perry J. Cobalamin-folate interaction. *Blood Rev* 1990;3: 211-215
- Cain K, Bratton SB, Cohen GM (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84:203-214.
- Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, Cohen GM (2001) Physiological concentrations of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem* 276:41985-41990.
- Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN (2001) Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19:475-479.
- Campbell NR. How safe are folic acid supplements? *Arch Intern Med.* 1996;156(15):1638-44.
- Clarke R (2006) Vitamin B12, folic acid, and the prevention of dementia. *N Engl J Med* 354:2817-2819.
- Cantley LC, Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4240-4245.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
- Carriere A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Penicaud L, Casteilla L (2006) [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Med Sci (Paris)* 22:47-53.
- Carson NA, Neill DW (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 37:505-513.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
- Cattaneo E, McKay R (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347:762-765.
- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY (2000) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet* 66:347-355.
- Chandar N, Lombardi B (1988) Liver cell proliferation and incidence of hepatocellular carcinomas in rats fed consecutively a choline-devoid and a choline-supplemented diet. *Carcinogenesis* 9:259-263.
- Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA, Hernan MA, Logroscino G, Willett WC, Ascherio A (2004) Folate intake and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 160:368-375.
- Chen HP, Marsh EN (1997) How enzymes control the reactivity of adenosylcobalamin: effect on coenzyme binding and catalysis of mutations in the conserved histidine-aspartate pair of glutamate mutase. *Biochemistry* 36:7884-7889.
- Chen Z, Chakraborty S, Banerjee R (1995) Demonstration that mammalian methionine synthases are predominantly cobalamin-loaded. *J Biol Chem* 270:19246-19249.
- Chen J, Martin BL, Brautigan DL (1992) Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 257:1261-1264.
- Chen Z, Karaplis AC, Ackerman SL, Pogribny IP, Melnyk S, Lussier-Cacan S, Chen MF, Pai A, John SW, Smith RS, Bottiglieri T, Bagley P, Selhub J, Rudnicki MA, James SJ, Rozen R (2001) Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition. *Hum Mol Genet* 10:433-443.

- Chou MM, Blenis J (1995) The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. *Curr Opin Cell Biol* 7:806-814.
- Chu K, Kim M, Chae SH, Jeong SW, Kang KS, Jung KH, Kim J, Kim YJ, Kang L, Kim SU, Yoon BW (2004) Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 50:459-465.
- Cotrina ML, Gonzalez-Hoyuela M, Barbas JA, Rodriguez-Tebar A (2000) Programmed cell death in the developing somites is promoted by nerve growth factor via its p75(NTR) receptor. *Dev Biol* 228:326-336.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D (1996) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16:2649-2658.
- Cravo ML, Camilo ME (2000) Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status. *Nutrition* 16:296-302.
- Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira FC (1996) Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 63:220-224.
- da Costa KA, Gaffney CE, Fischer LM, Zeisel SH (2005) Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *Am J Clin Nutr* 81:440-444.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.
- Davis AA, Temple S (1994) A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372:263-266.
- de Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D (2001) Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr* 73:1027-1033.
- De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ (2002) Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 54:599-618.
- Deacon TW, Pakzaban P, 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.
- Dealtry GB, Naylor MS, Fiers W, Balkwill FR (1987) DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-gamma. *Eur J Immunol* 17:689-693.
- Debatin KM, Krammer PH (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23:2950-2966.
- DeFronzo RA (1992) Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 11:S1-16.
- Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, van Geijn HP (1995) Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 173:1042-1048.
- Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267:682-685.
- De Vries JIP, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BME, van Geijn HP. Hyperhomocysteinemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynecol* 1997;104:1248-54
- Dicker-Brown A, Fonseca VA, Fink LM, Kern PA (2001) The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine-beta-synthase: studies in hepatocytes. *Atherosclerosis* 158:297-301.
- Du K, Montminy M (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273:32377-32379.
- Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman, II, Cadet JL, Mattson MP (2002) Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 80:101-110.

- Edlund T, Jessell TM (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-224.
- Eichholzer M, Luthy J, Moser U, Stahelin HB, Gutzwiller F (2002) [Safety aspects of folic acid for the general population]. *Praxis (Bern 1994)* 91:7-16.
- Ellinson M, Thomas J, 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; quiz 385-377.
- Ernfors P, Hallbook F, Ebendal T, Shooter EM, Radeke MJ, Misko TP, Persson H (1988) Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron* 1:983-996.
- Fernandez LL, Scheibe RM. Is MTHFR polymorphism a risk factor for Alzheimer's disease like APOE? *Arq Neuropsiquiatr*. 2005 Mar;63(1):1-6.
- Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:S40-44.
- Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY (1998) Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 16:1033-1039.
- Fonseca VA, Mudaliar S, Schmidt B, Fink LM, Kern PA, Henry RR (1998) Plasma homocysteine concentrations are regulated by acute hyperinsulinemia in nondiabetic but not type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 47:686-689.
- Fonseca VA, Risk factors for coronary heart disease in diabetes. *Ann Intern Med*. 2000 Jul 18;133(2):154-6.
- Fonseca VA, Fink LM, Kern PA. Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. *Atherosclerosis*. 2003 Mar;167(1):105-9
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13:225-238.
- Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-1314.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-668.
- Freeman MR, Doe CQ (2001) Asymmetric Prospero localization is required to generate mixed neuronal/glial lineages in the Drosophila CNS. *Development* 128:4103-4112.
- Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates MA, Bjorklund A (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* 19:5990-6005.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113.
- Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM (1993) Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 13:1327-1333.
- Fundin BT, Mikaelis A, Westphal H, Ernfors P (1999) A rapid and dynamic regulation of GDNF-family ligands and receptors correlate with the developmental dependency of cutaneous sensory innervation. *Development* 126:2597-2610.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11879-11883.
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J (1998) Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* 36:249-266.
- Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D (2000) Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther* 85:207-215.
- Gao T, Furnari F, Newton AC (2005) PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18:13-24.

- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Gartel AL, Tyner AL (2002) The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1:639-649.
- Gaustadnes M, Rudiger N, Rasmussen K, Ingerslev J (2000) Familial thrombophilia associated with homozygosity for the cystathionine beta-synthase 833T-->C mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1392-1395.
- Germain M, Shore GC (2003) Cellular distribution of Bcl-2 family proteins. *Sci STKE* 2003:pe10.
- Ghosh S, Karin M (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
- Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS, 3rd, Evans DR (2000) Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 403:328-332.
- Gredinger E, Gerber AN, Tamir Y, Tapscott SJ, Bengal E (1998) Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem* 273:10436-10444.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Groenen PM, van Rooij IA, Peer PG, Gooskens RH, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2004) Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 191:11-17.
- Gueant JL, Champigneulle B, Gaucher P, Nicolas JP (1990) Malabsorption of vitamin B12 in pancreatic insufficiency of the adult and of the child. *Pancreas* 5:559-567.
- Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E, Gueant JL (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 RM, Rendeli C, Namour B, Venuti L, Romano A, Anello G, Bosco P, Debard R, Gerard P, Viola M, Salvaggio E, Gueant JL (2003) Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neurosci Lett* 344:189-192.
- Guilland JC, Lequeu B. Les vitamines: Du nutriment au médicament. *EM internationales*. Paris. 1992. p357
- Guillemot F (1999) Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Exp Cell Res* 253:357-364.
- Hainaut P, Hollstein M (2000) p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77:81-137.
- Hajnoczky G, Davies E, Madesh M (2003) Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:445-454.
- Hakami N, Neiman PE, Canellos GP, Lazerson J (1971) Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings. *N Engl J Med* 285:1163-1170.
- Hao L, Ma J, Zhu J, Stampfer MJ, Tian Y, Willett WC, Li Z. High prevalence of hyperhomocysteinemia in Chinese adults is associated with low folate, vitamin B12, and vitamin B6 status. *J Nutr* 2007, 137: 407-13.
- Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, Scott JD, Korsmeyer SJ (1999) Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 3:413-422.
- Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T.
- Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis*. 2003;14(1):32-42
- Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2005 Jun 15;80(6):869-76.
- Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M (2003) Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8:847-856.
- Hayman MW, Christie VB, Keating TS, Przyborski SA (2006) Following the differentiation of human pluripotent stem cells by proteomic identification of biomarkers. *Stem Cells Dev* 15:221-231.
- Heider I, Lehmensiek V, Lenk T, Muller T, Storch A (2004) Dopaminergic neurotoxicity of homocysteine and its derivatives in primary mesencephalic cultures. *J Neural Transm Suppl*:1-13.

- Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL (1999) Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem* 274:5654-5658.
- Ho EC, Dunn C, Proops D, Warfield A (2003) Case report: explantation of a cochlear implant secondary to chronic granulating labyrinthitis. *Cochlear Implants Int* 4:191-195.
- Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D, Rogers E, Shea TB (2001) Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress. *J Neurochem* 78:249-253.
- Hoffman DR, Marion DW, Cornatzer WE, Duerre JA. S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine, L-homocystein, and adenosine *J Biol Chem*. 1980;255(22):10822-7
- Hofstetter CP, Holmstrom NA, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisen J, Olson L (2005) Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* 8:346-353.
- Hogenkamp HP (1968) Enzymatic reactions involving corrinoids. *Annu Rev Biochem* 37:225-245.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339-341.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109:1125-1131.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV (1995) The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504.
- Huang G, Dragan M, Freeman D, Wilson JX (2005) Activation of catechol-O-methyltransferase in astrocytes stimulates homocysteine synthesis and export to neurons. *Glia* 51:47-55.
- Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ (2001) Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* 68:2799-2811.
- Huber G, Matus A (1984) Immunocytochemical localization of microtubule-associated protein 1 in rat cerebellum using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 98:777-781.
- Hughes AL, Messineo-Jones D, Lad SP, Neet KE (2001) Distinction between differentiation, cell cycle, and apoptosis signals in PC12 cells by the nerve growth factor mutant delta9/13, which is selective for the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci Res* 63:10-19.
- Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A (1993) Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17:687-689.
- Hunter R, Barnes J, Oakeley HF, Matthews DM (1970) Toxicity of folic acid given in pharmacological doses to healthy volunteers. *Lancet* 1:61-63.
- Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J (2000) Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 46:1065-1071.
- Ihrie RA, Alvarez-Buylla A (2008) Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331:179-191.
- Itoh K, Brackenbury R, Akeson RA (1995) Induction of L1 mRNA in PC12 cells by NGF is modulated by cell-cell contact and does not require the high-affinity NGF receptor. *J Neurosci* 15:2504-2512.
- Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, Kanemura Y, Mori H, Kobayashi S, Yamasaki M, Momoshima S, Ishii H, Ando K, Tanioka Y, Tamaoki N, Nomura T, Toyama Y, Okano H (2005) Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80:182-190.
- Jacobsen DW (2000) Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1182-1184.
- Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J (2001) Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 73:613-621.
- 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 (2006) Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 136:1741S-1749S.

- Janosik M, Kery V, Gaustadnes M, Maclean KN, Kraus JP (2001) Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region. *Biochemistry* 40:10625-10633.
- Ji C, Kaplowitz N (2003) Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 124:1488-1499.
- Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X (2003) Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science* 299:223-226.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10:3129-3140.
- Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 160:53-64.
- Kazama H, Yonehara S (2000) Oncogenic K-Ras and basic fibroblast growth factor prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 148:557-566.
- Keating JN, Kusano G, Stokstad EL (1988) Effect of thiouracil in modifying folate function in severe vitamin B12 deficiency. *Arch Biochem Biophys* 267:119-124.
- Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK (2004) Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11839-11844.
- Kenyon SH, Nicolaou A, Gibbons WA (1998) The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro. *Alcohol* 15:305-309.
- Khursigara G, Bertin J, Yano H, Moffett H, DiStefano PS, Chao MV (2001) A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J Neurosci* 21:5854-5863.
- Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418:50-56.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015.
- Kim YI, Hayek M, Mason JB, Meydani SN (2002a) Severe folate deficiency impairs natural killer cell-mediated cytotoxicity in rats. *J Nutr* 132:1361-1367.
- Klein C, Fishell G (2004) Neural stem cells: progenitors or panacea? *Dev Neurosci* 26:82-92.
- Kolhouse JF, Allen RH (1977) Recognition of two intracellular cobalamin binding proteins and their identification as methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:921-925.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocke MC, West CE, van der Horst CM, Steegers-Theunissen RP (2004) Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr* 134:3106-3113.
- Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513-519.
- Kruman, II, Mouton PR, Emokpae R, Jr., Cutler RG, Mattson MP (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* 16:1055-1059.
- Kruman, II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1752-1762.
- Kruman, II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20:6920-6926.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH (1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.

- Kulich SM, Chu CT (2003) Role of reactive oxygen species in extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation and 6-hydroxydopamine cytotoxicity. *J Biosci* 28:83-89.
- Kutzbach C, Stokstad EL (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* 250:459-477.
- LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11:847-862.
- Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271:20608-20616.
- Leal NA, Olteanu H, Banerjee R, Bobik TA (2004) Human ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase and its interaction with methionine synthase reductase. *J Biol Chem* 279:47536-47542.
- Leblhuber F, Walli J, Widner B, Artner-Dworzak E, Fuchs D, Vrecko K (2001) Homocysteine and B vitamins in dementia. *Am J Clin Nutr* 73:127-128.
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18:675-679.
- Lee ST, Chu K, Park JE, Lee K, Kang L, Kim SU, Kim M (2005) Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. *Neurosci Res* 52:243-249.
- Leeda M, Riyazi N, de Vries JI, Jakobs C, van Geijn HP, Dekker GA (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.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341:149-152.
- Lentz SR. Homocysteine and cardiovascular physiology In *Homocysteine in Health and Disease* Carmel R, Jacobsen DW. Eds 2001 Cambridge, UK: Cambridge University Press
- Lepore AC, Han SS, Tyler-Polsz CJ, Cai J, Rao MS, Fischer I (2004) Differential fate of multipotent and lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult CNS. *Neuron Glia Biol* 1:113-126.
- Levi-Montalcini R (1966) The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect* 60:217-259.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
- Ley R, Balmanno K, Hadfield K, Weston C, Cook SJ (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J Biol Chem* 278:18811-18816.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehnrcrona S, Bjorklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14:501-503.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.
- Li L, Bhatia M, Moore PK (2006) Hydrogen sulphide--a novel mediator of inflammation? *Curr Opin Pharmacol* 6:125-129.
- Li Z, Sheng M (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:833-841.
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.
- Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB (1998) Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J* 12:871-880.
- Lillien L (1998) Neural progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol* 8:37-44.
- Lim J, Lu KP (2005) Pinning down phosphorylated tau and tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:311-322.

- Lin XH, Walter J, Scheidtmann K, Ohst K, Newport J, Walter G (1998) Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14693-14698.
- Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH (1995) Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. 1988. *Nutrition* 11:181; discussion 180, 182.
- Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH (1990) Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 34:99-107.
- Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH (1988) Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 318:1720-1728.
- Linnell JC, Wilson MJ, Mikol YB, Poirier LA. Tissue distribution of methylcobalamin in rats fed amino acid-defined, methyl-deficient diets. *J Nutr.* 1983 Jan;113(1):124-30
- Liu XX, Wilson K, Charlton CG (2000) Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life Sci* 66:2277-2288.
- Liker MA, Petzinger GM, Nixon K, McNeill T, Jakowec MW (2003) Human neural stem cell transplantation in the MPTP-lesioned mouse. *Brain Res* 971:168-177.
- Lojda Z, Kraml J (1971) Indigogenic methods for glycosidases. 3. An improved method with 4-Cl-5-Br-3-indolyl-beta-D-fucoside and its application in studies of enzymes in the intestine, kidney and other tissues. *Histochemie* 25:195-207.
- Longo B, Forinash AB, Murphy JA (2009) Levetiracetam Use in Pregnancy (October). *Ann Pharmacother.*
- Lovblad K, Ramelli G, Remonda L, Nirkko AC, Ozdoba C, Schroth G (1997) Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol* 27:155-158.
- Lu SC, Alvarez L, Huang ZZ, Chen L, An W, Corrales FJ, Avila MA, Kanel G, Mato JM (2001) Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5560-5565.
- Luciano F, Jacquet A, Colosetti P, Herrant M, Cagnol S, Pages G, Auburger P (2003) Phosphorylation of Bim-EL by Erk1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22:6785-6793.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- Mangum JH, Murray BK, North JA (1969) Vitamin B 12 dependent methionine biosynthesis in cultured mammalian cells. *Biochemistry* 8:3496-3499.
- Mann NJ, Li D, Sinclair AJ, Dudman NP, Guo XW, Elsworth GR, Wilson AK, Kelly FD (1999) The effect of diet on plasma homocysteine concentrations in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr* 53:895-899.
- Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA (1997) S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 73:265-280.
- Matthay KK (1998) Stage 4S neuroblastoma: what makes it special? *J Clin Oncol* 16:2003-2006.
- Matthews PM (2001) Editorial commentary to Narayanan et al. Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* 248:987.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34:807-820.
- Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26:137-146.
- McBride JL, Behrstock SP, Chen EY, Jakel RJ, Siegel I, Svendsen CN, Kordower JH (2004) Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol* 475:211-219.
- McConnell SK (1995) Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15:761-768.

- McCully KS, Wilson RB (1975) Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 22:215-227.
- McKay R (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276:66-71.
- McKinley MC, McNulty H, McPartlin J, Strain JJ, Scott JM. Effect of riboflavin supplementation on plasma homocysteine in elderly people with low riboflavin status. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Sep;56(9):850-6.
- Mellman IS, Youngdahl-Turner P, Willard HF, Rosenberg LE (1977) Intracellular binding of radioactive hydroxocobalamin to cobalamin-dependent apoenzymes in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:916-920.
- Menezes JR, Luskin MB (1994) Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *J Neurosci* 14:5399-5416.
- Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R (2002) Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 100:718-720.
- Mione MC, Cavanagh JF, Harris B, Parnavelas JG (1997) Cell fate specification and symmetrical/asymmetrical divisions in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 17:2018-2029.
- Monick MM, Cameron K, Staber J, Powers LS, Yarovinsky TO, Koland JG, Hunninghake GW (2005) Activation of the epidermal growth factor receptor by respiratory syncytial virus results in increased inflammation and delayed apoptosis. *J Biol Chem* 280:2147-2158.
- Monti-Graziadei GA, Margolis FL, Harding JW, Graziadei PP (1977) Immunocytochemistry of the olfactory marker protein. *J Histochem Cytochem* 25:1311-1316.
- Morales A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Mari M, Colell A, Ardite E, Fernandez-Checa JC (1997) Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* 272:30371-30379. Morrison JH, Hof PR (2002) Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 136:467-486.
- Morgan MW (1988) Vision through my aging eyes. *J Am Optom Assoc* 59:278-280.
- Morrison SJ, Prowse KR, Ho P, Weissman IL (1996) Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* 5:207-216.
- Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, Deppert W (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J* 14:4442-4449.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1704-1706.
- Mukai J, Hachiya T, Shoji-Hoshino S, Kimura MT, Nadano D, Suvanto P, Hanaoka T, Li Y, Irie S, Greene LA, Sato TA (2000) NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR. *J Biol Chem* 275:17566-17570.
- Muller T, Renger K, Kuhn W (2004) Levodopa-associated increase of homocysteine levels and sural axonal neurodegeneration. *Arch Neurol* 61:657-660.
- Munshi MN, Stone A, Fink L, Fonseca V (1996) Hyperhomocysteinemia following a methionine load in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and macrovascular disease. *Metabolism* 45:133-135.
- Muramatsu D, Sato Y, Hishiyama S, Miyamoto Y, Hisatsune T (2005) Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex. *Exp Neurol* 194:1-11.
- Najib S, Sanchez-Margalet V (2005) Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and protein synthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK), glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol* 34:119-126.
- Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H (2004) Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 279:52961-52969.
- Namiki J, Tator CH (1999) Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:489-498.
- Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, 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.

- Namour F, Helfer AC, Quadros EV, Alberto JM, Bibi HM, Orning L, Rosenblatt DS, Jean-Louis G (2003) Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *Br J Haematol* 123:915-920.
- Nedrebo BG, Ericsson UB, Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Aakvaag A, Aanderud S, Lien EA (1998) Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients. *Metabolism* 47:89-93.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112:481-490.
- Nguyen TT, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM (1997) Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* 112:783-791.
- Nishino H, Hida H, Takei N, Kumazaki M, Nakajima K, Baba H (2000) Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol* 164:209-214.
- Nishiyama M, Kato Y, Hashimoto M, Yukawa S, 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.
- Ogier H, Munnich A, Saudubray J-M (1986) Cobalamine. In: *Les vitamines : aspects métaboliques, génétiques, nutritionnels et thérapeutiques.*, Masson Edition, p 421. Paris.
- Ohyu J, Yamanouchi H, Takashima S (1997) Immunohistochemical study of microtubule-associated protein 5 (MAP5) expression in the developing human brain. *Brain Dev* 19:541-546.
- Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama Y (2003) Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol* 14:191-198.
- O'Keefe JH, Jr., Lavie CJ, Jr., McCallister BD (1995) Insights into the pathogenesis and prevention of coronary artery disease. *Mayo Clin Proc* 70:69-79.
- Olney JW, Fuller TA, de Gubareff T (1981) Kainate-like neurotoxicity of folates. *Nature* 292:165-167.
- Oltean S, Banerjee R (2003) Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 278:20778-20784.
- Rodriguez J, Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13:3179-3184.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 20:252-258.
- Outinen PA, Sood SK, Pfeifer SI, Pamidi S, Podor TJ, Li J, Weitz JI, Austin RC (1999) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood* 94:959-967.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH (1999) Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 19:8487-8497.
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19:4310-4322.
- Pei JJ, Braak H, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (2002) Up-regulation of cell division cycle (cdc) 2 kinase in neurons with early stage Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol* 104:369-376.
- Peter ME (2004) The flip side of FLIP. *Biochem J* 382:e1-3.
- Peter ME, Krammer PH (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 10:26-35.
- Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Aglietta M (1998) Differential growth factor requirement of primitive cord blood hematopoietic stem cell for self-renewal and amplification vs proliferation and differentiation. *Leukemia* 12:718-727.
- Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, Martino G (2005) Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 48:211-219.

- Poirier LA, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, Delongchamp RR, Fonseca VA (2001) Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism* 50:1014-1018.
- Pons L., Caractérisation d'une isoforme de haute masse moléculaire d'oléosine d'arachide et l'utilisation dans la préparation d'une protéine chimère recombinante à ancrage membranaire, 152 p, Th., Génie biologique et médicale, Faculté de médecine de Nancy, 2000
- Puri PL, Wu Z, Zhang P, Wood LD, Bhakta KS, Han J, Feramisco JR, Karin M, Wang JY (2000) Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev* 14:574-584.
- Purves D, Shimpi A, Lotto RB (1999) An empirical explanation of the cornsweet effect. *J Neurosci* 19:8542-8551.
- Puthalakath H, Strasser A (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9:505-512.
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.
- Rafuse VF, Soundararajan P, Leopold C, Robertson HA (2005) Neuroprotective properties of cultured neural progenitor cells are associated with the production of sonic hedgehog. *Neuroscience* 131:899-916.
- Rajan P, McKay RD (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18:3620-3629.
- Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR (1997) Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 90:168-171.
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276:33869-33874.
- Ratter F, Gassner C, Shatrov V, Lehmann V (1999) Modulation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity by changes of the cellular methylation state: mechanism and in vivo relevance. *Int Immunol* 11:519-527.
- Raught B, Gingras AC (1999) eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 31:43-57.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192:131-137.
- Ravi RK, Thiagalingam A, Weber E, McMahon M, Nelkin BD, Mabry M (1999) Raf-1 causes growth suppression and alteration of neuroendocrine markers in DMS53 human small-cell lung cancer cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:543-549.
- Ray LB, Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1502-1506.
- Razin A, Kantor B (2005) DNA methylation in epigenetic control of gene expression. *Prog Mol Subcell Biol* 38:151-167.
- Reske-Nielsen E, Oster S, Reintoft I (1987) Astrocytes in the prenatal central nervous system. From 5th to 28th week of gestation. An immunohistochemical study on paraffin-embedded material. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 95:339-346.
- Reynisdottir S, Eriksson M, Angelin B, Arner P (1995) Impaired activation of adipocyte lipolysis in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 95:2161-2169.
- Richens A (1971) Toxicity of folic acid. *Lancet* 1:912.
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:897-907.
- Robert K, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, Delabar JM, Janel N (2005) Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 128:1405-1415.
- Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK (1989) Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 161:1200-1204.
- Rodgers GM, Kane WH (1986) Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 77:1909-1916.

- Rodgers RJ, Johnson NJ (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 52:297-303.
- Roitberg BZ, Mangubat E, Chen EY, Sugaya K, Thulborn KR, Kordower JH, Pawar A, Konecny T, Emborg ME (2006) Survival and early differentiation of human neural stem cells transplanted in a nonhuman primate model of stroke. *J Neurosurg* 105:96-102.
- Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levison SW (2004) Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol* 74:77-99.
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401:86-90.
- Rossi F, Cattaneo E (2002) Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 3:401-409.
- Roybon L, Christophersen NS, Brundin P, Li JY (2004) Stem cell therapy for Parkinson's disease: where do we stand? *Cell Tissue Res* 318:261-273.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14:20-28.
- Rytomaa M, Lehmann K, Downward J (2000) Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene* 19:4461-4468.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2:476-483.
- Samejima K, Tone S, Earnshaw WC (2001) CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* 276:45427-45432.
- Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO, McKay RD (2001) In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res* 65:284-288.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675-1687.
- Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GH, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H, et al. (1990) Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61:361-370.
- Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253-262.
- Schubert J, Krost B (2006) [Prevention of cleft lip and palate. Reducing risk of recurrence--a 25-year clinical experience]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10:301-305.
- Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J (2001) Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev* 15:981-994.
- Schwahn BC, Chen Z, Laryea MD, Wendel U, Lussier-Cacan S, Genest J, Jr., Mar MH, Zeisel SH, Castro C, Garrow T, Rozen R (2003) Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB J* 17:512-514.
- Scott JM (1992) Folate-vitamin B12 interrelationships in the central nervous system. *Proc Nutr Soc* 51:219-224.
- Scott JM, Weir DG (1998) Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 5:223-227.
- Schwan BC, Wendel U, Lussier-Cacan S, Mar MH, Zeisel SH, Leclerc D, Castro C, Garrow TA, Rozen R. Effects of betaine in a murine model of mild cystathionine-beta-synthase deficiency. *Metabolism*. 2004 May;53(5):594-9.
- Seetharam B, Alpers DH (1982) Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr* 2:343-369.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Shane B, Watson JE, Stokstad EL (1977) Uptake and metabolism of [3H]folate by normal and by vitamin B-12- and methionine-deficient rats. *Biochim Biophys Acta* 497:241-252.
- She QB, Chen N, Dong Z (2000) ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* 275:20444-20449.

- Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91:325-334.
- Shimamura A, Ballif BA, Richards SA, Blenis J (2000) Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. *Curr Biol* 10:127-135.
- Sibai BM (1999) Thrombophilias and adverse outcomes of pregnancy--what should a clinician do? *N Engl J Med* 340:50-52.
- Slee EA, O'Connor DJ, Lu X (2004) To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23:2809-2818.
- Smits VA, Medema RH (2001) Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta* 1519:1-12.
- Spiegelstein O, Mitchell LE, Merriweather MY, Wicker NJ, Zhang Q, Lammer EJ, Finnell RH (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.
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 51:944-950.
- Snider WD (1994) Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77:627-638.
- Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83:311-327.
- Sontag E, Hladik C, Montgomery L, Luangpirom A, Mudrak I, Ogris E, White CL, 3rd (2004a) Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1080-1091.
- Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, Mudrak I, Ogris E, Speciale S, White CL, 3rd (2004b) Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:287-301.
- Sprinkle TJ, Agee JF, Tippins RB, Chamberlain CR, Faguet GB, De Vries GH (1987) Monoclonal antibody production to human and bovine 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase): high-specificity recognition in whole brain acetone powders and conservation of sequence between CNP1 and CNP2. *Brain Res* 426:349-357.
- Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J (1988) Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 81:466-474.
- Starkebaum G, Harlan JM (1986) Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 77:1370-1376.
- Stewart ZA, Tang LJ, Pietenpol JA (2001) Increased p53 phosphorylation after microtubule disruption is mediated in a microtubule inhibitor- and cell-specific manner. *Oncogene* 20:113-124.
- Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5:189-200.
- Strelling MK (1976) Editorial: Transfer of folate to the fetus. *Dev Med Child Neurol* 18:533-535.
- Studer L, Tabar V, McKay RD (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1:290-295.
- Suffys P, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W (1987) Reduced tumour necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 149:735-743.
- Sun M, Paciga JE, Feldman RI, Yuan Z, Coppola D, Lu YY, Shelley SA, Nicosia SV, Cheng JQ (2001) Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res* 61:5985-5991.
- Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA (1997) Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* 345:171-174.

- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB (1996) Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137:376-388.
- Swanson DA, Liu ML, Baker PJ, Garrett L, Stitzel M, Wu J, Harris M, Banerjee R, Shane B, Brody LC (2001) Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol Cell Biol* 21:1058-1065.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-317.
- Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, Kidd VJ, Mak TW, Ingram AJ (2002) ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J Biol Chem* 277:12710-12717.
- Tang LS, Santillano DR, Wlodarczyk BJ, Miranda RC, Finnell RH (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.
- Tarasenko YI, Gao J, Nie L, Johnson KM, Grady JJ, Hulsebosch CE, McAdoo DJ, Wu P (2007) Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior. *J Neurosci Res* 85:47-57.
- Taupin D, Podolsky DK (1999) Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* 116:1072-1080.
- Thauvin-Robinet C, Roze E (2007) [Cobalamin metabolism disorders in adult patients]. *Rev Neurol (Paris)* 163:911-918.
- Taylor WR, Schonthal AH, Galante J, Stark GR (2001) p130/E2F4 binds to and represses the cdc2 promoter in response to p53. *J Biol Chem* 276:1998-2006.
- Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414:112-117.
- Thomas PK, Hoffbrand AV, Smith IS (1982) Neurological involvement in hereditary transcobalamin II deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45:74-77.
- Thorburn A (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16:139-144.
- Thornberry NA (1998) Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5:R97-103.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287:2032-2036.
- Tsai AC, Romsos DR, Leveille GA (1975) Determination of carnitine turnover in choline-deficient and cold-exposed rats. *J Nutr* 105:301-307.
- Tsujimoto Y, Croce CM (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5214-5218.
- Tsukamoto H, Lu SC (2001) Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J* 15:1335-1349.
- Ueland PM, 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 PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis Jr RB Ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease 1992. Marcel Dekker, Inc. hemostasis, and endothelial function.* New York, 183-236.
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79.
- Ulrich E, Duwel A, Kauffmann-Zeh A, Gilbert C, Lyon D, Rudkin B, Evan G, Martin-Zanca D (1998) Specific TrkA survival signals interfere with different apoptotic pathways. *Oncogene* 16:825-832.
- Valencia R (1974) [Control of cellular division by vitamin B 12 and folates]. *J Physiol (Paris)* 69:5A-76A.
- van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ (2001) Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:243-270.
- van der Put NM, Blom HJ (2000) Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92:57-61.

- van der Put NM, van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ (1997) Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 90:511-517.
- van Leeuwen FW, Fischer DF, Benne R, Hol EM (2000) Molecular misreading. A new type of transcript mutation in gerontology. *Ann N Y Acad Sci* 908:267-281
- van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenabeele P (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8:1136-1142.
- Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J (1994) Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 50:348-360.
- Varela-Moreiras G, Ragel C, Perez de Miguelanz J (1995) Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats. *J Am Coll Nutr* 14:480-485.
- Vaux DL (1998) Immunopathology of apoptosis--introduction and overview. *Springer Semin Immunopathol* 19:271-278.
- Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, Van Loo G, Declercq W, Grooten J, Fiers W, Vandenabeele P (1998) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 187:1477-1485.
- Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6:425-436.
- Vidal A, Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247:1-15.
- Vitvitsky V, Mosharov E, Tritt M, Ataulakhanov F, Banerjee R (2003) Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* 8:57-63.
- Vitvitsky V, Dayal S, Stabler S, Zhou Y, Wang H, Lentz SR, Banerjee R. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Jul;287(1):R39-46
- Voorhoeve PM, Hijmans EM, Bernards R (1999) Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* 18:515-524.
- Walkey CJ, Donohue LR, Bronson R, Agellon LB, Vance DE (1997) Disruption of the murine gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12880-12885.
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N (1995) Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1585-1589.
- Wattenberg B, Lithgow T (2001) Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic* 2:66-71.
- Wei H, Ashby DG, Moreno CS, Ogris E, Yeong FM, Corbett AH, Pallas DC (2001) Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the B-type subunits Cdc55p and Rts1p. *J Biol Chem* 276:1570-1577.
- Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 107:1263-1273.
- Weston CR, Balmanno K, Chalmers C, Hadfield K, Molton SA, Ley R, Wagner EF, Cook SJ (2003) Activation of ERK1/2 by deltaRaf-1:ER* represses Bim expression independently of the JNK or PI3K pathways. *Oncogene* 22:1281-1293.
- Whitehead VM (2006) Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *Br J Haematol* 134:125-136.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110:385-397.
- Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT (2001) Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* 276:48404-48409.

- Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B (1996) N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis* 119:99-106.
- Wilson A, Leclerc D, Saberri F, Campeau E, Hwang HY, Shane B, Phillips JA 3rd, Rosenblatt DS, Gravel RA. Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1998;63(2):409-14.
- Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1993;60(5):820-5.
- Wymann MP, Pirola L (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436:127-150.
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* 16:5425-5436.
- Xie Z, Wei M, Morgan TE, Fabrizio P, Han D, Finch CE, Longo VD (2002) Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. *J Neurosci* 22:3484-3492.
- Xu Z, Williams BR (2000) The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Mol Cell Biol* 20:5285-5299.
- Yan Y, Mumby MC (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.
- Yan Z, Fedorov SA, Mumby MC, Williams RS (2000) PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol Cell Biol* 20:1021-1029.
- Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12759-12764.
- Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K (2000) Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology* 55:437-440.
- Yeh JH, Hsu SC, Han SH, Lai MZ (1998) Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med* 188:1795-1802.
- Yeh PY, Chuang SE, Yeh KH, Song YC, Chang LL, Cheng AL (2004) Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. *Oncogene* 23:3580-3588.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 8:1124-1132.
- Yu C, Krystal G, Varticovski L, McKinstry R, Rahmani M, Dent P, Grant S (2002) Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res* 62:188-199.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zappacosta B, Mordente A, Persichilli S, Minucci A, Carlino P, Martorana GE, Giardina B, De Sole P (2001) Is homocysteine a pro-oxidant? *Free Radic Res* 35:499-505.
- Zeisel SH, Zola T, daCosta KA, Pomfret EA (1989) Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. *Biochem J* 259:725-729.
- Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, Nguyen T, Hersey P (2003) Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* 22:2869-2881.
- Zhang XM, Zhu SW, Duan RS, Mohammed AH, Winblad B, Zhu J (2008) Gender differences in susceptibility to kainic acid-induced neurodegeneration in aged C57BL/6 mice. *Neurotoxicology* 29:406-412.
- Zhu X, Sun Z, Lee HG, Siedlak SL, Perry G, Smith MA (2003) Distribution, levels, and activation of MEK1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 86:136-142.
- Zietlow R, Pekarik V, Armstrong RJ, Tyers P, Dunnett SB, Rosser AE (2005) The survival of neural precursor cell grafts is influenced by in vitro expansion. *J Anat* 207:227-240.
- Zimmerman RJ, Chan A, Leadon SA (1989) Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 49:1644-1648.

- Zolnierowicz S (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 60:1225-1235.
- Zou CG, Banerjee R (2003) Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis. *J Biol Chem* 278:16802-16808.

Fiche 1

Lignée H19-7/IGF-IR - Conditions de culture

❖ Prolifération et différenciation de la lignée H19-7/IGF-IR

La mise en culture des cellules a été réalisée comme décrit dans la littérature par Eves *et al*, 1996

- Deux heures avant l'ensemencement des plaques, préparer une solution aqueuse extemporanée et stérile de poly-L-lysine^① à 15µg/mL
- Introduire 7 mL de la solution dans un flacon de culture^② de 75 cm²
- Incuber à 33°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 95% air)
- Rincer deux fois au PBS^③ 1X stérile
- Décongeler une ampoule H19-7/IGF-IR (Fiche 5)
- Incuber à 33°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 95% air)
- Changer le milieu de prolifération tous les deux ou trois jours

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Sérum	Antibiotiques	Autre
H19-7/IGF-IR Prolifération	DMEM ^④	L-Glutamine ^④ 2 mM Pyruvate de sodium ^④ 1 mM	Sérum de veau fœtal ^⑤ 10%	Penicilline ^④ 50 U/mL Streptomycine ^④ 50 mg/mL Puromycine ^④ 10 µg/mL Généticine ^④ 200 µg/mL	
H19-7/IGF-IR Différenciation	DMEM ^④	L-Glutamine ^④ 2 mM Pyruvate de sodium ^④ 1mM	Sérum de veau fœtal ^⑤ 1%	Penicilline ^④ 50 U/mL Streptomycine ^④ 50 mg/mL Puromycine ^④ 10 µg/mL Généticine ^④ 200 µg/mL	Complément N2 ^⑥ 1%

Tableau1 : Composition des milieux de culture

❖ Différenciation de la lignée H19-7/IGF-IR en neurones matures

- Remplacer le milieu de prolifération par le milieu de différenciation
- Incuber à 39°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 95% air)

❖ Etude de la carence en folates (vitamine B9)

L'étude des carences en vitamine B9 est appréhendée comme dans les conditions normales citées ci-dessus ; l'unique différence réside dans l'utilisation d'un DMEM^⑦ totalement dépourvu d'acide folique (vitamine B9) mais dont la composition est identique au DMEM classique

Lignée H19-7/IGF-IR : ATCC (Manassas) ; CRL 2526, numéro de lot **3507480**

- ① Poly-L-lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 0,2µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
- ② Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
- ③ PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
- ④ Tous les produits sont fournis par : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
- ⑤ SVF, Sérum de veau fœtal non décomplémenté : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
- ⑥ Complément N₂ (Gibco) mélange de : progestérone, putrescine, sélénite de sodium, holo- transferrine humaine et insuline « *recombinant full chain* »
- ⑦ DMEM classique (référence : 11960) : DMEM sans B9 (référence : D2429) SIGMA Sigma-Aldrich

Fiche 2**Lignée NIE-115- Conditions de culture****❖ Prolifération et différenciation de la lignée de neuroblastomes murins NIE-115**

La mise en culture des cellules a été réalisée comme décrit dans la littérature par Amano *et al.*, en 1972

- Décongeler une ampoule de NIE-115 (*Fiche 5*)
- Incuber à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 95% air)
- Changer le milieu de prolifération tous les jours

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Sérum	Antibiotiques	Autre
NIE-115 Prolifération	DMEM ^①	L-Glutamine ^① 2 mM Pyruvate de sodium ^① 1 mM	Sérum de veau fœtal ^② 10%	Penicilline ^① 50U/mL Streptomycine ^① 50 mg/mL Généticine ^① 0,5%	
NIE-115 Différenciation	DMEM ^①	L-Glutamine ^① 2 mM Pyruvate de sodium ^① 1mM	Sérum de veau fœtal ^② 2%	Penicilline ^① 50U/mL Streptomycine ^① 50 mg/mL Généticine ^① 0,5%	DMSO ^③ 1,25%

Tableau 2 : Composition des milieux de culture

Lignée NIE-115 sous clone de cellules C-1300 issus de neuroblastomes murins

① Tous les produits sont fournis par : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

② SVF, Sérum de veau fœtal décomplémenté : PAA laboratoties

③ DMSO (Dimethylsulfovide) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche 3

Cultures primaires de neurones d'hippocampe d'embryons de rat (E19)

❖ Préparation des plaques de culture

- Préparer une solution de Poly-DL-ornithine^① à 150 µg/mL à diluer dans du PBS-Glucose 30%^②
- Stériliser les lamelles en verre^③ 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 vétérinaire^④
- 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'accutase^⑤ (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 I^⑥ (4 mL MSS + 100 µL SVF + 40 µL DNase I + filtration à 0,2µm) : 10 min, dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 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 sontensemencées à une densité cellulaire de 1,5.10⁵ cellules par puits de 1,9 cm² 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 F12 ^⑦ (50:50) dépourvu de L- glutamine - Glucose [®] : 30 g/L - Bicarbonate de sodium [®] : 7,5 g/L - L-glutamine [®] : 30 mg/L - Streptomycine [®] : 25mg/L - Pénicilline [®] : 25mg/L - Tampon Hepes [®] : 240g/L pH 7,4	- 90% MSS - Apo-transférine [®] : 100 mg/L - Insuline bovine [®] : 5 mM - Progestérone [®] : 10 nM - Putrescine [®] : 100 mM - Sélénium [®] : 30 nM

Tableau 3 : 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 4

Cultures primaires de neurones de cortex d'embryons de rats (E19)

❖ Préparation des plaques de culture

- Préparer une solution de Poly-DL-ornithine^① à 150 µg/mL à diluer dans du PBS-Glucose 30%^②
- Stériliser les lamelles en verre^③ et tous les instruments de dissection
- Introduire 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
- Stocker les plaques dans l'incubateur jusqu'à l'utilisation

❖ Dissection

- Endormir l'animal avec un excès d'halothane vétérinaire^④
- 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
- Les sacs amniotiques sont isolés
- 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%
- Les méninges, le striatum ainsi que l'hippocampe sont éliminés. Les cortex ainsi isolés sont ensuite dissociés mécaniquement dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium, Eurobio) par passages itératifs dans une micropipette
- En milieu MSS, couper le cervelet et séparer les deux hémisphères cérébraux, prélever délicatement les cortex cérébraux
- Couper en petits morceaux à l'aide de petits ciseaux et les grouper dans un tube de 15 mL, laisser décanter puis aspirer le surnageant.
- Incuber en présence d'accutase^⑤ (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 I^⑥ (4 mL MSS + 100 µL SVF + 40 µL DNase I + filtration 0,2µm) : 10 min, dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂/ 95% air)
- Dissociation mécanique douce à la seringue, 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
- Ensemencement dans le milieu M2
- Ensemencer les plaques à une densité 1,5.10⁵ cellules par puits de 1,9 cm² 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

① Poly-DL-ornithine 150µg/mL : (filtration 0,2µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② PBS-Glucose 30% : PBS (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-trifluoroethane) : Belamont, Mundipharma

⑤ Accutase : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑥ DNaseI: 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 5

Décongélation des lignées

- Sortir le cryotube^① 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 d milieu de prolifération
- Centrifuger 5 min à 700 g pour l'élimination du glycérol ou du DMSO^②
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 5 mL de milieu de prolifération
- Ensemencer une boîte de culture de 25 cm²
- Changer le milieu après 48h

① Cryotube, Nalgène : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

② DMSO (Dimethylsulfoxyde) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche 6

Repiquage des lignées

Tous les produits doivent être à température ambiante

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS stérile^①
- Ajouter de la trypsine-EDTA^② 0,05% à raison de 40 µL par cm² à trypsiner
- Incuber 5 à 10 min à 33° ou à 37°C, selon le type de lignée
- Préparer pendant ce temps un tube de 15 mL avec du milieu de culture correspondant à la lignée (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 serontensemencées.
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma^③
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à N.10⁴ cellules/mL
- Pour l'entretien des cellules, ensemercer à 1,5.10⁴ cellule par cm²

① PBS 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 7

Congélation des lignées

❖ Dans du glycérol (10% glycérol, 30% SVF, 60% DMEM)

Préparer une solution stérile de glycérol à l'autoclave

- Préparer le milieu de congélation : 1 mL de glycérol, 2 mL de SVF, 2 mL de milieu de culture
- Préparer une suspension cellulaire de densité 4.10^6 cellules/mL dans le milieu de culture adapté
- Déposer 0,5 mL de cette suspension dans des cryotubes^①. Soit 2.10^6 cellules /tube
- Ajouter 0,5 mL de milieu de congélation en agitant un peu le tube
- Placer les tubes dans la boîte de congélation^②
- Placer cette boîte 24h à -80°C . Puis transférer les tubes dans l'azote liquide

❖ Dans du DMSO (9% DMSO^③, 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, 450 μL 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 cryotube^①
- Placer les tubes dans la boîte de congélation^②
- 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

① Cryotube : Nalgène ; VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

② Boîte de congélation : Nalgène Cryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France) dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive

③ DMSO (Diméthylsulfoxyde) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche 8

Détection des cellules en mitose par incorporation du BrdU^①

- Ensemencer sur des lamelles en verres traitées à la poly-L-lysine, 3.10^5 cellules (progéniteurs neuronaux)
- Incuber 24h à 33°C en atmosphère humide 5% CO₂/ 95% air
- Le jour de l'induction de la différenciation, préparer le milieu adéquat contenant 20µM de BrdU
- Procéder à une immunocytochimie classique comme décrit sur la *Fiche n°14*
- Utiliser un anticorps primaire anti-BrdU^③
- Utiliser un anticorps secondaire (Alexa Fluor)^④

① BrdU : 5-bromo-2'-désoxyuridine : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldrich

③ Anticorps primaire anti-BrdU produit chez le mouton (Calbiochem ; VWR International, France) ou produit chez la souris (Oncogene ; Etats-Unis)

④ Anticorps secondaire (AlexaFluor) : Molecular Probes ; Cergy-Pontoise (France)

Fiche 9

Co-cultures : ensemencement de la lignée H19-7/IGF-IR sur des cultures primaires issues de l'hippocampe ou du cortex de rats

- Ensemencer des plaques 24 puits avec $1,5 \cdot 10^5$ cellules de cultures primaires issues de l'hippocampe (*Fiche 3*) ou du cortex (*Fiche 4*)
- Prolifération dans les conditions normales, 6 jours
- 48h avant le co-ensemencement remplacer le milieu de prolifération de la lignée H19-7/IG-IR par un milieu de prolifération contenant du BrdU^① (50 ng/mL)
- Après 6 jours de prolifération éliminer le milieu des cultures primaires
- Introduire délicatement (goutte à goutte) $5 \cdot 10^5$ cellules H19-7/IG-IR par puits
- Incuber à 37°C en atmosphère humide 5% CO₂/ 95% air pendant 6 jours

① BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine) : à dissoudre dans du PBS, filtrer 0,2 µm, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche 10

Test de viabilité cellulaire : méthode d'exclusion au Bleu Trypan

- Ensemencer des plaques 24 puits avec $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits
- Incuber 24 h à 33°C en atmosphère humide 5% CO₂/ 95% air
- Rincer 2 fois avec du PBS^① stérile
- Trypsiner^② les tapis cellulaires
- Prélever 200 µL de l'homogénat cellulaire dans un tube à essai
- Introduire 500 µL de la solution de Bleu trypan^③ 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'hématimètre^④
- 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 mortes, 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.

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. Un deuxième échantillon peut également être préparé pour vérifier la fiabilité du résultat.

Comptage des cellules : nombre moyen de cellules par carré x facteur de dilution x 10⁴ (comptage sur 10 carrés)

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 11

Test de viabilité cellulaire (Réduction mitochondriale du MTT)

D'après Denizot et Lang (1986)^①

- ensemencer les cellules sur des plaques de 24 puits à une densité de $3 \cdot 10^5$ cellules par puits
- Dissoudre du MTT^② à 5 mg/mL dans du PBS-glucose^③
- Filtrer sur un filtre de 0,22 μm
- Ajouter 1/10^{ème} de la solution de MTT par puits
- Incuber de 1 à 2 heures dans un incubateur à 37°C en atmosphère humide 5% CO₂/ 95% air
- Enlever délicatement le milieu
- Ajouter 150 μL de DMSO^④ par puits
- Agiter horizontalement 10 à 15 min à température ambiante pour dissoudre les cristaux de formazan
- Transférer 100 μL du mélange sur une plaque de 96 puits
- Les blancs de lecture contiennent uniquement du DMSO
- La lecture des densités optiques est réalisée avec le lecteur de plaques^⑤ à 570 nm

① (Denizot et Lang ,1986) : J. Immunol. Methods

② MTT, 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide conservé à 4°C : Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France

③ PBS sans CaCl₂, ni MgCl₂, glucose (d'après DULBECCO) : Gibco/Invitrogen ; Cergy Pontoise, France

④ DMSO (Dimethylsulfoxyde) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy Pontoise, France

⑤ Lecteur de plaques Victor³ Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 12

Test de viabilité cellulaire ATPLite

- Les cellules sont préalablement ensemencées avec 10^5 cellules par puits sur des plaques blanches^① de 96 puits préalablement traitées avec de la poly-L-lysine^② 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 ATPLite^③
- 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 plaques^④

① Plaques 96 puits blanches, stériles : PerkinElmer ; Courtaboeuf cedex, France

② Poly-L-lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 20µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Kit ATPLite, CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay: Promega, Charbonnières, France

④ Lecteur de plaques Victor³ Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 13

Test de viabilité cellulaire ATPLite En présence d'inhibiteurs

- Les cellules sont préalablement ensemencées avec 10^5 cellules par puits sur des plaques blanches^① de 96 puits préalablement traitées avec de la poly-L-lysine^② 15 µg/mL
- Incuber 24h à 33°C, en atmosphère humide, 5% CO₂
- Remplacer le milieu de prolifération par le milieu de différenciation en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs de voies de signalisation (*tableau 4*)
- 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 ATPLite^③
- 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 plaques^④

Inhibiteurs voie PI3-Kinase	PD-98059 ^⑤
Inhibiteur voie p38	PD-169316 ^⑤

Tableau 4 : Inhibiteurs utilisés

① Plaques 96 puits blanches, stériles : PerkinElmer ; Courtaboeuf cedex, France

② Poly-L-lysine : 15µg/mL dans de l'eau stérile (filtration 20µm) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ Kit ATPLite, CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay: Promega, Charbonnières, France

④ Lecteur de plaques Victor³ Wallac Multilabel, Perkin Elmer

⑤ Inhibiteurs : Calbiochem, VWR international, France

Fiche 14

Marquage immunocytochimique

- Ensemencer sur des lamelles^① en verre, 3.10^5 cellules traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS^②
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde^③ 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-100^④/PBS)
- Rincer 3 fois 5 min avec du PBS
- Incuber 1h à température ambiante avec une solution de BSA^⑤ 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 Triton 0,05%
- Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI^⑥
- 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 montage^⑦
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser les lames en microscopie confocale ou à fluorescence

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 $MgCl_2$

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 ; Leica TCS SP2-AOBS ; Leica microsystems, Wetzlar, Allemagne

Anticorps Primaires	Anticorps (anti-)	Source	Dilution	Fournisseurs
	Apostain	Souris	1/100	AbCys (France)
	BrdU	Souris ou Mouton	1/100	Oncogene (Etats-Unis) Calbiochem, VWR International, (France)
	GAD65/67	Lapin	1/200	Chemicon International (Etats-Unis)
	GFAP	Souris	1/100	Chemicon International (Etats-Unis)
	Homocystéine	Lapin	1/100	Chemicon International (Etats-Unis)
	MTR	Chèvre	1/100	Abcam, Paris (France)
	MTHFR	Souris	1/100	Interchim, VWR International (France)
	NeuroD	Chèvre	1/300	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
	NeuN	Souris	1/100	Chemicon International (Etats-Unis)
	NF68	Lapin	1/300	USBiological (Massachusetts, MA)
	Nogo total	Chèvre	1/150	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
	PSA-NCAM	Souris	1/150	AbCys SA, Paris (France)
	PSD-95	Lapin	1/200	Abcam, Paris (France)
	Synapsine I	Lapin	1/100	Calbiochem, VWR International
	Synapsine II	Lapin	1/100	Abcam, Paris (France)
	Synaptotagmine	Souris	1/50	Synaptic System, Goettingen, (Allemagne)
	Tyrosine hydroxylase	Lapin	1/200	Chemicon International (Etats-Unis)
	Vimentine	Chèvre	1/100	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
	VGLUT2	Souris	1/200	Chemicon International (Etats-Unis)

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 15

Marquage immunocytochimique : technique MitoCapture™ Perte du potentiel membranaire mitochondrial

- Ensemencer sur des lamelles en verre^① traitées à la poly-L-lysine^②, $3 \cdot 10^5$ cellules
- Chauffer le tampon d'incubation présent dans le kit à 37°C
- Rincer les lamelles 2 fois avec le tampon
- Mélanger le tampon avec le réactif couplé au fluorochrome : 1/1000^{ème}
- 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 montage^③
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser immédiatement les lames au microscope à fluorescence^④

« 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 16

Marquage immunocytochimique : Marquage à l'Apostain

Anticorps anti-ADNsb/Apostain[®]

- Ensemencer sur des lamelles en verre^① traitées à la poly-L-Lysine, 3.10^5 cellules
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS^②
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde^③ à 4%
- Incubation 30 min dans du méthanol^④ (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 formamide^⑥ (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 BSA^⑦ à 1% et incuber à 37°C pendant 20 min
- Introduire 200 µL avec l'anticorps anti-ADNsb/Apostain[®], au 1/10^{ème} dans PBS-BSA 1%, sous agitation), 30 min à 37°C
Incubation avec 200 µL d'anticorps secondaire Anti-IgM, au 1/500^{ème} 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 montage^⑩
- 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 Ca²⁺ ni Mg²⁺ : 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 17

Extraction des protéines cytosoliques pour l'étude par Western-Blot

Le dosage se fait en maintenant les échantillons à 4°C.

- Entretien des cellules dans des boîtes de Pétri^① (Ø 100mm)
- Lorsque les cellules sont à « confluence » rincer 3 fois les boîtes avec 5 mL de PBS^② froid
- Aspirer soigneusement le dernier rinçage pour bien assécher les flasques (possibilité de congeler les boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction)
- Introduire 500 µL de tampon RIPA^③ par boîte et maintenir sur de la glace pendant 10 min
- Gratter les cellules au policeman et transférer dans des microtubes.
- Effectuer 3 cycles de congélation et 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 18*)

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 18

Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

- 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 BSA^① (bovine serum albumin) diluée dans le même tampon que les échantillons à doser
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA)^② avec 1 volume de réactif B (CuSO₄)^③
- 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
- Ajouter 200 µL de réactif de travail et agiter la plaque
- Couvrir la plaque et la placer 30 min à 37°C
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante
- Mesurer l'absorbance sur un spectrophotomètre lecteur de plaques^④ 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 la courbe étalon

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 NaN₃ à 0,05% (p/v)

② Réactif A : solution aqueuse contenant BCA-Na₂ 1% (p/v), Na₂CO₃ 2% (p/v), tartrate-Na₂ 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO₃ 0,95% (p/v) (pH 11,25)

③ Réactif B : solution de CuSO₄.5H₂O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

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

⑤ Lecteur de plaques Victor³ Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 19

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

- Visser les plaques de verre séparées par des espaceurs sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage
- Couler le gel de séparation^① selon le (tableau 7) entre les plaques de verre, recouvrir sa surface avec de l'isopropanol
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante
- Aspirer l'isopropanol et rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée
- Eliminer toutes traces d'eau et couler le gel de concentration (tableau)
- Positionner le peigne en Téflon[®] en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser à nouveau 20 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 migration^② et contrôler l'étanchéité
- Ajouter 1 volume de tampon de dépôt^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 standards dénaturés^④
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration débute à 50 V constant (~10 mA) 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

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

① Gel de séparation : 12% (p/v) acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories), 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 25 mM contenant glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)

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

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

Gel de migration		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6 %	H ₂ O 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 ₂ O 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 ₂ O 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 ₂ O 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 ₂ O 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 ₂ O 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 20

Coloration des protéines après électrophorèse

sur gel de polyacrylamide

❖ Coloration au bleu de Coomassie[®] R250

- Dissoudre 2 g de bleu de Coomassie[®] R250^① 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

❖ Révélation au nitrate d'argent

- Préparer toutes les solutions avec de l'eau ultrapure^②
- Agiter légèrement le gel au cours des différentes étapes de la coloration
- Fixer le gel dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (4:1:5, v/v/v) pendant au moins 1 h
- Faire 3 lavages de 20 min chacun avec une solution d'éthanol à 30% (v/v)
- Incuber 1 min avec une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (p/v) (réduction)
- Laver 3 fois 20 sec le gel avec de l'eau ultrapure
- Incuber 20 min dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% (p/v) et formaldéhyde (37%) à 0,02% (v/v) (extemporanée)
- Laver abondamment 3 fois 20 sec avec de l'eau ultrapure
- Développer le gel avec une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 3% (p/v), formaldéhyde à 0,05% (v/v) et thiosulfate de sodium à 0,0005% (p/v) (extemporanée)
- Laver le gel abondamment 2 fois 30 sec avec de l'eau ultrapure
- Arrêter la réaction de développement avec une solution de glycine à 0,5% (p/v)
- Laver 2 fois 30 min le gel dans de l'eau ultrapure

① Bleu de Coomassie[®] R250 : Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France)

② H₂O Milli-Q[®] : Millipore (67120 Molsheim, France)

Fiche 21

Transfert des protéines sur membrane de PVDF

❖ Electro-transfert semi-sec

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert^①
- Couper la membrane PVDF^② les immerger dans du méthanol, puis les tremper en même temps que les papiers filtre dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - un papier filtre Whatman[®] 3MM^③
 - la membrane de PVDF
 - 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'appareil^④ sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10 V pendant 45 min
- Démontez le sandwich et récupérer la membrane de PVDF
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S^⑤ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

① Tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20% (v/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)

② Membrane polyvinylidene difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

③ Papier filtre Whatman ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))

④ Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad Laboratories)

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

❖ Electro-transfert « liquide »^①

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert à 4°C^②
- Couper la membrane de PVDF^③, les papiers filtres^④ à la dimension du gel (~5×8 cm) et les immerger dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- 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, cassée en deux, sur le sandwich
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle refermer l'appareil
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 250 mA pendant 1h
- Démonter le sandwich et récupérer la membrane PVDF
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S^⑤ pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier.
- Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

① Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories)

② Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl)

③ Membrane polyvinylidene difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

④ Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))

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

Fiche 22

Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de nitrocellulose dans du tampon de blocage^① pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente
- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (*tableau 8*) dans du tampon de blocage pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane PVDF 4 fois 10 min avec le tampon de lavage^②
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase (*tableau 9*) pendant 1 h sous agitation rotative lente à température ambiante (technique des sacs scellés)
- Laver 4 fois 10 min la membrane avec du tampon de lavage
- L'activité peroxidase est révélée par chimiluminescence^③
- Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique^④
- Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel, puis recouvrir d'un film plastique
- Laisser 5 min, puis sécher la membrane
- Disposer la membrane entre 2 films plastique
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique^⑤ pendant 1 à 5 min
- Révélation du film autoradiographique dans un bain de développement^⑥ jusqu'à apparition des premières bandes (~30 s)
- Rinçage à l'eau
- Bain de fixation^⑦ jusqu'à transparence du film (~2 min)

① Tampon de blocage : 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

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

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

④ Saran[®] (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)

⑤ BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film, NY, USA)

⑥ Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)

⑦ Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

Anticorps (anti-)	Source	Dilution	Fournisseurs
Adam 10	Lapin	1/3000	Millipore (France)
Adam 17	Lapin	1/3000	Millipore (France)
Akt	Souris	1/1000	AbCys (France)
Phospho-Akt	Souris	1/1000	Oncogene (Etats-Unis)
BCI-2	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
BCI-XL	Lapin	1/1500	Cell Signaling Technology, (France)
Bad	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)
Cytochrome C	Chèvre	1/3000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
Cycline E	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
DAP Kinase	Souris	1/2000	Sigma-Aldrich (St Louis, Etats-Unis)
Phospho-DAPK	Souris	1/2000	Sigma-Aldrich (St Louis, Etats-Unis)
ERK1/2	Lapin	1/3000	Cell Signaling Technology, (France)
Phospho-ERK1/2, Thr202/Tyr204	Lapin	1/3000	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)
MAPKinase P38a	Chèvre	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
Phospho-MAPKinase -p38a Thr ¹⁰⁸ /Tyr ¹⁸²	Souris	1/1000	Chemicon International (Etats-Unis)
PP2A sous-unité C et déméthyle PP2A	Souris	1/1000	Cell Signaling Technology, (France)
pro-NGF	Lapin	1/2000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
p53	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
p75 NTR	Lapin	1/1000	Millipore (France)
TIMP1	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
TIMP2	Lapin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology (Etats-Unis)
TrkA	Lapin	1/1000	Millipore (France)
Tyrosine hydroxylase	Lapin	1/1000	Millipore (France)

Tableau 8 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps secondaires	<i>Horseradish peroxidase-conjugated anti-</i>	Chèvre	1/5000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
		Lapin	1/5000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)
		Souris	1/5000	Molecular Probes, Cergy-Pontoise (France)

Tableau 9 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Fiche 23

Extraction des ARN par le TRIZOL^①

- Ensemencer 10⁶ des cellules dans des boîtes^① de diamètre 35 mm
- Précautions pour éviter les RNases et préparation du matériel free :
 - utiliser des plastiques stériles
 - utiliser de l'eau DEPC^②
 - l'alcool doit être dilué dans de l'eau DEPC

Cette technique peut être utilisée sur des quantités de tissus de 50-100 mg à 1g et plus et 5.10⁶ cellules à plus de 10⁷ d'origine animale, humaine, végétale ou bactérienne.

- Lyser directement les cellules dans la boîte de culture en ajoutant 1 mL de TRIZol. S'il n'y a pas assez de TRIZol il y a un risque de contamination avec de l'ADN
- Pipeter plusieurs fois pour bien homogénéiser les cellules dans le TRIZol
- Incuber à température ambiante pendant 5 min (pour permettre la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques)
- Ajouter 200 µL de chloroforme^③ pour 1 mL de TRIZol, bien fermer les tubes
- Agiter vigoureusement pendant 15 secondes (pour obtenir une émulsion blanchie) et incuber 2 à 3 min à température ambiante
- Centrifuger à 12.000 g pendant 15 min à 4°C
- La phase aqueuse (phase supérieure incolore) contient uniquement les ARN. La phase organique (inférieure rouge) contient les ADN et les protéines. Le volume de la phase aqueuse correspond à environ 60% du volume de TRIZol utilisé pour l'homogénéisation.
- Transférer dans un tube propre la phase aqueuse. La phase organique peut être conservée si l'extraction d'ADN et/ou de protéines est prévue
- Ajouter à la phase aqueuse 500 µL d'Isopropanol^④ (propanol-2) pour 1 mL de TRIZol et homogénéiser plusieurs fois à la pipette
- Laisser 10 min à température ambiante et centrifuger 12000 g pendant 10 min à 4°C
- Le précipité d'ARN souvent invisible avant la centrifugation, forme un culot visible
- Eliminer le surnageant
- Laver la pelote d'ARN avec au moins 1 mL d'éthanol^⑤ 75% par mL de TRIZol.
- Mélanger l'échantillon en vortexant et centrifuger à 7500 g pendant 5 min à 4°C
- Eliminer au maximum le surnageant. Laisser sécher pendant 5 à 10 min les culots sous la hotte chimique (les tubes la tête en bas). Ne pas sécher les ARN par centrifugation sous vide. Il est important de ne pas les sécher complètement car cela diminue leur solubilité.
- Resuspendre les ARN dans de l'eau DEPC ou une solution de SDS^⑥ 0.5% en homogénéisant plusieurs fois à la pipette et
- Incuber 10 min à 55-60°C
- Des ARN partiellement dissous ont un rapport $A_{260/280} < 1,6$

① TRIZol[®] Reagent (Total RNA Isolation Reagent) (Invitrogen) : produit toxique à travailler sous hotte chimique et avec des gants

② Eau DEPC : pour préparer de l'eau RNase-free, verser de l'eau milli-Q dans une bouteille en verre RNase-free. Ajouter du diéthylpyrocarbonate (DEPC) à 0.01% (v/v). Laisser agiter une nuit sous hotte chimique (toxique avant autoclavage) et autoclaver. Aliquoter à -20°C

③ Chloroforme : BDH, VWR International, France

④ Isopropanol : Carlo Erba reactifs

⑤ Ethanol 75% : éthanol pur dilué dans de l'eau DEPC

Fiche 24

Extraction des ARN avec le Kit RNeasy^① avec traitement à la Dnase I

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. Ne pas utiliser la centrifugeuse si elle est en dessous de 20°C.

- Lysér les cellules poussant sur des plaques de diamètre <6 cm avec 350 µL RLT/β-Mercaptoéthanol^② directement dans la plaque de culture après avoir aspiré complètement le milieu
- Récupérer le lysat cellulaire dans un tube de 1,5 mL
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free
- 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.
- Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (RNase-free) et bien mélanger en pipétant. Ne pas centrifuger.
- Déposer 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. Si le volume excède 700 µl, charger les aliquots successivement sur la colonne RNeasy 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 aliquotée^③ à 70 µl de tampon RDD. Mélanger doucement par inversion du tube.
- Déposer 80 µl préparés par membrane, 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 RPE^④ la 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 et recentrifuger 1 min pour sécher la membrane.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL d'eau RNase-free sur la membrane. Centrifuger à ≥8000 g pour éluer.
- 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.

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 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.

④ Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE

Fiche 25

Quantification des ADN ou ARN

- Diluer l'ADN ou l'ARN dans de l'eau à un 1/100^{ème} dans une cuve en quartz.
- Lire l'absorbance à 260 et 280 nm avec à un spectrophotomètre.

Une concentration d'ARN de 40 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO.

Pour mesurer la concentration en ADN double brin (µg /µL), il faut multiplier par 50 la valeur de l'absorbance à 260 nm ainsi que par le facteur de dilution.

Le ratio A_{260} / A_{280} est également calculé pour vérifier la pureté de la solution. Celui-ci doit être compris entre 1,6 et 1,8. Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN.

Fiche 26**Transcription inverse des ARN (RT)**

- Dans un microtube de 0,2 mL stérile, mélanger dans l'ordre :

Réactifs	Volume	Concentration finale
H ₂ O ultrapure DEPC	qsp 20 µL	
Tampon RT 10X ^①	2 µL	1X
MgCl ₂ ^② 25mM	4 µL	5 mM
dNTP ^② 10 mM	2x4 µL	1 mM
Random Hexamers ^② (50µM)	1 µL	2,5 µM
Rnase Inhibitor ^② (20 u/µl)	1 µL	1 U/µL
Reverse Transcriptase ^② (5 u/µl)	1 µL	2,5 U/µL
ARN	1 µg	

- Vortexer puis centrifuger brièvement
- Placer dans l'appareil de PCR^③ préchauffé
- Sélectionner le programme RT suivant :
 - Segment 1 : 42°C 15min
 - Segment 2 : 99°C 5min
 - Segment 3 : 5°C 5min
 - Nombre de cycle : 1
- Conserver le ADNc produit à -20°C

Kit de RT-PCR GeneAmp RNA PCR Core Kit de Applied Biosystems, Courtaboeuf, France

①Tampon RT- PCR 10X : Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), KCl 500 mM

②Réactifs RT-PCR

③Thermocycler GeneAmp[®] PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf cedex)

Fiche 27

RT-PCR semi-quantitative en temps réel

A) Mini Protocole RNeasy^① pour la purification des ARN totaux à partir de cellules animales

- Avec la procédure RNeasy (qualité équivalente au CsCl) 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. Ne pas utiliser la centrifugeuse si elle est en dessous de 20°C

- Les cellules en monocouche sont lysées directement dans la plaque de culture (jusqu'à 10 cm de diamètre, ne pas utiliser plus de 10⁷ cellules). Après avoir aspiré complètement le milieu qui risque de diminuer l'efficacité de l'extraction, ajouter le volume approprié de tampon RLT^② (350 µL pour un diamètre <6 cm et 600 µL de 6 à 10 cm). Collecter le lysat cellulaire avec un grattoir. Mélanger en pipetant et s'assurer qu'aucun amas cellulaire n'est visible sur la plaque. Pipeter le lysat dans un tube de 1,5 mL
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue^③ RNase-free.
- 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.
- Ajouter 1 volume (350 ou 600 µL) d'éthanol 70% au lysat homogénéisé et bien mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger. Si un peu de lysat est perdu lors de l'homogénéisation, ajuster le volume d'éthanol en conséquence. Après l'addition d'éthanol, des précipités peuvent être visibles en préparant l'ARN à partir de certaines lignées cellulaires, mais ceci n'affecte pas la procédure RNeasy.
- Déposer jusqu'à 700 µL de l'échantillon, à une mini-colonne RNeasy^① placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat. Si le volume excède 700 µL, charger les aliquots successivement sur la colonne RNeasy et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation.
- Pour le traitement à la DNase, déposer 350 µL de tampon RW1^④ sur la mini-colonne, et centrifuger pendant 15s à ≥8000 g pour laver. Jeter l'éluat.
- Ajouter 10 µL de solution stock DNase I^{⑤⑥} à 70 µL de tampon RDD^④. Mélanger doucement par inversion du tube.
- Déposer la DNase I (80 µL) directement sur la membrane de la mini-colonne, et incuber sur la paillasse pendant 15 min (20-30°C).
- Déposer 350 µL de tampon RW1 sur la mini colonne, et centrifuger pendant 15 s à ≥8000 g. Jeter l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Déposer 500 µL de tampon RPE^⑦ sur la colonne Centrifuger à ≥8000 g pour laver la colonne. Jeter l'éluat.
- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à ≥8000 g pour sécher la membrane de la mini-colonne.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL sur la membrane silica-gel. Centrifuger à ≥8000 g pour éluer.
- 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

① Mini Kit : Qiagen (Courtabœuf, France)

② Ajouter 10 μL de β -Mercaptoéthanol par mL de tampon RLT. Le tampon RLT est stable pendant 1 mois après addition du β -Mercaptoéthanol

③ Seringue Falcon : VWR International

④ DNase set : Qiagen (Courtabœuf, France)

⑤⑥ 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.

⑦ Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 mL d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE.

B) RT omniscrypt^①

- Mener toutes les réactions à 4°C pour empêcher la synthèse prématurée des ADNc et minimiser les risques de dégradation de l'ARN.
- Cependant, pour des ARN avec un taux élevé de structure secondaire, une étape de dénaturation est effectuée. Dénaturer l'ARN dans de l'eau RNase-free (qsp 12 μL) avant la mise en place de la réaction : incubé l'ARN 5 min à 65°C, puis placer immédiatement dans la glace. Ne pas dénaturer l'ARN dans le mélange réactionnel.
- Diluer l'inhibiteur de RNase^② à une concentration finale de 10 unités/ μL dans du tampon RT 1x refroidi dans la glace (dilué dans l'eau RNase-free fournie). Mélanger au vortex (pas plus de 5 secondes) puis centrifuger brièvement.
- Préparer sur la glace le mélange principal frais selon le tableau suivant :

	Volume	Concentration finale
Tampon RT 10x	2 μL	1X
dNTP Mix (5mM chaque dNTP)	2 μL	0,5 mM chaque dNTP
Hexanucléotides ^③ 10 μM	2 μL	1 μM
Inhibiteur Rnase ^② (10 U/ μL)	1 μL	0,5 U
Transcriptase Inverse ^① (4U/ μL)	1 μL	4 U
ARN total chauffé	2 μg	
Eau Rnase-free	qsp 20 μL	

- Si plus d'une réaction de transcription inverse est mise en place, distribuer le volume approprié de mélange principal dans des tubes réactionnels individuels. Garder les tubes dans la glace.
- Ajouter l'ARN dans chaque tube. Mélanger au Vortex puis centrifuger brièvement.
- Préparer un témoin H₂O (sans matrice) et un témoin RT (de l'ARN sans enzyme)
- Incuber pendant 60 min à 37°C.

① Kit RT OmniscryptTM Qiagen (Courtabœuf, France)

② RNase out (40U/ μL) : Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

③ Random primers (hxaanucléotides) 1,6mM Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

C) PCR semi-quantitative en temps réel

- Préparer le mélange réactionnel à l'abri de la lumière et transférer 19 µL par capillaire^①
- Ajouter alors 1 µL de la dilution d'ADNc soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme

Amplification	Concentration finale
2x QuantiTect SYBR Green PCR ^②	1X
amorces S 10µM	0,5 µM
amorces AS 10µM	0,5 µM
MgCl ₂ stock 25mM ^② SYN I	2,5 mM
MgCl ₂ stock 25mM ^② SYN II	3,75 mM
H ₂ O sterile PCR grade	qsp 20 µL
ADNc dilué (1/10,1/100, ...)	-

- Conditions d'amplification sur le LightCycler^③

COUPLE D'AMORCES	NOMBRE DE CYCLES		TEMPERATURE	DUREE	INCREMENT (°C/SEC)
RSP29	1	ACTIVATION DE LA TAQ	95°C	15 MIN	20
	50	DENATURATION	94°C	10 SEC	20
		HYBRIDATION	58°C	15 SEC	20
		ELONGATION	72°C	15 SEC	20
DAPK R1	50	DENATURATION	94°C	10 SEC	20
		HYBRIDATION	55°C	30 SEC	20
		ELONGATION	72°C	30 SEC	20

COUPLE D'AMORCES	NOMBRE DE CYCLES		TEMPERATURE	DUREE	INCREMENT (°C/SEC)
POLYMERASE II	1	ACTIVATION DE LA TAQ	95°C	15 MIN	20
	43	DENATURATION	95°C	10 SEC	20
		SYN I HYBRIDATION	57°C	15 SEC	20
		SYN II ELONGATION	72°C	15 SEC	20

- Analyser les résultats grâce au logiciel de quantification RelQuant^⑤ après avoir vérifié que le pic de la courbe de fusion correspond bien à la taille de l'amplicon sur gel (*Fiche 28*)

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>.

- Oligonucléotides utilisés :

GENE	NOM AMORCE	SEQUENCE AMORCE ^① 5'→ 3'	T ^② (°C)	NOMBRE CYCLES	TAILLE (MER)
RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE					
RPS29	RSP29H SENS	AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTG TAC TG	61	50	115
	RSP29H ANTI SENS	AGA CAC GAC AAG TCG GAG AA	61	50	115
DAPK	DAPK R1 SENS	TGC TTA CTT GAA CGG AGT TGG	61	50	115
	DAPK R1 ANTI SENS	GAT GAT GTG GAT GGA TGT GG	61	50	115

GENE	NOM AMORCE	SEQUENCE AMORCE ^① 5'→ 3'	T ^② (°C)	NOMBRE CYCLES	TAILLE (MER)
RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE					
POL II	POL II SENS	GCA TTA ACA TCA GGA ACA ATA AAG GC	57	43	90
	POL II ANTI SENS	CCG CAA ACT GAC CTG GAC CAC TCA ACA	57	43	90
SYN I	SYN I SENS	GAG GCC CTC CAC AAC CAG	57	43	147
	SYN I ANTI SENS	CTG CTG TGG GAC TTG GTA GG	57	43	147
SYN II	SYN II SENS	CAT GGG TGT TTG CTC AGA TG	57	43	96
	SYN II ANTI SENS	TCT CTC GGT GAT TGG GGT AG	57	43	96

① Les oligonucléotides ont été synthétisés par Eurobio (Les Ulis, France). Les amorces pour la PCR quantitative ont été purifiées par HPLC. Les oligonucléotides utilisés 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>

② Température d'hybridation des amorces

Fiche 28

Analyse qualitative de l'ADN sur gel d'agarose

- Peser l'agarose^① afin de préparer un gel à 0,8-1% (p/v) selon la taille des ADN étudiés
- Dissoudre l'agarose dans du tampon TBE 1X^② (80-100 mL) par chauffage au four à micro-ondes jusqu'à un début d'ébullition puis laisser refroidir à ~50°C sur la paillasse
- Ajouter du bromure d'éthidium (BET)^③ à une concentration finale de 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Verser délicatement la solution chaude d'agarose dans le support de gel 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'électrophorèse horizontale remplie avec du tampon TBE 1X
- Déposer dans les puits du gel, 10 µL de produits PCR mélangés à 2 µL de solution de dépôt^④ ainsi que des marqueurs de taille^⑤
- 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 130 V pendant 50 min (18 V/cm)
- L'ADN contenu dans le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS.

① Agarose standard, Euromedex

② Tampon TBE 10X : Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH 8,0) Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad Laboratories)

③ Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio

④ 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)

⑤ φX174 RF DNA/HaeIII 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)

Fiche 29

Extraction des protéines cytosoliques

La préparation se fait en maintenant les échantillons à 4°C

- Entretenir les cellules dans des boîtes de Pétri^① de diamètre 145 mm
- Lorsque les cellules sont à « confluence » rincer 2 fois les boîtes avec 15 mL de PBS^② froid
- Trypsiner ou gratter les cellules
- Gratter les cellules et transférer dans des microtubes
- Rincer 2 fois avec du PBS
- Sécher le culot cellulaire, les cellules peuvent être maintenues à -80°C jusqu'au jour de l'extraction des protéines.
- Reprendre des culots dans un tampon hypotonique préparé extemporanément^③ contenant 2% de cocktail inhibiteur de protéases^④
- Lyser les cellules à l'aide d'un sonicateur^⑤ 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 18*)

① Plastiques à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France

② PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France

③ (PBS 0,1% et protéase inhibitor cocktail 2%) soit (500µL PBS 1x et 4,4mL H₂O miliQ ⇨ PBS 0,1%) + (100µL Protéase cocktail)

④ Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

⑤ *Cell sonifier disruptor*, Branson[®]

Fiche 30

Dosage vitamine B12/B9

Technique radioisotopique, SimulTRAC-SNB^①

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant.

- Extraire les échantillons protéiques à partir des cultures cellulaires comme décrit sur la (*Fiche 29*)
- Les courbes d'étalonnages sont réalisées sur 6 points :
 - Vitamine B12 (0, 74, 148, 296, 740 et 1480 pM)
 - Folates (0, 2.3, 4.5, 9.1, 23 et 45 nM).
- Déposer 200 µL d'homogénat protéique ou de milieu de culture dans un tube à hémolyse
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT^②, 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 gamma^③

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

② DTT : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

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

③ Compteur 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 31**Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique**

❖ Préparation des réactifs :

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

	Homocystine ① (MM 268,4)	Homocystine d8 ^③ (98%)	MMA ^② (118.09 ; >99%)	MMA d3 ^④ (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					
H₂O Milli Q			100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
	Vortexer, soniquer		Vortexer, soniquer			
Concentration sol. mère	1 mM (d'homocystéine)	1 mM (d'homocystéine 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 nouveau 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 DTT^② 200 mmol/L
- Préparation des contrôles d'homocystéine :
Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilisé^⑤

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

- Préparation de la solution d'extraction MeOH 0,1% (v/v) d'acide formique^②

❖ Préparation des échantillons :

- Préparation des extraits protéiques selon la procédure décrite précédemment (*fiche 29*)
- 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'H₂O 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5^{ème})
- Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

❖ Méthodes :

- Lancement de la méthode 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) lyophilisé (Chromsystems)

• Colonne UPLC : Acquity UPLC HSS T3 (1,8µm ; 2,1 x 50 mm)

• UPLC Acquity Waters, Boucle d'injection de 10 µl

• Spectromètre de Masse 4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex

Fiche 32**Mesure de l'activité méthionine synthase, MTR**

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 ₂ H/KH ₂ (PO ₄) pH 7,2	100 mM	1 M	10 µL
DTT ^① (H ₂ O)	25 mM	580 mM	4.3 µL
Na/Ascorbate ^① (H ₂ O)	25 mM	720 mM	3.5 µL
SAM ^① (H ₂ O)	20 µM	2 mM	1 µL
Methyl-B12 ^② (H ₂ O)	50 µM	5 mM	1 µL
Homocystéine ^① (HCl 1N)	5 mM	500 mM	1 µL
MeTHF ^① (DTT 10 mM)	0,225 mM	22,5 mM	1 µL
[¹⁴ C]MeTHF ^③ (DTT 10 mM)	25 µM	2,5 mM	1 µL
H ₂ O 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 colonnes^④ 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 (100 µL) puis rincer le gel avec 3x1 mL d'eau milli-Q
- La radioactivité est comptée dans des tubes en Polyéthylène^⑤ en mélangeant 1 volume d'éluat à 4 volumes de Pico-Fluor^{TM⑥}
- La [¹⁴CH₃] méthionine produite a été mesurée sur un analyseur^⑦ TRI-CARB, 1900CA
- Eluer le [¹⁴C] méthyl-tétrahydrofolate en régénérant les colonnes avec 4x5mL d'acide chlorhydrique

① DTT(H₂O), Na/Ascorbate(H₂O), SAM(H₂O), MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② Methyl-B12(H₂O) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

③ [¹⁴C]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 33**Mesure de l'activité de la Méthylène tétrahydrofolate Réductase, MTHFR**

- La réaction est réalisée dans un **volume final de 200 µL** contenant

	Concentration réaction	Concentration stock	<i>Volume</i>	Volume réactionnel par échantillon : 200 µL
Protéines			40 µL	40 µL
Tampon phosphate potassium pH 6,3	180 mM	1,8 M	20 µL	<i>Mix 160 µL</i>
Ménadione (K3) ^①	3,6 mM	90 mM	8 µL	
EDTA ^①	1,4 mM	0,5 M	0,56 µL	
Ascorbate ^①	7,2 mM	720 mM	2 µL	
FAD ^①	178 µM	17,8 mM	2 µL	
MeTHF ^①	50 µM	22,5 mM	0,44 µL	
[¹⁴ C]MeTHF ^②	50 µM	2,5 mM	2 µL	
H ₂ O 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 suivantes :

	Concentration réaction	Concentration stock	<i>Volume réactionnel par échantillon</i>
Formaldéhyde ^①	20,6 mM	1 M	10 µL
Dimédone ^①	103,1 mM	0,25 M	200 µL
Acétate de sodium ^①	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 toluène^③ (sous une hotte aspirante)

- Vortex pendant 30 s
- Centrifuger à 1000 g pendant 5 min à température ambiante
- La hase organique (supérieure) contient le [¹⁴C] provenant du produit final de la réaction : le méthylènetetrahydrofolates
- Ajouter chaque phase à 4 mL de Pico-FluorTM④ dans des tubes en polyéthylène^⑤ avant de compter la radioactivité du [¹⁴C] contenu dans chaque phase sur un compteur béta^⑥

① Ménadione bisulfite, EDTA, ascorbate, FAD, MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

② [¹⁴C]MeTHF : GE Healthcare, (91898 Orsay Cedex, France)

③ Toluène : VWR International, 94126 Fontenay sous bois, France

④ Picofluor : Pico-FluorTM 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 34**Mesure de l'activité enzymatique
de la cystathionine- β -synthase (CBS)**

- La réaction est réalisée dans un **volume final de 100 μ L** contenant

Volume réac : 100μL	C réaction	C stock	Volume
Protéines	~ 400 μg	~20 g/L	~20 μ L
Tris-HCl pH 8.6	50 mM	2 M	2,5 μ L
PLP ^① (HCl 1N)	1 mM	100 mM	1 μ L
Sérine ^② (H ₂ O)	5 mM	100 mM	5 μ L
[¹⁴ C]Sérine ^③	0,05 μCi	50 μ Ci/mL	1 μ L
D, L Homocystéine ^④ (HCl 1N)	15 mM	500 mM	3 μ L
H ₂ O qsp 100 μ L			67,5 μ L

- 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 μ L d'acide formique (98%) et 350 μ L de tampons A^⑤
 - Centrifuger les tubes à 12.000 g pendant 10 min à 4°C
 - Eliminer le culot
 - Déposer le surnageant sur une colonne^⑥ PolyPrep Chromatography Columns préalablement équilibrée en ions Li⁺ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
 - La [¹⁴C] 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 [¹⁴C] cystathionine produite lors de la réaction est éluée en lavant le gel avec 2 x 3 mL de tampon B^⑦
 - La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 3 mL d'éluat et 15 mL de liquide de scintillation^⑧
- Compter la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA

① PLP : (Sigma-Aldrich, St Louis, France), pyridoxal 5'-phosphate, (vitamine B₆) 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, (\pm)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) dissout à 100mM dans H₂O

③ L-[U-¹⁴C] Sérine : (Amersham Pharmacia Biotech, CFB.72, (S)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) à 50 μ Ci/mL et 155mCi/mmol, soit 322 μ M.

④ D, L Homocystéine (Hcy) : (Sigma, H4628, 2-Amino-4-mercaptopbutyric 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 35

Mesure de la concentration des métabolites SAM et SAH à partir d'homogénats cellulaires

- Extraction des protéines comme décrit dans la (*Fiche n°29*)
- Supplémenter les échantillons avec 5% d'acide perchlorique^①
- Centrifuger à 20.000 x g à 4°C pendant 20 min
- Filtrer les surnageants sur un filtre^② de 0,45 µm
- Injecter 60 µL dans des inserts
- Placer les échantillons dans l'appareil à HPLC

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

- Expression recombinante de la protéine chimère TCII-oléosine

a. Clonage de TCII-oléosine dans le vecteur pcDNA₃

Les séquences entières des ADNc correspondant aux protéines chimères TCII-oléosine ou oléosine-TCII ou TCII ou oléosine obtenues par PCR (Fiche 37) ont été clonées dans le vecteur pcDNA₃ (Fiche 36). Pour cela, une PCR a été effectuée dans le but d'ajouter à la séquence ADNc les sites de restriction *Bam HI* (en 5') et *Xba I* (en 3') nécessaires à l'insertion dans le plasmide. Le plasmide pcDNA₃ contenant le gène de résistance à l'ampicilline, ainsi que les produits PCR purifiés sur gel ou par le kit de purification des produits PCR (Fiche 38) ont alors été digérés par les enzymes de restriction *Bam HI* et *Xba I* (Fiche 39) puis ont été purifiés par extraction phénol/chloroforme (Fiche 40). Une étape de ligation permet d'intégrer le fragment PCR dans le plasmide (Fiche 41). Des bactéries *E. coli* JM109 sont alors transformées par le plasmide recombinant par choc thermique (Fiche 42). Les bactéries transformées sont sélectionnées grâce à un milieu contenant de l'ampicilline et quelques colonies sont récupérées pour une culture secondaire (Fiche 47). Les cultures secondaires permettent d'effectuer des mini, midi ou maxi-préparations de plasmides (Fiches 44 à 46) afin d'obtenir du plasmide purifié. L'insertion des fragments PCR dans le plasmide est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% du plasmide recombinant linéarisé par simple digestion par *Bam HI* ou *Xba I* ou par libération de l'insert par double digestion *BamHI* et *Xba I*. La séquence des ADNc des protéines chimères dans le plasmide peut alors être vérifiée par séquençage (Fiche 49). Un clone contenant un plasmide recombinant pcDNA₃-TCII-oléosine ou oléosine-TCII ou TCII ou oléosine avec une séquence correcte est ainsi choisi. Le reste de la culture bactérienne est alors mis en souche permettant ainsi à tout moment la production du plasmide d'intérêt (Fiche 49).

b. Expression de TCII-oléosine

Transfection transitoire de TCII-oléosine dans le système neuroblastomes NIE-115

Les cellules NIE-115 sont transfectées par les différents plasmides obtenus grâce au transfectant Exgen (Fiche 50). Des témoins non transfectés et transfectés par le plasmide pcDNA₃ natif sont traités en parallèle. Une mise au point préalable a été effectuée en comparant différentes conditions de transfection à l'aide de méthodes colorimétriques utilisant des plasmides contenant le gène de la lactase ou de la β -galactosidase (Fiches 51 et 52). Les cellules non transfectées ou transfectées par le plasmide recombinant ou natif sont étudiées 48 heures après la transfection, pour leur capacité de liaison à la vitamine B12 radiomarqué soit sur des cellules en culture, c'est-à-dire entières, soit sur la fraction membranaire (Fiche 53).

Transfection stable de TCII-oléosine dans le système neuroblastome NIE-115

Après avoir vérifié la capacité de liaison de la protéine chimère à la vitamine B12, il a été procédé à la transfection stable des neuroblastomes avec les différents plasmides de protéines chimères. Une fois la transfection effectuée, une pression de sélection avec la généticine (gène de la résistance à la néomycine dans le plasmide pcDNA₃) a été exercée sur les cellules pour sélectionner les cellules transfectées (Fiche 54). Une fois l'apparition des clones, ceux-ci ont été sélectionnés par la technique des anneaux de clonage (Fiche 23). Environ 10 clones par type de plasmide transfecté ont été sélectionnés et environ 80% ont survécu à l'étape de clonage. Tous les clones ont été choisis pour leur capacité de liaison à la vitamine B12. L'expression du transgène a également été vérifiée régulièrement en PCR et en RT-PCR (Fiches 37 et 26).

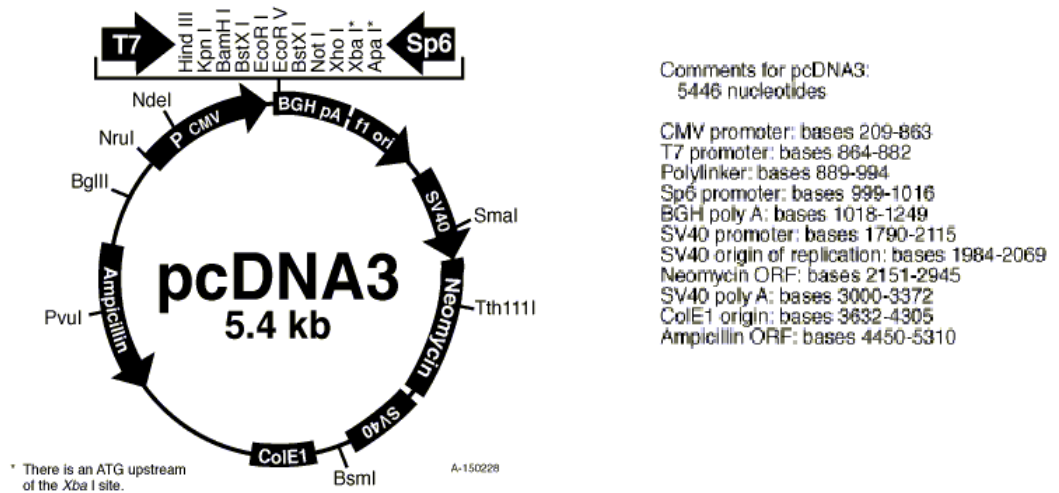
c. Fiches techniques 36 à 55

Fiche 36

Choix du plasmide de clonage

Le plasmide utilisé pour le clonage de la protéine chimère TCII oléosine est le pcDNA3^①. L'ADNc codant TCII-oléosine, oléosine-TCII et oléosine a été cloné au niveau des sites de restriction *Bam* HI et *Xba* I du polylinker.

Ce vecteur contient le promoteur fort du cytomégalo^virus humain (CMV) pour l'expression dans la majorité des cellules de mammifères, le promoteur T7 pour la transcription *in vitro*, les gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine, et l'origine de répllication de *E. coli*.



① Invitrogen, Life Technology, France

Fiche 37**Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

- Dans un microtube de 0,2 mL stérile à paroi fine^①, mélanger dans l'ordre :

	Volume	Concentration finale
H ₂ O ultra-pure stérile	qsp 50 µL	
Tampon PCR 10X ^②	5 µL	1X
MgCl ₂ 25 mM	2 µL	1 mM
dNTP 1,25 mM	4 µL	0,1mM
Amorce sens (12,5 µM) ^③	1 µL	0,25 µM
Amorce anti-sens (12,5 µM) ^③	1 µL	0,25 µM
ADN complémentaire, plasmidique	-	50-300 ng / 50 µL
Ampli Taq DNA polymérase ^④	0,25µL	1,25 U / 50 µL

- Programme PCR^⑤

	Température	Durée
	dénaturation initiale 94°C	2 min
30 à 35 cycles	dénaturation 94°C	15 sec
	hybridation T _m ⁽⁶⁾ - 5°C	20 à 60 sec (selon amorce)
	élongation 72°C	1 min/kb d'ADN à amplifier
	terminaison 72°C de la réaction	5 min

① Tube PCR en polypropylène ThermowellTM (Corning-Costar, Elmira, NY, USA)

② Tampon AmpliTaq[®] 10X : Tris-HCl 100 mM (pH 8,3), KCl 500 mM (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)

③ Voir liste détaillée des amorces (Fiche 3)

④ AmpliTaq[®] DNA Polymerase : 5 U/µL (Perkin Elmer). Enzyme dépourvue d'activité exonucléase 3'→5' et possédant une activité transférase terminale-like ajoutant le plus souvent une base A non matricielle en 3' des amplimères

⑤ Thermocycleur : GeneAmp[®] PCR System 2400 (PE Biosystems, Foster City, CA 94404, USA)

⑥ T_m = T_m le plus bas des 2 amorces du couple choisi

Oligonucléotides utilisés pour le clonage des protéines chimères

gène	Nom amorce	Séquence amorce ^{①④} 5'→3'	Tm ^③ (°C)	Taille produit PCR (mer)
Insertion de l'ADNc des protéines chimères dans pcDNA₃				
TCII-oléosine	TCII sens (site BamHI) ^②	cgc gga tcc acc atg agg cac ctt ggg gcc ttc	70 ^⑤	1818
	Oléo antisens Xba I ^②	cta gtc tag att atg atg acc tct taa cat c	64	
Oléosine-TCII	oléo sens (site BamHI) ^②	cgc gga tcc acc atg gct act gct act gat cgt	62	1758
	TCII antisens (site XbaI) ^②	cta gtc tag act acc agc taa cca gcc tca g	66	
Oléosine	oléo sens (site BamHI) ^②	cgc gga tcc acc atg gct act gct act gat cgt	60	528
	Oleo antisens Xba I ^②	cta gtc tag att atg atg acc tct taa cat c	60	
Amplification pour vérifier la présence de l'ADNc et L'ARNm des protéines chimères				
jonction TCII-oléosine	TC oléo seq S	ccc cta ctt aac ctc cgt ga	62	355
	TC oléo seq AS	gga gag gag caa cag agt gc	64	
jonction oléosine TCII	Oléo TC seq S	cga cag gta cat ggg acg ac	68	350
	Oleo TC seqAS	cct agg agg cac tgc tgg ta	64	
Oléosine	oléo sens (site BamHI) ^②	cgc gga tcc acc atg gct act gct act gat cgt	62	207
	TC Oleo seq AS	gga gag gag caa cag agt gc	64	
TCII	TCII sens (site BamHI) ^②	cgc gga tcc acc atg agg cac ctt ggg gcc ttc	70 ^⑤	206
	Oleo TC seq AS	cct agg agg cac tgc tgg ta	60	
pcDNA3 sans insert	SENS pcADN3	ggc taa cta gag aac cca ct	60	238
	ANTISENS pcADN3	tgg caa cta gaa ggc aca gt	60	

① Les oligonucléotides ont été synthétisés par le service commun de biologie moléculaire

② Site de restriction en gras ; séquence de Kozak souligné ; codon stop souligné en pointillé.

③ Le Tm est calculé (4°C pour G ou C et 2°C pour A ou T) sans tenir compte des sites de restriction

④ Les oligonucléotides utilisés 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>

⑤ Température d'utilisation préconisée à 55°C

Fiche 38

Purification des produits PCR^①

- Ajouter 5 volumes de tampon (PB)^② pour 1 volume de produits de PCR à purifier et mélanger
- Appliquer le mélange sur une microcolonne formée d'un disque de silice, adaptée sur un microtube de 1,5 mL
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- Eliminer le filtrat
- Ajouter 0,75 mL de tampon de lavage (PE) puis centrifuger 1 min à 10000 x g
- Eliminer le filtrat et centrifuger à nouveau 1 min à 12000 x g pour assécher la silice
- Placer la microcolonne sur un tube propre
- Verser 30 µL d'H₂O ultrapure (pH 7,0-8,5) ou de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5) sur la colonne
- Laisser 1 min à température ambiante. Centrifuger 1 min à 10000 x g
- Quantifier l'ADN élué sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme de standards

Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose^③

- Découper l'agarose contenant la bande d'ADN à purifier à l'aide d'une lame de scalpel stérile
- Déterminer la masse d'agarose découpée et ajouter 3 volumes de tampon de dissolution (QG1) pour 1 volume de gel (100 mg de gel \cong 100 µL)
- Afin de faire fondre le gel, chauffer à 50°C pendant 10 min en mélange au vortex le tube 2 à 3 fois durant l'incubation
- Appliquer le mélange sur une microcolonne renfermant un disque de silice. La colonne est adaptée sur un microtube de 1,5 mL
- Centrifuger 1 min à 10000 x g
- Eliminer le filtrat
- Ajouter 0,75 mL de tampon de lavage (PE) et centrifuger 1 min
- Eliminer le filtrat, et centrifuger à nouveau 1 min à 12000 x g pour assécher la silice
- Placer la microcolonne sur un tube propre
- Ajouter 30 µL d'H₂O ultrapure (pH 7,0-8,5) ou de Tris-HCl 10 mM (pH 8,5)
- Laisser 1 min à température ambiante. Centrifuger 1 min à 10000 x g
- Quantifier l'ADN sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme de standards

① QIAquick™ PCR Purification Kit (Qiagen), Courtabœuf, France

② Tampon PB : tampon optimisé pour favoriser l'adsorption de l'ADN (0,1-10 kb) sur la silice

③ QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen), Courtabœuf, France

Fiche 39

Coupage de l'ADN par une enzyme de restriction

- Mélanger 75 ng à 2,5 µg d'ADN (vecteur plasmidique ou insert) avec 3 µL de tampon 10X spécifique de l'enzyme^①, ajuster le volume à 30 µL avec de l'eau ultrapure stérile et ajouter 10 à 20 U d'enzyme de restriction^②.
- Incuber à 37°C (ou à la température recommandée) pendant 1 à 2 h selon l'enzyme.

① Dans le cas de coupures multiples, s'il y a incompatibilité entre les tampons des deux enzymes qui empêche la double digestion simultanée, commencer par digérer avec l'enzyme dont le tampon est le moins concentré en sel et/ou précipiter l'ADN entre chaque réaction de coupure

② New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA

Fiche 40**Extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique des ADN
(vecteur plasmidique et insert)**

1) Extraction phénol-chloroforme

- Ajouter à 100 µL d'une solution d'ADN, 100 µL d'un mélange phénol^①/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, v/v/v) et mélanger au vortex 1 min
- Centrifuger 5 min à 12000 x g (température ambiante)
- Récupérer la phase aqueuse supérieure
- Rincer la phase phénolique par ajout de 100 µL de tampon TE^② et vortexer 2 min
- Centrifuger 2 min à 12000 x g (température ambiante)
- Récupérer la phase aqueuse supérieure et la mélanger avec la précédente
- Extraire les 200 µL de phase aqueuse par 200 µL d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24:1, v/v), vortexer 1 min
- Centrifuger 5 min à 12000 x g (température ambiante)
- Récupérer la phase aqueuse supérieure (~200 µL)

2) Précipitation à l'éthanol

- Ajouter 1/10 d'acétate de Na 3M (pH 5,2)^③
- Bien mélanger
- Ajouter 5 volumes (1 mL) d'éthanol absolu (-20 °C)
- Mélanger doucement en inversant lentement le tube plusieurs fois
- Mettre à -20 °C pendant au moins 1 h ou à -80 °C pendant au moins 30 min
- Centrifuger 15 min à 12000 x g (4 °C)
- Éliminer le surnageant
- Rincer le culot à l'éthanol 70% (-20 °C)
- Centrifuger 10 min à 12000 x g (4 °C)
- Sécher brièvement le culot dans une cloche à dessiccation, au Speed Vac^{®④} ou sous hotte
- Resuspendre le culot (visible ou non) dans un volume approprié d'eau ultrapure ou de tampon TE

Rendement de récupération à ~70% (pour les plasmides)

① Phénol équilibré dans du Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0)

② **Tampon TE** : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)

③ Acétate de sodium 3 M ajusté à pH 5,2 avec de l'acide acétique glacial

④ Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA

Fiche 41**Ligature de fragments de restriction dans le vecteur pcDNA3^①**

- Dans un tube de 1,5 mL stérile, mélanger dans l'ordre :

Vecteur plasmidique digéré	30 ng
Tampon de ligature 10X ^②	2 µL
Insert digéré	ADN qsp ratio insert:vecteur de 1:1 et 3:1 ^③
ADN ligase de T4 ^④	80 U
H ₂ O ultrapure stérile	qsp 20 µL

- Effectuer un témoin de religature : ADN plasmidique simplement digéré sans insert et avec ligase (normalement beaucoup de colonies)
- Effectuer un témoin de coupure : ADN plasmidique doublement digéré sans insert et sans ligase (normalement pas ou peu de colonies)
- Effectuer un témoin de double coupure : ADN plasmidique doublement digéré sans insert et avec ligase (normalement pas ou peu de colonies)
- Incuber 16 h à 16°C (cryothermostat)

① Invitrogen, Life Technology, (95613 Cergy Pontoise Cedex France)

② Tampon de ligature A 10X (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) : Tris-HCl 500 mM (pH 7,5), MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, BSA 250 µg/mL (conserver en aliquotes à -20°C car l'ATP se dégrade rapidement)

③ Détermination de la quantité d'insert à ajouter en fonction du ratio insert:vecteur choisi :

$$\frac{50 \text{ de vecteur} \times \text{taille de l'insert (kb)}}{\text{taille du vecteur (kb)}} \times \text{ratio molaire insert:vecteur} = \text{ng d'insert}$$

④ T4 DNA Ligase : 400 U/µL (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). La ligase est diluée au 1/5^{ème} dans du tampon de ligature 1X. Ajouter 1 µL de la dilution au milieu réactionnel

Fiche 42

Transformation des bactéries

A) Transformation par choc thermique

- Dans un tube de 1,5 mL stérile préalablement refroidi sur la glace, mélanger dans l'ordre 2 µL de produit de ligature et 50 µL de la suspension d'*E. coli* JM109^①. Un plasmide contrôle est fourni avec les JM109 permettant d'évaluer le rendement de transformation du système
- Placer le tube sur la glace pendant 20 min. Eviter de bousculer le tube
- Plonger rapidement le tube dans un bain-marie à exactement 42°C pendant 45-50 sec
- Transférer rapidement le tube dans la glace
- Ajouter 950 µL de milieu SOC^② à température ambiante
- Incuber 1h30 à 37°C sous agitation horizontale (~150 tr/min)

B) Transformation par électroporation

- Dans un tube de 1,5 mL stérile préalablement refroidi sur la glace, mélanger dans l'ordre 2 µL de produit de ligature et 50 µL de la suspension d'*E. coli* JM109^①. Un plasmide contrôle est fourni avec les JM109 permettant d'évaluer le rendement de transformation du système
- Placer le mélange dans une cuvette (0,2 cm) d'électroporation stérile préalablement refroidie sur la glace et éliminer les bulles en tapotant la cuvette
- Essuyer soigneusement la cuvette avant de la placer entre les électrodes de l'électroporateur^②
- Effectuer l'impulsion en pressant le bouton de l'appareil (Programme Ec2 pour *E. coli* : 1 impulsion à 2,5 kV)
- Ajouter 950 µL de milieu SOC^③ à température ambiante dans la cuvette
- Transvaser le tout dans un tube de 15 mL
- Incuber 1h30 à 37°C sous agitation horizontale (~150 tr/min)

① Souche compétente JM109 : Souche rendue compétente par une perméabilisation de sa membrane plasmique avec du CaCl₂ (Promega). Souche dépourvue de système de recombinaison, qui supporte la croissance de vecteurs renfermant des mutations *ambre* et qui modifie mais ne restreint pas l'ADN transfecté

Génotype : *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*

② Micropulser (Bio-Rad)

③ Milieu SOC : pour 100 mL de milieu, 2 g Bacto[®]-Tryptone, 1,5 g Bacto[®]-Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 1 mL NaCl 1 M, 0,25 mL KCl 1 M, 98 mL H₂O distillée. Autoclaver. Ajouter 1 mL Mg²⁺ 2 M (MgCl₂.6 H₂O 1M / MgSO₄.7H₂O 1 M) filtré et 1 mL glucose 2 M filtré. Stériliser le milieu complet par filtration sur membrane de 0,22 µm

Fiche 43

Sélection des bactéries transformées par le plasmide recombinant

- Étaler au râteau 100 µL de la suspension bactérienne sur une boîte de Pétri LB-gélose^① contenant de l'ampicilline^② à une concentration finale de 100 µg/mL. Pour les plasmides possédant un mode de sélection supplémentaire *via* le gène *lacZ* (comme le plasmide contrôle) étaler au préalable l'IPTG^③ à 0,5 mM final puis le X-Gal^④ à 40 µg/mL final
- Centrifuger à 300 g pendant 5 min le reste de la suspension bactérienne et retirer le surnageant pour n'en laisser que 100 µL
- Homogénéiser le culot bactérien dans ce volume et étaler la totalité sur une boîte de Pétri sélective
- Incuber 1 nuit à 37°C
- Compter les colonies bactériennes sur chaque boîte. Les bactéries transformées avec un plasmide contenant le gène *lacZ* ininterrompu, sont colorées car elles métabolisent le X-Gal en un substrat bleu sous l'action de l'inducteur IPTG de l'opéron.

Culture secondaire des colonies sélectionnées

- Gratter la surface d'une colonie isolée à l'aide d'un embout de pipette stérile
- Ejecter l'embout dans un tube conique stérile de 15 mL contenant 3 mL de milieu LB liquide^⑤ à température ambiante supplémenté avec de l'ampicilline à 100 µg/mL
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation horizontale vigoureuse (~200 tr/min)
- Purifier l'ADN plasmidique à partir de 2 mL de suspension bactérienne par mini-préparation

① Milieu LB solide : autoclaver 7,5 g de Bacto[®]-Agar (Difco, Detroit, MI, USA) dans 500 mL de milieu LB

② Solution d'ampicilline à 50 mg/mL stérilisée par filtration et congelée en aliquotes à -20°C

③ 100 µL d'une solution d'IPTG à 100 mM stérilisée par filtration

④ 20 µL d'une solution de X-Gal à 50 mg/mL dans N, N' diméthylformamide (photosensible)

⑤ Milieu LB liquide : pour 1 L de milieu, 10 g Bacto[®]-Tryptone, 5 g Bacto[®]-Yeast Extract (Difco, Detroit, MI, USA) et 5 g NaCl. Ajuster à pH 7,0 avec NaOH

Fiche 44

Méthode pour isoler rapidement l'ADN plasmidique pour le criblage de clones bactériens

La veille :

Ensemencer les colonies dans les tubes de milieu LB (5 mL) supplémentés en antibiotique (par exemple 10 µL d'ampicilline 50 mg/mL).

Le jour de l'isolement de l'ADN plasmidique

A) Microprep d'après Kelly et al. (1999)^①

Cette méthode rapide n'est pas utilisable avec toutes les enzymes de restriction car cette technique ne produit pas un plasmide très pur. Les enzymes *Bam HI*, *Xba I* et *Eco RI* sont capables de digérer du plasmide issu de microprep. Pour toutes les autres enzymes de restriction, il est préférable de faire un test préalable.

- Prélever 500µL d'une préculture bactérienne fraîche et les transférer dans un tube de 1,5 mL
- Centrifuger 1 min à 14 000 g (12 200 rpm).
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les culots bactériens dans 19 µL d'H₂O + 1µL de RNase A (10 mg/mL) par un mélange vigoureux au vortex
- Faire bouillir le tube pendant 1 min pour libérer le plasmide (100° au bain marie sec)
- Centrifuger 1 minute pour culotter les débris bactériens.
Il y a suffisamment de surnageant pour transférer la quantité nécessaire dans le mélange de digestion (en général 2µL)

B) Miniprep (par lyse alcaline selon la méthode décrite par Birboim et Doly (1979)^②

Cette méthode permet d'obtenir du plasmide moyennement purifié qui est digérable par un panel d'enzymes de restriction plus important qu'avec les microprep. Cette méthode est idéale pour le criblage d'un grand nombre de clones car peu coûteuse bien que plus longue que la microprep

- Centrifuger 1,5 mL de préculture à 5000 tours par minutes pendant 5 min à température ambiante
- Eliminer le surnageant par aspiration, resuspendre le culot dans 100 µL de solution de resuspension^③ et de RNase à 100 µg/mL. Vortexer (car les bactéries ne sont pas encore lysées)
- Ajouter 200 µL de la solution de lyse^④. Mélanger doucement (surtout ne pas vortexer risque de casser le chromosome bactérien) avant d'incuber 5 min dans la glace.
- Ajouter 150 µL de solution de neutralisation^⑤. Mélanger doucement avant d'incuber 5 min dans la glace (précipitation des protéines de membrane et du chromosome bactérien qui est attaché à la membrane).
- Centrifuger à 12 000 tours par minutes pendant 5 min, puis récupérer le surnageant qui contient l'ADN plasmidique.
- Ajouter 25 µL de NaCl 5M et 2 volumes d'éthanol 100% (soit 1mL). Centrifuger à 12 000 tours par minutes pendant 12 min.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot.
- Resuspendre le culot dans 50 µL d'H₂O milliQ.
Utilisation de 5 à 10 µL pour les tests de digestion

① Kelly *et al.* (1999) *Biotechniques*, 26: 868-870

② Birboim et Doly (1979) *Nucleic acids Res.*, 6: 1513-23

③ Solution de resuspension : Tris-HCl pH 8 25 mM, EDTA 10 mM. Conserver au frais et utiliser à température ambiante

④ Solution de lyse : NaOH 0,2 M, SDS 1%. Conserver à température ambiante

⑤ Solution de neutralisation : Acétate de potassium 3 M, Acide acétique glacial 2 M, pH à 5,6. Conserver au frais

Fiche 45

Purification de petites quantités d'ADN plasmidique par un Mini-kit^①

Cette méthode est préférentiellement utilisée pour obtenir un plasmide purifié de toutes impuretés pour les digérer avec des enzymes de restriction délicates ou pour les amplifier par PCR, pour le séquençage ou encore pour effectuer une transfection. Pour un criblage classique de clones bactériens, il est préférable d'utiliser les techniques de la *fiche 46* car moins coûteuses et plus rapides.

- Transférer 1 à 2 mL de suspension bactérienne obtenue après une nuit de culture à 37°C, dans un microtube de 2 mL
- Centrifuger les cellules à 300 g pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 200 µL de solution de suspension^①
- Ajouter 250 µL de solution de lyse^① et mélanger doucement par inversion du tube
- Ajouter 250 µL de solution de neutralisation^① et mélanger à nouveau doucement par inversion du tube
- Centrifuger à 14000 g pendant 5 min
- Récupérer le surnageant dans un microtube stérile et mélanger avec 200 µL d'une suspension de terre de diatomée (exosquelette de SiO₂)^①
- Verser la suspension dans une microcolonne^① munie d'un filtre, adaptée sur un microtube
- Centrifuger à 14000 g pendant 30 sec
- Eliminer le filtrat
- Laver la matrice avec 500 µL de solution de lavage^① et centrifuger 30 sec
- Eliminer le filtrat et assécher la matrice par une centrifugation de 2 min
- Placer la colonne sur un microtube propre
- Eluer l'ADN plasmidique avec 50 µL H₂O ultrapure stérile, centrifuger 30 sec

① Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France)

Fiche 46

Purification de grandes quantités d'ADN plasmidique avec un **Midi-kit ou un **Maxi-kit**^①**

- Effectuer une préculture bactérienne d'*E. coli* JM109 transformées dans 3 mL de milieu LB contenant de l'ampicilline pendant 8h à 37°C sous agitation horizontale vigoureuse
- Inoculer 100 mL de milieu LB-ampicilline contenu dans un Erlenmeyer de 250 mL avec 0,2 mL de préculture (1/500^{ème}) et incuber une nuit à 37°C sous agitation vigoureuse
- Centrifuger à 6000 g pendant 15 min une suspension bactérienne de 30 mL ou 100 mL
- Eliminer toutes traces de surnageant en renversant délicatement le tube
- Reprendre la totalité du culot bactérien dans 4 mL ou 10 mL de tampon de suspension^② (P1)
- Ajouter 4 mL ou 10 mL de tampon de lyse^③ (P2), mélanger doucement par inversion du tube 4 à 6 fois et incuber 5 min à température ambiante
- Ajouter 4 mL ou 10 mL de tampon de neutralisation^④ (P3) glacé, mélanger immédiatement mais doucement par inversion du tube 4-6 fois et incuber sur la glace pendant 15 min ou 20 min
- Mélanger puis centrifuger à 20000 g pendant 30 min (4°C)
- Prélever promptement le surnageant limpide contenant l'ADN plasmidique
- Recentrifuger le surnageant à 20000 g pendant 15 min (4°C) (rotor JA-14) et récupérer le surnageant
- Pendant ce temps, équilibrer une colonne échangeuse d'anions^⑤ avec 4 mL ou 10 mL de tampon d'équilibration^⑥ QBT en laissant ce dernier s'écouler par gravité
- A l'issue de la centrifugation, verser immédiatement le surnageant dans la colonne et laisser le pénétrer la résine par gravité
- Laver la colonne avec 2 x 10 mL ou 2 x 30 mL de tampon QC^⑦
- Eluer l'ADN avec 5 mL ou 15 mL de tampon QF^⑧, collecter l'ADN dans un tube stérile en polypropylène de 30 mL à bouchon
- Précipiter l'ADN avec 3,5 mL ou 10,5 mL (0,7 volume) d'isopropanol à température ambiante (cette température minimise la précipitation des sels)
- Mélanger et centrifuger à 5000 x g pendant 1h (4°C)
- Renverser délicatement le surnageant
- Laver le culot translucide d'ADN avec 2 mL ou 5 mL d'éthanol à 70% (v/v) à température ambiante
- Centrifuger à 5000 x g pendant 1h
- Aspirer doucement le surnageant sans perturber le culot
- Sécher le culot à l'air pendant 5-10 min et le solubiliser dans un volume approprié (~200 µL) d'eau ultrapure stérile ou de tampon TE^⑨
- Déterminer la concentration en ADN au spectrophotomètre à 260 nm et analyser sur gel
- Stocker l'ADN plasmidique purifié sous forme d'aliqots à -20°C

① Plasmid Purification Midi Kit et Maxi Kit (Qiagen, 91974, Courtaboeuf cedex)

② Tampon de suspension (P1) : Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM contenant de la A 100 µg/mL (extemporané)

③ Tampon de lyse (P2) : NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v)

④ Tampon de neutralisation (P3) : acétate de potassium 3 M (pH 5,5)

⑤ Qiagen[®]-tip 100 et Qiagen[®]-tip 500 : colonnes renfermant une résine DEAE

⑥ Tampon d'équilibration (QBT) : MOPS 50 mM (pH 7,0), NaCl 750 mM, isopropanol 15% (v/v), Triton[®] X-100 0,15% (v/v)

⑦ Tampon de lavage (QC) : MOPS 50 mM (pH 7,0), NaCl 1,0 M, isopropanol 15% (v/v)

⑧ Tampon d'éluion (QF) : Tris-HCl 50 mM (pH 8,5), NaCl 1,25 M, isopropanol 15% (v/v)

⑨ Tampon TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)

Fiche 47

Séquençage automatique de l'ADN par technique fluorescente^①

Le principe général de cette technique repose sur un arrêt statistique de la réaction de polymérisation par des didésoxynucléotides (ddNTP)^②. Les 4 ddNTP sont marqués par des fluorochromes différents (fluorescéine, NBD, rouge Texas et tétraméthylrhodamine) et incubés dans un même tube. Les brins d'ADN néosynthétisés sont séparés par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide. La migration se fait à front perdu et les ADN marqués sont identifiés en sortie de gel par un photomètre à laser couplé à un ordinateur.

A) Réaction de séquençage

- Mélanger dans un microtube de 0,2 mL stérile :

ADN db	5 à 20 ng	pour un produit de PCR purifié (500 -1000 pb)
Amorce ^③ S ou AS	3,2 pmol	
Terminator mix ^④	8,0 µL	
H ₂ O ultrapure	qsp	20 µL

- Programme d'amplification :

	Température	Durée
25 cycles	dénaturation	96°C
	hybridation	T _m - 5°C
	élongation	60°C

B) Retrait des ddNTP non incorporés par précipitation des produits de la réaction

- Transvaser le mélange réactionnel dans un microtube de 1,5 mL stérile
- Ajouter 19 µL de MgCl₂ 2 mM puis 55 µL d'éthanol 95% (v/v) et vortexer brièvement
- Laisser précipiter à température ambiante pendant au moins 15 min
- Centrifuger à 14000 x g pendant 20 min
- Aspirer promptement la totalité du surnageant (contenant les ddNTP en excès) avec une pipette Pasteur stérile branchée sur une pompe à vide
- Sécher le culot (visible ou non) pendant 1-3 min au Speed Vac[®]

C) Séquençage automatique

Réalisé par le Service Commun de Biologie Moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, par Mme N. Monhoven sur un séquenceur ABI PRISM 373A piloté par le logiciel Sequencing Analysis Software v. 1.2.1 (PE Biosystems)

^① ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit avec l'AmpliTa^q® DNA Polymerase, FS (Perkin Elmer, France)

^② Sanger *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 : 5463-5467

^③ Amorce spécifique du produit de PCR (séquençage direct)

^④ Terminator premix : (A/G/C/T)-DyeDeoxy Terminator, dITP, dATP, dCTP, dTTP dans tampon Tris-HCl (pH 9,0) contenant du MgCl₂ et l'AmpliTa^q® DNA polymerase, FS. Cette Ta^q ADN polymérase est une forme mutée à l'activité 5'→3' exonucléase négligeable et qui ne fait quasiment plus de discrimination entre les ddNTP fluorescents et les dNTP

Fiche 48

Mise en souche de culture bactérienne^①

- Dans 0,85 mL de culture bactérienne, ajouter 0,15 mL de glycérol stérile^②
- Mélanger la culture pour assurer la dispersion du glycérol. Transférer la culture dans un cryotube^③
- Refroidir la culture dans un mélange éthanol / carboglace ou dans de l'azote liquide, le stocker ensuite à -80°C à long terme.
- Pour récupérer les bactéries, gratter la surface congelée de la culture avec un embout de pipette stérile et éjecter l'embout dans un tube conique stérile de 15 mL contenant 3 mL de milieu LB liquide^④ à température ambiante supplémenté avec l'antibiotique^⑤ approprié
- Remettre la souche bactérienne à -80°C
- Incuber une nuit à 37°C sous agitation horizontale vigoureuse (~200 tr/min)

① Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning : a laboratory manual

② Glycérol stérilisé à l'autoclave

③ Cryotube, Nalgène (VWR international)

④ Milieu LB liquide : pour 1 L de milieu, 10 g Bacto[®]-Tryptone, 5 g Bacto[®]-Yeast Extract (Difco, Detroit, MI, USA) et 5 g NaCl. Ajuster à pH 7,0 avec NaOH

⑤ Ampicilline à une concentration finale de 100 µg/mL

Fiche 49**Transfection transitoire de cellules NIE-115
par le pcDNA₃-TCII-oléosine, pcDNA₃-oléosine-TCII, avec l'Exgen^①**

A) La veille de la transfection

- ensemencer 1,2.10⁵ cellules TC7 par puits de plaque 24 puits^② dans 0,5 mL de milieu

B) Une heure avant la transfection

- Remplacer le milieu de culture de chaque puits à transférer par 0,5 mL de milieu sans SVF.

C) La transfection^③

- Pour chaque transfection :
 - Mélanger 0,5 µg du plasmide d'intérêt^④ dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL. Homogénéiser au vortex et centrifuger brièvement
 - Mélanger 2,5 µL d'Exgen dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL
 - Homogénéiser au vortex
 - Ajouter la solution d'Exgen à la solution d'ADN et non l'inverse. Vortexer immédiatement et laisser reposer 10 min à température ambiante
 - Déposer goutte à goutte les 100 µL de mélange Exgen / ADN sur le milieu et mélanger rapidement par agitation douce
- Placer les cellules à 37°C et à 5% de CO₂ pendant 4 à 6 heures
- Remplacer le milieu de chaque puits par 0,5 mL de milieu avec SVF
- Replacer les cellules à 37°C et à 5% de CO₂ pendant 48 heures

① Exgen 500 (Euromedex, France)

② Plaque 24 puits (Costar, Corning Inc. NY, USA)

③ Mise au point réalisée avec soit le plasmide pLacZ exprimant la lactase (fourni par M. J.N. Freund (INSERM U.381, Strasbourg, France)) soit avec le plasmide pCMVβ (Clontech) exprimant la β-galactosidase

④ pcDNA₃-TCII-oléosine et pcDNA₃-oléosine-TCII : l'ADNc a été insérée aux sites de restriction Bam HI et Xba I du plasmide pcDNA₃ (Invitrogen, Life Technology, France). Une transfection avec les plasmides pcDNA₃-oléosine et pcDNA₃-TCII sert de contrôle. Une transfection avec le plasmide pcDNA₃ natif sert de témoin négatif de transfection.

Fiche 50**Détection de l'activité lactase in situ avec le X-Fuc comme substrat^①**

Après 48 h de transfection avec différentes conditions de quantité d'ADN^② et d'Exgen 500^③ testées, les cellules sont utilisées pour visualiser le nombre de cellules transfectées et ainsi choisir les meilleures conditions de transfection.

- Les cellules sont rincées deux fois avec 0,5 mL de tampon PBS^④
- Elles sont fixées 5 min dans 500 µL de paraformaldéhyde^⑤ 1% (PAF 4% dilué dans du PBS)
- Elles sont lavées deux fois avec 500 µL de tampon maléate 0,1 M pH 5,8^⑥
- Préparer la solution de coloration et déposer 100 µL par puits de plaque 24 :

Solution stock	concentration finale	solution de coloration 1mL
Tampon maléate 0,1M pH5,8 ^⑥	810 µL	
X-Fuc 25mM ^⑦	1mM	44µL
Potassium ferrocyanide 50mM ^⑧	3,4mM	68µL
Potassium ferricyanide 50mM ^⑧	3,4mM	68µL
PCMBs 50mM ^⑨	0,5mM	10µL

- Incuber 3h dans une boîte humide à l'abri de la lumière et à 37°C
- Rincer à l'eau
- Déshydrater dans des bains d'éthanol successifs (70°, 95°, 100°)
- Observer au microscope et compter le nombre de cellules bleues pour déterminer les meilleures conditions de transfection

① (Lojda and Kraml, 1971)

② Plasmide pLacZ exprimant la lactase (don de M. J.N. Freund (INSERM U.381, Strasbourg, France))

③ Exgen 500 (Euromedex, France)

④ PBS sans Calcium ni Magnésium solution de Dulbecco

⑤ Paraformaldéhyde dissous à 4% dans du PBS⁽²⁾ dissous en chauffant sous hotte chimique et ajustement du pH à 7,4 avec de la soude 1N (peut être stocké à -20°C)

⑥ Tampon maléate 0,1M pH5,8 : 0,1M acide maléique ajuster le pH à 5,8

⑦ X-Fuc : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-fucopyranoside (Sigma) est dissous à 10 mg/mL (25mM) dans du diméthylformamide. La solution stock est conservée à -20°C

⑧ Potassium ferrocyanide et Potassium ferricyanide : dissous dans de l'eau et stockés à -20°C

⑨ PCMBs : p-chloromeruribenzenesulfonate stocké à -20°C

Fiche 51

Dosage et détection de l'activité β -galactosidase

Après 48 h de transfection avec différentes conditions de quantité d'ADN^① et d'Exgen 500^① testées, les cellules sont utilisées pour visualiser le nombre de cellules transfectées et ainsi choisir les meilleures conditions de transfection.

A) Dosage β -galactosidase (ONPG)^②

- Les cellules sont rincées deux fois avec 0,5 mL de tampon PBS^③
- Elles sont fixées pendant 5 min dans 500 μ L de paraformaldéhyde 1% (PAF 4%^④ dilué dans du PBS)
- Elles sont lavées deux fois avec 500 μ L de tampon maléate^⑤ 0,1 M pH 5.8
- Préparer la solution de coloration et déposer 150 μ L par puits de plaque 24 :

Solution stock	concentration finale	mix β -Gal pour 150 μ L
ONPG 8mg/mL ^⑥	1,6 mg/mL	30 μ L
tampon phosphate 0,1M ^⑦		115 μ L
tampon salin 25x ^⑧	1x	4,5 μ L

- Incuber à 37°C à l'abri de la lumière en surveillant toutes les 30 min si la coloration jaune du surnageant atteint un plateau et ce pendant 1h30.
- Transvaser le surnageant dans une plaque 96 puits et lire l'absorbance au lecteur de plaques à 405 nm^⑨ pour déterminer les meilleures conditions de transfection

B) Détection de l'activité β -galactosidase in situ avec X-Gal comme substrat

- Les plaques utilisées pour le dosage β -galactosidase (ONPG) sont lavées 2 fois avec 500 μ L de tampon PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺^③
- Préparer la solution de coloration et déposer 100 μ L par puits de plaque 24 :

Solution stock	concentration finale	solution de coloration 100 μ L
PBS sans Ca ²⁺ ni Mg ²⁺ ^③ qsp 100 μ L		77,8 μ L
X-Gal 50mg/mL ^⑩	1 mg/mL	2 μ L
Potassium ferrocyanide 50mM ^{⑩'}	5 mM	10 μ L
Potassium ferricyanide 50mM ^{⑩'}	5 mM	10 μ L
MgCl ₂ 1M	2 mM	0,2 μ L

- Incuber 3h minimum dans une boîte humide à l'abri de la lumière et à 37°C
- Rincer à l'eau
- Déshydrater dans des bains d'éthanol successifs (70°, 95°, 100°)
- Observer au microscope et compter le nombre de cellules bleues pour déterminer les meilleures conditions de transfusions

① Le plasmide pCMV β (Clontech) exprimant la β -galactosidase Exgen 500 (Euromedex, France)

② PBS sans Calcium ni Magnésium solution de Dulbecco

④ Paraformaldéhyde dissous à 4% dans du PBS dissous en chauffant sous hotte chimique et ajustement du pH à 7,4 avec de la soude 1N (peut être stocké à -20°C)

⑤ Tampon maléate 0,1M pH5,8 : 0,1M acide maléique ajuster le pH à 5,8

⑥ ONPG : O nitrophenyl- β -D-galactopyranoside dilué dans le tampon phosphate

⑦ Tampon phosphate : 387 mL de 0,1M Na₂HPO₄, 113 mL de 0,1M NAH₂PO₄, pH 7,8 stérilisé par autoclavage

⑧ Tampon salin 25x : KCl 250mM ; MgCl₂ 25mM ; β -mercaptoéthanol 1,25M

⑨ Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champsigny sur Marne, France)

⑩ X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Sigma) est dissous à 50 mg/mL dans du diméthylformamide. La solution stock est conservée à -20°C

⑩' Potassium ferrocyanide et Potassium ferricyanide : dissous dans de l'eau et stockés à -20°C

Fiche 52

Liaison de la TCII à la vitamine B12 radiomarquée à partir de cellules

- A) Incubation de la vitamine CN [⁵⁷Co] B12 sur cellules en culture
- Prélever le surnageant^① des cellules (conserver le à 4°C si vous l'analysez dans la journée pour le concentrer, il faut utiliser des tubes en polypropylène)
 - Rincer deux fois avec du DMEM^② sans SVF pour enlever la TCII libre
 - Préparer la vitamine B12^③ radioactive dans du DMEM sans SVF et prélever un aliquot et compter la radioactivité
 - Mettre 1mL de DMEM/B12 soit 20 000 tours par minutes dans chaque puits de plaque 6 puits
 - Incuber 30 min à 37°C
 - Prélever le surnageant et compter la radioactivité^④
 - Rincer deux fois avec du PBS^⑤
 - Gratter dans 1mL de PBS le plus délicatement possible
 - Compter la radioactivité de la suspension
 - Centrifuger à 1000 tours par minutes pendant 12 min
 - Compter le surnageant et le culot
- B) Incubation de la vitamine [⁵⁷Co] B12 sur fraction membranaire
- Récupérer le surnageant^① des cellules (conserver le à 4°C si vous l'analysez dans la journée pour le concentrer, il faut utiliser des tubes en polypropylène)
 - Décoller les cellules de la manière habituelle et compter le nombre de cellules dans l'échantillon
 - Centrifuger les cellules et les resuspendre dans du tampon TBS^⑥ contenant un cocktail d'antiprotéases^⑦ (dilution au 1/1000 ou au 1/100)
 - Broyer les cellules par sonication 3 fois 10 sec dans la glace (sinon à la seringue ou avec le petit potter pendant 3 min)
 - Centrifuger 30 min ou 1h à 18000 g à 4°C dans des microtubes
 - Récupérer le surnageant et reprendre le culot dans du TBS (d'abord 200 µL mélanger au vortex pour essayer de libérer le maximum de sites de liaison puis rajouter 300 µL pour récupérer ce qu'il y a sur les parois)
 - Ajouter la B12 radiomarquée au [⁵⁷Co] diluée pour prélever un gros volume par exemple 50 000 cpm pour 500 000 cellules
 - Mettre sous agitation rotative pendant 20 min à 4°C
 - Faire un premier comptage sur le compteur multipuits^④ pour compter la globalité de la radioactivité (ou après la centrifugation)
 - Centrifuger 15 min à 15000 g à 4°C
 - Compter le surnageant et le culot
 - Ajouter sur le culot 1 mL de TBS directement et mélanger au vortex (risque d'avoir des agrégats membranaires mais ce n'est pas gênant)
 - Centrifuger 15 min à 15000 g à 4°C
 - Compter le surnageant et le culot du premier lavage
 - Faire un deuxième et troisième lavage avec 1 mL de TBS + EDTA 5 mM et compter la radioactivité sur un compteur gamma.

① Sur ces surnageants il est possible de faire de la gel-filtration pour voir la quantité de TCII sécrétée. Ne pas oublier d'utiliser des tubes en polypropylène pour la concentration des surnageants.

② Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (1959) et contenant du glucose à 4,5 g/L. Ce milieu contient vitamine B₁₂ (des traces) et surtout ne contient pas de protéines liant cette vitamine (Gibco-Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

③ Cyanocobalamine marquée au cobalt 57 (1355 g/mol) en solution dans de l'alcool benzylique à 0,9% (v/v) : 280 µCi/nmol et ~50 ng/mL (ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, CA, USA)

④ Compteur Gamma multipuits, MultiGamma 1261 (LKB-Wallac)

⑤ PBS sans Calcium ni Magnésium solution de Dulbecco (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)

⑥ Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) et NaCl 0,15 M

⑦ Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues (Sigma, St Louis, USA)

Fiche 53

Transfection stable de cellules NIE-115 par le pcDNA3-TCII-oléosine, pcDNA3-oléosine-TCII, avec l'Exgen^①

A) La veille de la transfection

- Ensemencer 7.10^5 cellules TC7 par boîte de culture de diamètre 100 mm^② dans 7mL de milieu de culture et incubé à 37°C pendant la nuit. Préparer deux boîtes de diamètre 100mm par plasmide à transférer pour avoir un plus large choix de clones au moment de l'isolement.

• B) Une heure avant la transfection

- Remplacer le milieu de culture de chaque boîte à transférer par 3 mL de milieu sans SVF.

C) La transfection^③

- Pour chaque transfection :
- Mélanger 2 µg du plasmide d'intérêt dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL. Homogénéiser au vortex et centrifuger brièvement
- Mélanger 6 µL d'Exgen dans du NaCl 150 mM filtré pour un volume final de 50 µL
- Homogénéiser au vortex
- Ajouter la solution d'Exgen à la solution d'ADN et non l'inverse. Vortexer immédiatement et laisser reposer 10 min à température ambiante
- Déposer goutte à goutte les 100 µL de mélange Exgen / ADN sur le milieu et mélanger rapidement par agitation douce
- Incuber les cellules à 37°C pendant 1h
- Rajouter 4 mL de milieu frais sur les 3 mL
- Replacer les cellules à 37°C et à 10% de CO₂ pendant 48 heures

• D) Sélection

- 48h après la transfection, commencer la sélection en ajoutant dans le milieu de culture classique du G418 à 1,1mg/L
- Environ 10 jours après le début de la sélection, des clones cellulaires commencent à apparaître. Dès l'apparition des premiers clones les repérer avec un feutre
- Au bout d'environ trois semaines, les clones contiennent suffisamment de cellules pour pouvoir les isoler par la méthode des anneaux de clonage en ayant un bon pourcentage de survie des clones.

① Exgen 500 (Euromedex, France)

② Boîte diamètre 100 mm (Costar, Corning Inc. NY, USA)

③ pcDNA₃-TCII-oléosine et pcDNA₃-oléosine-TCII : l'ADNc a été inséré aux sites de restriction Bam HI et Xba I du plasmide pcDNA₃ (Invitrogen, Life Technology, France). Un avec les plasmides pcDNA₃-oléosine, et pcDNA₃-TCII sert de contrôle. Un avec le plasmide pcDNA₃ natif sert de témoin négatif.

Fiche 54

Isolement des clones par anneaux de clonage^①

La technique est délicate en terme de risque de contamination mais aussi en terme de risque d'isolement de pseudoclones (soit un clone issu de plusieurs cellules différentes, soit en cas de mauvaise utilisation des anneaux qui entraîne le mélange de plusieurs clones trypsinés). Une autre méthode existe. C'est la dilution limite des cellules transfectées. Cependant, il est difficile de maintenir en vie après un repiquage une cellule épithéliale isolée dans un puits. Donc les cellules qui survivent n'étaient pas isolées correctement au départ. Il est nécessaire de refaire plusieurs fois la dilution limite pour obtenir des clones véritables.

- Stériliser une pince et les anneaux de clonage de différentes tailles à l'alcool et laisser les sécher sous la hotte de culture dans une boîte de diamètre 100mm stérile^②
- Repérer les clones à isoler, en s'assurant que l'isolement pourra se faire sans passer au-dessus des autres clones à isoler
- Rincer la boîte avec 5 mL de PBS^③
- Choisir un anneau de clonage de diamètre légèrement plus grand que le clone. Positionner le sur le clone en s'assurant qu'il encercle parfaitement le clone
- Déposer quelques μL de trypsine^④ de façon à recouvrir la totalité du clone tout en évitant de toucher au maximum à la paroi de l'anneau de clonage ce qui entraîne inévitablement son déplacement et donc la libération de la trypsine sur le restant de la boîte avec quelques cellules éventuelles (risque d'obtention de « clone polyclonal »)
- Après quelques secondes d'action de la trypsine, aspirer-refouler plusieurs fois pour resuspendre les cellules
- Transférer les cellules trypsinées dans un puits de plaque 96 puits^② contenant 100 μL de milieu avec sélection
- Laisser l'anneau en place pour retenir au maximum par capillarité la trypsine restante pour éviter une contamination des autres clones par des cellules de celui ci
- Opérer de la même façon pour tous les autres clones le plus rapidement possible pour éviter le dessèchement des cellules. Si vous souhaitez isoler 10 clones choisissez en 5 par boîte
- Une fois l'isolement des clones terminé, le reste des clones peut être trypsiné pour obtenir une culture polyclonale de cellules transfectées
- Une fois les cellules à confluence dans les puits de plaque 96 puits, transférer les cellules dans un puits de plaque 24 puits^②. Remettre du milieu dans le puits de plaque 96 puits en cas de perte du clone lors de la trypsination. Renouveler l'opération à la prochaine confluence dans une plaque 6 puits^②
- Congeler les clones dès que possible
- Pour commencer les expériences sur les différents clones, lever la sélection une semaine avant.
- Remettre la sélection une semaine par mois pour s'assurer du maintien du plasmide (ou du moins du gène de sélection) dans la cellule. Vérifier par PCR et RT-PCR régulièrement la présence et de l'expression du gène d'intérêt

① Anneaux de clonage en verre borosilicaté de hauteur par diamètre en mm de 8x6 ; 8x8 ; 10x10 (VWR international)

② Plastique de culture (Costar, Corning Inc. NY, USA)

③ PBS sans Calcium ni Magnésium solution de Dulbecco (Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)

TRAVAUX ET PUBLICATIONS

- 1- **Nassila Akchiche**, Carine Bossenmeyer-Pourié, Grégory Pourié, Violette Koziel, Emmanuelle Nédélec, Jean-Louis Guéant, et Jean-Luc Daval

Differentiation and Neural Integration of Hippocampal Neuronal Progenitors: Signaling Pathways Sequentially Involved

Hippocampus : 27 Aout 2009, DOI: 10.1002/hipo.20690

- 2- **Nassila Akchiche**, Jean-Luc Daval, Violette Koziel, Jean-Marc Alberto, Sandra audonnet, Romain Rivet, Jean-Louis Guéant, et Carine Bossenmeyer-Pourié

Folate deficiency affects hippocampal neuronal progenitor proliferation, differentiation, and synaptic plasticity

J Neurosc : Article soumis

- 3- Shyue-fang Battaglia-Hsu, **Nassila Akchiche**, Nicole Noel, Jean-Marc Alberto, Elise Jeannesson, Jean-Luc Daval, et Jean-Louis Guéant

Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and upregulates PP2A, proNGF and TACE

PNAS: Article accepté

PARTICIPATION A DES CONGRES

Communications orales

- 1- Akchiche N, Bossenmeyer-Pourie C, Guéant JL, Daval JL.

Proliferation and differentiation of H19-7 neuronal progenitors are affected by vitamin B deficiency

Journées Nationales HOMOCYSTÉINE, Montpellier, 1 et 2 octobre 2009

- 2- Hsu-Battaglia S, Akchiche N, Orozco-Barrios CE, Chery C, Ortiou S, Alberto JM, Noel N, Martinez Fong D, Daval JL et Guéant JL.

Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cell by upregulating PP2A, proNGF and TACE

7th International Conference on Homocysteine Metabolism, Prague, République Tchèque, 21-25 juin 2009

- 3- Akchiche N, Blaise S, Alberto JM, Nédélec E, Bossenmeyer- Pourie C, Daval JL et Guéant JL.

Les déterminants nutriginétiques du métabolisme des monocarbones: des modèles expérimentaux à la pathologie

XI^e Journées Nationales HOMOCYSTÉINE, Nice 12 et 13 octobre 2006

Communications affichées

- 1- Akchiche N, Daval JL, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourie C.

Proliferation and differentiation of H19-7 neuronal progenitors are affected by vitamin B deficiency

Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, 24-27 mai 2009

- 2- Akchiche N, Daval JL, Guéant JL, Bossenmeyer- Pourie C.

Influence of vitamin B deficiency on proliferation and differentiation of hippocampal neuronal progenitors

Colloque de la Société de Circulation et Métabolisme du Cerveau, Nancy, 1 et 2 avril 2009

- 3- **Akchiche N**, Bossenmeyer- Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL.

Différenciation et intégration neurale de progéniteurs neuronaux d'hippocampe de rat : voies de signalisation impliquées

IV^{ème} journée Claude Huriot de la recherche médicale, Nancy, 19 décembre 2008

Concours de la meilleure présentation affichée : Classement 1^{ère} ex-aequo

- 4- **Akchiche N**, Daval JL, Koziel V, Guéant JL, Bossenmeyer- Pourié C.

Cellular and molecular pathways involved in neuronal differentiation, cell death and survival in hippocampal H19-7 cell line

6^{ème} Congrès de la FENS, Genève, 12-16 juillet 2008

- 5- **Akchiche N**, Daval JL, Nedelec E, Guéant JL, Bossenmeyer- Pourié C.

Usefulness of hippocampal cell line H197/IGFIR for the study of vitamin B deficiency on neuronal brain development

8^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Montpellier, 22-25 mai 2007