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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

Par

Sarah El chakour el hajj chehadeh

Conséquences d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur l'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse chez le rat

Le 10 Décembre 2013

Membres du jury

Rapporteurs:

Mme Marie-Laure Kottler	PU-PH, U-1075 INSERM, Caen
Mme Véronique Kemmel	MCU-PH, UMR 1119 INSERM, Strasbourg

Examinateurs:

M. Sébastien Blaise	MCU, FRE 3481 CNRS, Reims
M. Jean-Louis Guéant	PU-PH, UMR 954 INSERM, Nancy
Mme. Brigitte Leininger-Muller	PU, UMR 954 INSERM, Nancy Directeur de thèse

Membre invité:

M. Henri Schroeder	MCU, UC340 INRA, Nancy

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

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury

Madame le Professeur Marie-Laure Kottler et Madame le Docteur Véronique Kemmel pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir acceptés d'être les rapporteurs de ma thèse

Monsieur le Docteur Sébastien Blaise pour avoir accepté d'être l'examinateur de ma thèse afin d'évaluer mon travail

Je tiens à remercier l'ensemble de l'unité des INSERM U954 de leur accueil chaleureux et patient, et toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce projet :

Monsieur le professeur Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité et chef de service du laboratoire de biochimie du CHU Nancy-Brabois de me faire confiance et de m'accueillir dans son laboratoire.

Madame le professeur Brigitte Leininger-Muller, ma directrice de thèse pour avoir dirigé ce travail avec énergie et enthousiasme, pour avoir resté à mon écoute et disponible, pour sa gentillesse et pour m'avoir fait confiance durant les années de master et de thèse.

Madame le docteur Natacha Dreumont-Schuller pour sa gentillesse et sa disponibilité, pour m'avoir soutenue dans mon projet professionnel et pour ses conseils qui ont favorisé l'aboutissement de ce travail.

Monsieur le docteur Jean-Luc Daval, directeur de recherche et directeur adjoint de l'unité INSERM U954 pour l'intérêt qui l'a porté à ce travail.

Madame le docteur shyuefang.battaglia pour son grand sourire et son soutien.

Les ingénieurs Jean-Marc Alberto, Céline Chéry et Philippe Gérard, pour votre patience et votre gentillesse, pour votre aide et votre conseil, vous m'avez tellement appris.

Les techniciens Fereshteh Azadkerdar, Florence Coste, Justine Flayac et Déborah Helle, Sophie Lorentz, pour les bons moments partagés ensemble, pour votre bonne humeur, votre soutien et votre aide.

Les secrétaires Dominique Guillaume et Catherine Tavera, pour votre disponibilité et pour votre soutien.

Mes compagnons de route Shabnam Pooya, Rania El Akoum, Racha Kerek, Rose Ghemrawi, Hassan Melhem, Soufiane bouazzi, Anais Bison, Andréa Geoffroy, Hélène Pellanda, Nicolas Martin et Sonia Gkikopoulou, pour votre soutien et votre bonne humeur pour les bons moments partagés que ce soit au laboratoire ou en dehors. Sans vous ça n'aurait jamais été pareil.

Enfin Mille mercis à,

Mes amis Hicham EL hajj, Georges khoury et Ahmad Hamad, pour votre aide et vos conseils et pour les excellents moments partagés.

Mes parents qui sans leurs sacrifices rien de tout cela n'aurait été possible … Je vous aime du plus profond de mon cœur.

Mes grands parents et ma tante qui sont partis pendant mes années de thèses. Je vous dis aujourd'hui que j'ai terminé …

Une personne qui m'a soutenu, qui m'a supporté durant la fin de cette thèse. A Rameh à qui je témoigne tout mon amour.

A mes parents,

TABLES DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 5
ABREVIATIONS 9
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE 13
Chapitre I : Donneurs de groupements méthyles et Homocystéine 15
I. Donneurs de groupements méthyles 15
I.1. Les folates ou vitamine B9 15
I.1.1. Le métabolisme des folates 16
I.2. La vitamine B12 ou cobalamine 17
I.2.1. Métabolisme de la vitamine B12 17
II. L'homocystéine 18
II.1. Le métabolisme de l'homocystéine 19
II.1.1. La voie de méthylation 19
II.1.2. La voie de transulfuration 19
II.2. Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine 20
III. Conséquences d'une carence en donneurs de groupements méthyles 21
III.1. Généralités 21
III.2. Carence en donneurs de méthyles et système nerveux central 23
III.2.1. Conséquences au niveau cellulaire 23
III.2.2. Carence en donneurs de méthyles et développement de pathologies neurodégénératives 24
III.2.2.1. Maladie d'Alzheimer 24
III.2.2.2.Maladie de Parkinson 25
III.2.3 Carences en donneurs de méthyles et développement de désordres neuropsychiatriques . 26
III.2.4 Cas particuliers des carences gestationnelles en folates 27
IV. Les conséquences d'une altération du métabolisme des folates sur la stéroïdogénèse 29
CHAPITRE II : La neurostéroïdogénèse 31
I. La voie métabolique de synthèse des neurostéroïdes 31
II. Mécanisme de transfert du cholestérol à travers les membranes mitochondriales *via* les protéines StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) et TSPO (*Translocator Proteine*) 33
II.1. La protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein) 34
II.1.1. Régulation de la synthèse des stéroïdes 37
II.2. La protéine translocatrice ou TSPO (Translocator Protein) 40
III. La conversion des androgènes en estrogènes par la cytochrome P450 aromatase (CYP19) 41

IV. Rôle et localisation des récepteurs aux estrogènes dans le cerveau 44
V. Rôle des neurostéroïdes dans le développement du cervelet 45
V.1. Rôle particulier de la progestérone et de l'alloprégnanolone 45
V.2. Importance de l'estradiol 46
V.3. Rôle de la prégnénolone sulfate 48
VI. Importance des neurostéroïdes dans le développement post-natal des zones de la neurogenèse du cerveau 48
OBJECTIFS DE L'ETUDE 51
MATERIELS ET METHODES 55
I. Modèle animal 57
I.1. Les animaux 57
I.2. Traitement des animaux 57
I.3. Prélèvement des échantillons tissulaires et sanguins 58
II. Profil biochimique 58
II.1. Marqueurs nutritionnels 58
II.2. les métabolites de cycle de la méthylation 58
II.3. Etude des protéines clés de la neurostéroïdogenèse et les facteurs intervenant dans leurs régulations 59
II.4. Etude de l'expression des gènes de la neurostéroïdogenèse et les facteurs intervenant dans leurs régulations 59
II.5. Etude des conséquences associées aux altérations de la neurostéroïdogenèse 59
II.6. Etude de l'apoptose, de la prolifération cellulaire et de la méthylation globale de l'ADN dans les bulbes olfactifs 59
III. Etude comportementale 60
III.1. Homing test 60
III.2. Discrimination olfactive 61
RESULTATS 63
I. La carence précoce en donneurs de méthyles altère l'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse et du facteur de transcription SF-1 nouvellement décrit dans le cervelet des rats femelles nouveaux-nés. 65
I.1. Validation du modèle animal par rapport aux études antérieures 66
I.2. Concentrations en vitamines B9, B12, de l'homocystéine et des déterminants de son métabolisme dans le cervelet. 67
I.3. Mesure de l'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse dans le cervelet des rats nouveaux-nés. 69
I.3.1. Analyse par immunohistochimie 69

I.3.2. Analyse par western-blot 71
I.3.3. Analyse par RT-qPCR 72
I.4. Contenu en neurostéroïdes et expression des récepteurs ERα et ERβ dans le cervelet 73
I.4.1 Contenu en neurostéroïdes dans le cervelet 73
I.4.2. Expression des récepteurs ERα et ERβ dans le cervelet 74
I.5. Effets de la carence en donneurs sur la cascade de signalisation intracellulaire régulant la synthèse des neurostéroïdes. 76
I.5.1. Expression du récepteur LHR et mesure du taux d'AMPc 77
I.5.2. Expression des kinases impliquées dans la voie de signalisation intracellulaire 78
I.5.3. Niveaux d'expression des facteurs de transcription situés dans le promoteur des gènes de la stéroïdogenèse 79
I.6. Conclusion 82
II. La carence précoce en donneurs de méthyles affecte les performances olfactives des ratons en période post-natale en association avec une altération de neurostéroïdogenèse dans les bulbes olfactifs. 83
II.1. Effet de la carence en donneurs de méthyles sur les concentrations en vitamines B9 et B12 et les déterminants du métabolisme de l'homocystéine 84
II.2. Immunodétection de l'homocystéine et des marqueurs d'apoptose et de prolifération cellulaire dans les BO 85
II.3. Expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse et contenu en estradiol dans les bulbes olfactifs 86
II.3.1. Expresssion des protéines StAR, TSPO et de l'aromatase 86
II.3.2. Contenu en 17β-estradiol et expression des récepteurs aux estrogènes dans les bulbes olfactifs. 88
II.4. Niveaux d'expression de LHR et SF-1 dans les bulbes olfactifs 90
II.5. Tests comportementaux de discrimination olfactive. 92
II.6. Conclusion 92
III. La carence précoce en donneurs de méthyles affecte également d'autres régions cérébrales des rats nouveau-nés, notamment l'hippocampe. 94
III.1. Concentrations en vitamines B9, B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans l'hippocampe. 94
III.2. Accumulation de l'homocystéine dans l'hippocampe des femelles âgées de 21 jours 95
III.3. Niveaux d'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse dans l'hippocampe 96
III.3.1. Mesure de l'expression de la protéine kinase A et de la phosphatase A2 101
III.4. Contenu en 17β-estradiol et expression des récepteurs aux estrogènes dans l'hippocampe. 102
III.5. Implication des protéines régulatrices de l'expression des gènes de la neurostéroïdogenèse dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours 105

III.6. Conclusion 108
DISCUSSION 109
CONCLUSION et PERSPECTIVES 119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 125
FICHES TECHNIQUES 149
LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS 203
ANNEXES 207

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: Structure de l'acide folique et ses dérivés 15
Figure 2: Schéma représentant le métabolisme des folates 16
Figure 3: Structure chimique de la vitamine B12 (Cobalamine). 17
Figure 4: Schéma représentant le métabolisme de la vitamine B12. 18
Figure 5: Schéma représentant le cycle de l'homocystéine 20
Figure 6: Schéma représentant les différentes étapes de la neurostéroïdogénèse 33
Figure 7: Représentation schématique de l'interaction entre les différentes protéines formant le transduceosome 34
Figure 8: Structure du domaine START de la protéine StAR 35
Figure 9: Schéma représentant la voie de signalisation régulant l'expression du gène StAR 37
Figure 10: Structure de la protéine SF-1 et les mécanismes de contrôle de son activité transcriptionnelle 39
Figure 11: Représentation schématique du gène de l'aromatase humain 42
Figure 12: Schéma représentant les effets de l'estradiol sur la transmission synaptique dans l'hippocampe. 44
Figure 13: Un modèle schématique de l'action d'estradiol dans les cellules de *Purkinje* au cours du développement néonatal 47
Figure 14: Schéma représentant le modèle animal de carence en donneurs de groupements méthyles développé par notre équipe. 57
Figure 15: Schéma représentant le dispositif expérimental de labyrinthe en T. 61
Figure 16: Schéma représentant le dispositif expérimental du test discrimination olfactive. 62
Figure 17: Marquage immunohistochimique de l'homocystéine dans le cervelet des rats âgés de 21 jours 68
Figure 18: Marquage immunohistochimique de StAR, TSPO et aromatase dans le cervelet des rats âgés de 21 jours 70
Figure 19: Analyse par western-blot de l'expression des protéines StAR, TSPO et aromatase dans le cervelet des rats à J21 71
Figure 20: Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de StAR, aromatase et TSPO dans le cervelet des ratons à J21 72
Figure 21: Marquage immunohistochimique de l'estradiol dans le cervelet des rats de 21 jours 74
Figure 22: Marquage immunohistochimique des récepteurs ERα et ERβ dans le cervelet des rats J21.. 75
Figure 23: Analyse par western-blot de l'expression des récepteurs aux estrogènes dans le cervelet des rats J21 76

Figure 24: Analyse de l'expression du récepteur LHR et mesure du taux d'AMPc dans le cervelet des rats à J21 78
Figure 25: Analyse par western-blot de l'expression des kinases impliquées dans la voie de signalisation intracellulaire dans le cervelet des rats à J21 79
Figure 26: Analyse des niveaux d'expression des facteurs de transcription CREB et SF-1 dans le cervelet des rats à J21. 81
Figure 27: Marquage immunohistochimique de l'HCY, la caspase 3 clivée ainsi que la protéine Ki67 dans les BO des rats mâle à J21 85
Figure 28: Marquage immunohistochimique de la protéine TSPO dans la couche glomérulaire des BO des rats âgés de 21 jours 86
Figure 29: Analyse par western-blot de l'expression de la protéine TSPO dans les fractions mitochondriales de bulbes olfactifs des ratons âgés de 21 jours. 87
Figure 30: Marquage immunohistochimique du 17β-estradiol dans les bulbes olfactifs des rats mâles. 88
Figure 31: Expression du récepteur ERβ dans les bulbes olfactifs des rats âgés de 21 jours. 89
Figure 32: Effet de la carence en donneurs de méthyles sur l'expression de SF-1 et de LHR dans les BO des ratons de 21 jours. 91
Figure 33 : Marquage immunohistochimique de l'homocystéine dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. 96
Figure 34: Marquage immunohistochimique de StAR, TSPO et aromatase dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. 97
Figure 35: Analyse par western-blot de l'expression des protéines StAR, TSPO et aromatase dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. 99
Figure 36: Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de StAR, aromatase et TSPO dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours 100
Figure 37: Analyse par western-blot de l'expression de la phosphatase PP2A et des protéines kinases PKA et PKC dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. 101
Figure 38: Marquage immunohistochimique de 17β-estradiol et des récepteurs aux estrogènes dans l'hippocampe des rats de 21 jours. 103
Figure 39: Analyse par western-blot de l'expression des récepteurs aux estrogènes dans l'hippocampe des rats J21 104
Figure 40: Marquage immunohistochimique de la protéine SF-1 et de LHR dans l'hippocampe des rats J21. 106
Figure 41: Analyse par western-blot de l'expression de la protéine SF-1 et de LHR dans l'hippocampe des rats J21. 107
Figure 42: Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de SF-1 dans l'hippocampe des rats J21. 108

Tableau I: Concentration plasmatique en homocystéine dans le plasma des ratons âgés de 21 jours... 66
Tableau II: Poids corporel des ratons âgés de 21 jours 67
Tableau III: Concentrations en vitamines B9 et B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans le cervelet des ratons âgés de 21 jours..... 69
Tableau IV: Concentrations en cholestérol et en neurostéroïdes mesurées par LC-MS/MS dans le cervelet des ratons âgés de 21 jours 73
Tableau V: Mesure du taux de méthylation global dans les bulbes olfactifs des ratons âgés de 21 jours 85
Tableau VI: Concentrations en vitamines B9 et B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans l'hippocampe des ratons âgés de 21 jours 95
Tableau VII: Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte 160
Tableau VIII: Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte 161
Tableau IX: Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE. 169
Tableau X: Anticorps primaires utilisés en Western blot..... 173
Tableau XI: Anticorps secondaires utilisés en Western blot..... 174

ABREVIATIONS

3β-HSD : *3β-Hydroxysteroid dehydrogenase*

17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase

5,10-MTHF : 5,10-Méthylène tétrahydrofolate

5,10-MTHFR : 5,10-Méthylène tétrahydrofolate reductase

5-méthyl THF : 5-Méthyltétrahydrofolate

5'-UTR : 5'untranslated region

A□ : Amyloïde β

AC : Adénylate cyclase

Ad4BP : *Adrenal 4-binding protein*

ANOVA : *Abreviations analysis of variance*

AF1 et **AF2:** *Activation function 1 and 2*

ANT : *Adenine Nucleotide Transporter*

Azad : 5-aza-2'-déoxycytidine

BCA : Acide bicinchoninique

BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*

BET : Bromure d'éthidium

BHMT : Bétaïne homocystéine méthyltransférase

BO : Bulbes olfactifs

BSA : Bovin Serum Albumin

DBI : D*iazepam binding inhibitor*

DFTN : Défauts de la fermeture du tube neural

CA1 : Corne d'ammon 1

CBS : Cystathionine-béta-synthase

CRAC : C*holesterol recognition amino acid consensus*

CBP : CREB *Binding Protein*

CREB : *cAMP Response Element Binding protein*

CRE: Elément de réponse à l'AMPc

Cyl : Cystathionine-γ-lyase

DAPI : 4',6'-Diamidino-2-phénylindole

DBD : Domaine de liaison à l'ADN

DHEA : Dihydroépiandrostérone

DHF : Dihydrofolate

DHT : Dihydrotestostérone

DOC : Deoxycholate de sodium

dTMP : Désoxythymidine 5'-monophosphate

DTT : Dithiothreitol

dUMP : Désoxyuridine 5'-monophosphate

ELP1 : *Embryonic long terminal repeat-binding protein*

ER : *Estrogen receptor*

ERE : estrogen response element

FI : Facteur intrinsèque

Ftz-F1 : fushi tarazu factor 1

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase

GSH : Gluthation

HAS : Haute Autorité de Santé

HCY : Homocystéine

HERP : *Homocysteine-inducible Endoplasmic Reticulum stress Protein*

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

LBD : Domaine de liaison au ligand

LC-MS/MS : Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

LH : Hormone lutéinisante

LHR: Récepteur à l'hormone lutéinisante

MA : Maladie d'Alzheimer

MAP1b : microtubule-associated protein 1b

MAPK : *mitogen-activated protein Kinase*

MAT : Méthionine adénosyltransferase

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

MS : Méthionine synthase

MT : Méthyltransférase

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NLS : *nuclear localization signal*

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NR5A1 : *nuclear receptor 5A1*

NSG : Neurostéroïdogenèse

NT-3 : neurotrophine 3

P450 17α-lyase : P450 17α-hydroxylase/c17, 20-lyase

P450 arom : cytochrome P450 aromatase

P450 scc : *P450 side-chain cleavage*

PAP7 : *PBR associated protein 7*

PARP : Poly (ADP-ribose) polymérase

PBR : Récepteur périphérique des benzodiazépines

pcl : Pyramidal cell layer

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLP : Pyridoxal 5'-phosphate

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PP2A : Protéine phosphatase 2A

PR : Récepteur de la progestérone

PREG : Prégnénolone

PREG-S : prégnénolone sulfate

Pro-rich : région riche en proline

PVDF : Polyvinylidene difluoride

RIPA : *Radioimmunoprecipitation Assay*

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase

SAM : S-adénosylméthionine

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SF-1 : Steroidogenic factor 1

SNC: Système nerveux central

Sp : *Selective promotor factors*

StAR : *Stereidogenic acute regulatory protein*

STRAT : *StAR related lipid transfert*

SVZ : Zone sub-ventriculaire

SGZ : Zone sous-granulaire

TBE : Tampon Tris – Borate – EDTA

TCII : Transcobalamine II

THF : Tétrahydrofolate

TrkB : *Tyrosine-related kinase*

TSPO : *Translocator protein*

UPLC: Chromatographie liquide à ultra-haute performance

VDAC : *Voltage-Dependent Anion Channel*

Vit B9 : Vitamine B9

Vit B12 : Vitamine B12

VMH : Ventro-médiale de l'hypothalamus

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Donneurs de groupements méthyles et Homocystéine

I. Donneurs de groupements méthyles

I.1. Les folates ou vitamine B9

Les folates appartiennent à la famille de la vitamine B et sont connus sous le nom de vitamine B9 (vit B9) qui comporte un noyau ptéridine et un acide para-aminobenzoïque lié à une ou plusieurs molécules d'acide glutamique (Figure 1) (Fowler, 2001). Les formes réduites des folates, indispensables à l'activité biologique, sont le dihydrofolate (DHF) ou acide dihydrofolique et le tétrahydrofolate (THF) ou acide tétrahydrofolique provenant d'une réduction par fixation d'atomes d'hydrogène. La forme réduite THF peut fixer des radicaux mono-carbonés sur ses atomes d'azote N5 et/ou N10 qui constituent les sites actifs des folates.

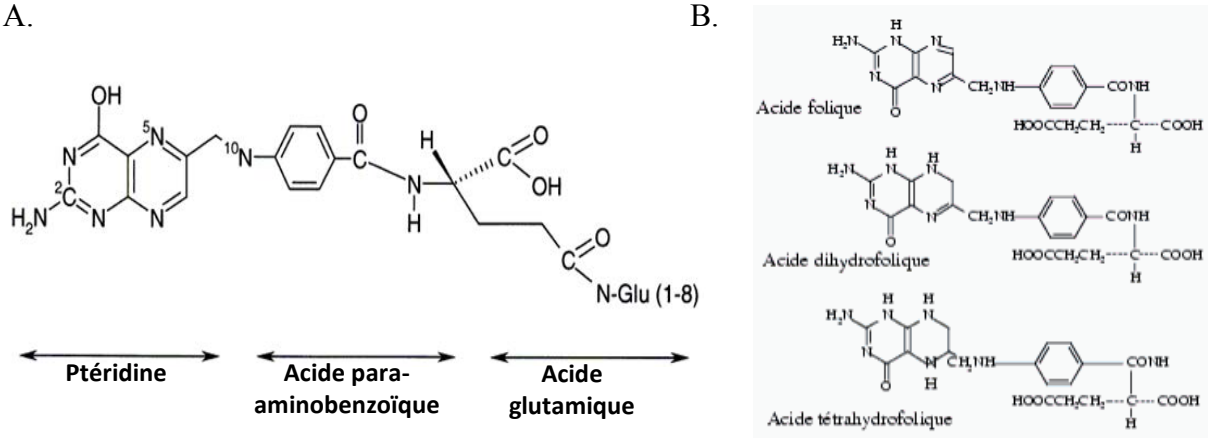


Figure 1: Structure de l'acide folique (A) et ses dérivés (B), (*modifié d'après Fowler, 2001).*

Les mammifères sont incapables de synthétiser les folates, qui sont apportés par l'alimentation: ils se trouvent dans les plantes vertes fraîches (épinards, laitues, concombre, asperges, *etc*.), les organes parenchymateux (foie et reins), les fruits et les graines.

Les folates sont impliqués dans la méthylation d'un grand nombre d'acides nucléiques, de protéines et de lipides, ainsi que dans la synthèse des acides aminés (méthionine, histidine et sérine). Ils interviennent également dans la synthèse des bases des acides nucléiques (purines et pyrimidines). Ils jouent donc un rôle primordial dans la réplication de l'ADN durant la période de croissance et de division cellulaire, et donc plus particulièrement au cours de l'enfance et de la grossesse. Chez l'Homme, les besoins en acide folique sont de l'ordre de 0,2 mg par jour.

I.1.1. Le métabolisme des folates

A l'état naturel, les folates sont souvent polyglutamylés et sont hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle en monoglutamates. Après leur absorption dans les entérocytes, les monoglutamates sont réduits en DHF puis en THF *via* les activités catalytiques des folate et dihydrofolate réductases. Ces deux enzymes utilisent le NADPH comme cofacteur. Le THF va être transformé, grâce à la sérine hydroxyméthyltransférase en 5,10-méthylène tétrahydrofolate (5,10-MTHF). Ce dernier sera à son tour réduit en 5-méthyltétrahydrofolate (5-méthyl THF) grâce à la 5,10-méthylène tétrahydrofolate reductase (5,10-MTHFR). Le 5,10-MTHF peut être métabolisé par la thymidylate synthase (TS) pour servir de donneur d'un groupement carbone à la synthèse de déoxythymidine 5'-monophosphate (dTMP) à partir de déoxyuridine 5'-monophosphate (dUMP). Les dTMP sont impliqués dans la synthèse de l'ADN et dans le maintien d'un taux normal de division cellulaire. De plus, cette réaction produit également du DHF, lequel devra être réduit par la dihydrofolate réductase en THF pour être de nouveau métaboliquement actif (Lucock, 2000). Enfin, le 5-méthylTHF sert de donneur de groupement méthyle pour la reméthylation de l'homocystéine (HCY) en méthionine (Tchantchou, 2006), (Figure 2).

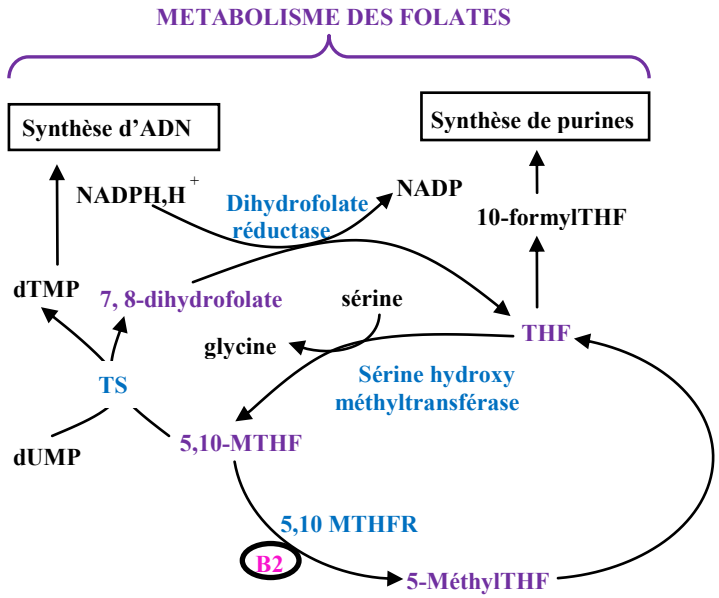


Figure 2: Schéma représentant le métabolisme des folates. THF : tétrahydrofolate. 5,10-MTHF : 5,10-méthylène tétrahydrofolate. 5,10-MTHFR : 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase. 5-MéthylTHF : 5-méthyltétrahydrofolate. TS : thymidylate synthase. dTMP : déoxythymidine 5'-monophosphate. dUMP : déoxyuridine 5'-monophosphate. 10-formylTHF : 10-formyl tétrahydrofolate. NADP : nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate. (*modifié d'après Tchantchou, 2006)*

I.2. La vitamine B12 ou cobalamine

La vitamine B12 (vit B12) est une molécule organométallique ayant une structure chimique proche de l'hème, l'atome central de fer étant remplacé par un atome de cobalt (Figure 3), d'où le nom de cobalamine. Elle existe sous plusieurs formes : la méthylcobalamine (cobalt lié à un groupement méthyle) et l'adénosylcobalamine (cobalt lié à un groupement 5'-désoxyadénosyle).

Tout comme pour la vit B9, l'organisme humain, incapable de synthétiser la vit B12, est tributaire de son apport par l'alimentation (viande, poissons, lait et œufs). La vit B12 permet le transfert intermoléculaie des groupements méthyles dans le métabolisme des acides nucléiques et dans la synthèse de la méthionine. Son apport journalier moyen est de 2 à 6 µg selon les individus et les conditions physiologiques.

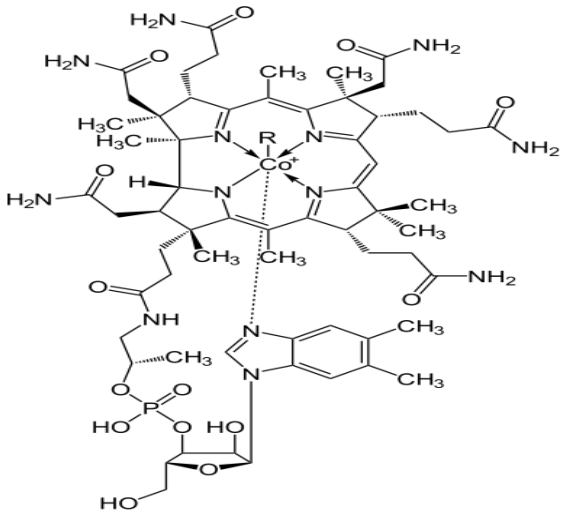


Figure 3: Structure chimique de la vitamine B12 (Cobalamine).

I.2.1. Métabolisme de la vitamine B12

La cobalamine est d'abord libérée de son support protéique alimentaire dans l'estomac grâce à l'action de l'acidité du suc gastrique et de la pepsine (Schade et Schilling., 1967). Une fois libre, la vit B12 peut être liée à deux glycoprotéines : les haptocorrines (transcobalamine I et transcobalamine III ou protéines R) et le facteur intrinsèque (FI). Les haptocorrines transportent les cobalamines de l'estomac jusqu'au duodénum où elles seront dégradées par les protéases (Marcoullis *et coll.,* 1986), puis la vit B12 libre se lie au FI. Dans les entérocytes de l'iléon la cobalamine est dissociée du FI (Seetharam *et coll.,* 1982) puis transférée sur la

transcobalamine II (TCII), qui assure le transport sanguin de la vit B12 soit vers le foie, lieu de stockage, soit vers les tissus périphériques, où la cobalamine joue son rôle métabolique principalement sous forme de coenzyme (Figure 4).

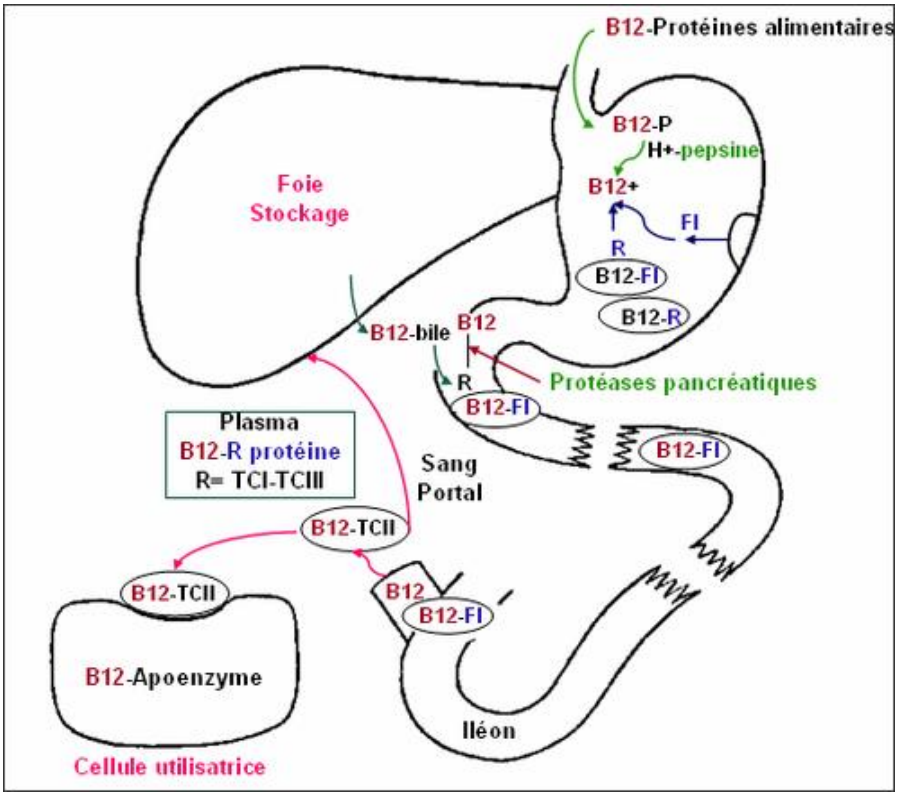


Figure 4: Schéma représentant le métabolisme de la vitamine B12. P : Protéines alimentaires. FI : facteur intrinsèque. R : haptocorrines ou protéines R. TC : transcobalamine.

II. L'homocystéine

L'HCY est un acide aminé soufré dérivé de la cystéine, n'entrant pas dans la synthèse des protéines. Elle est synthétisée à partir de la méthionine apportée par l'alimentation dans toutes les cellules de l'organisme. L'HCY se situe au carrefour du métabolisme de la méthionine (voie de méthylation) et de la reconstitution de cystéine *via* la voie de transsulfuration.

II.1. Le métabolisme de l'homocystéine

II.1.1. La voie de méthylation (Figure 5)

Le 5-méthylTHF, forme active des folates, est impliqué dans le cycle de l'HCY pour générer la méthionine. Les groupements méthyles fournis par le 5-méthyl THF sont utilisés par la forme méthylcobalamine de la vit B12, qui est le donneur de groupements méthyles de la méthionine synthase (MS) : celle-ci catalyse la conversion de l'HCY en méthionine.

Les tissus hépatiques et rénaux ont une alternative pour la reméthylation de l'HCY *via* la voie de la bétaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT) (Melse-Boonstra *et coll.,* 2005). La bétaïne, donneur de groupements méthyles, provient de l'alimentation (fruits de mer et céréales) ou de l'oxydation de la choline. Cette voie intermédiaire ne serait pas présente dans le cerveau.

La méthionine formée pourra être transformée en S-adénosylméthionine (SAM) *via* la méthionine adénosyltransférase (MAT). La SAM est le principal donneur de groupements méthyles nécessaires à la méthylation de l'ADN, l'ARN, des protéines et des lipides. Ce transfert du groupement méthyle est catalysé par la méthyltransférase (MT) qui permet la production de S-adénosylhomocystéine (SAH) à partir de SAM.

La SAH est transformée en HCY et adénosine par l'enzyme S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH). C'est la seule réaction réversible parmi toutes les réactions chimiques impliquées dans le métabolisme de l'HCY (Halsted *et coll.,* 2002).

II.1.2. La voie de transulfuration (Figure **5**)

Contrairement à la voie de reméthylation présente de manière ubiquitaire chez les mammifères, la voie de transsulfuration est irréversible et ne survient que dans un nombre limité de tissus. Elle est présente dans les cellules qui nécessitent une forte concentration en glutathion (GSH), comme le foie ou les neurones.

Elle constitue une autre voie du catabolisme de l'HCY en cystéine faisant intervenir le pyridoxal 5'-phosphate (PLP) qui est la forme active de la vitamine B6, cofacteur de cette réaction.

L'HCY est condensée avec la sérine pour former la cystathionine grâce à la cystathionine-béta-synthase (CBS). Par la cystathionine-γ-lyase (Cyl) la cystathionine est ensuite réduite en cystéine. Le devenir de la cystéine est multiple : elle est notamment un constituant du GSH,

un antioxydant intracellulaire majeur, ce qui confère à la voie de transsulfuration un rôle important dans la régulation du stress oxydant d'une cellule.

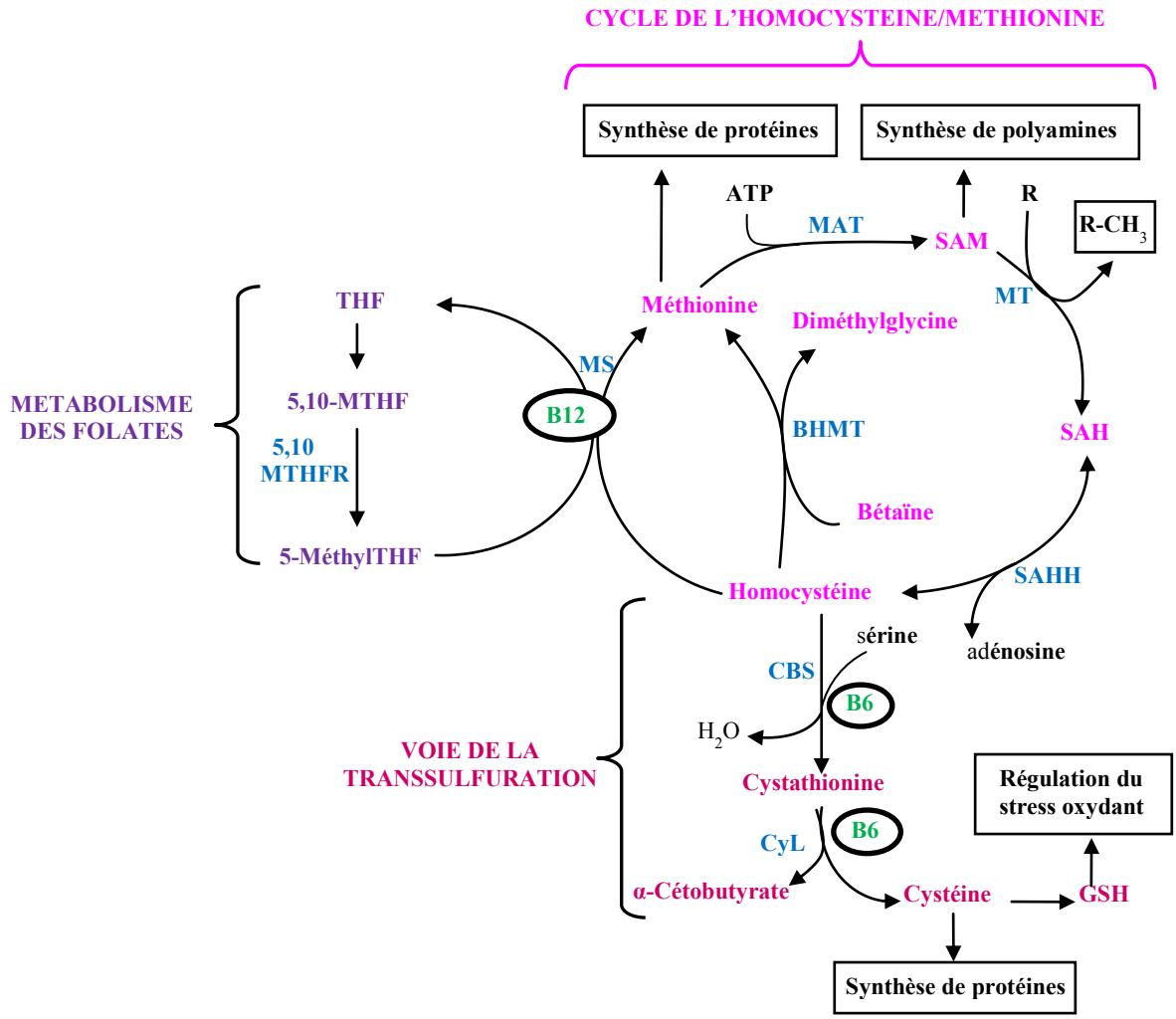


Figure 5: Schéma représentant le cycle de l'homocystéine. THF : tétrahydrofolate. 5,10-MTHF : 5,10-méthylène tétrahydrofolate. 5-MéthylTHF : 5-méthyltétrahydrofolate. 5,10-MTHFR : 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase. MS : méthionine synthase. BHMT : bétaïne-homocystéine méthyltransférase. MAT : méthionine adénosyltransférase. SAM : S-adénosylméthionine. MT : méthyltransférase. SAH : S-adénosylhomocystéine. SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase. CBS : cystathionine-béta-synthase. Cyl : cystathionine-γ-lyase. GSH: glutathion. ATP: adénosine 5'triphosphate.

II.2. Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

L'orientation du métabolisme de l'HCY vers la voie de la transsulfuration ou de la reméthylation est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et de SAM.

En cas d'apport normal en méthionine, l'HCY est recyclée par la voie de reméthylation avant d'être catabolisée par la voie de transsulfuration. En cas d'apport insuffisant en méthionine, la

voie de la reméthylation est favorisée pour assurer un pool cellulaire suffisant en méthionine. A l'inverse, un apport trop important en méthionine va favoriser la voie de la transulfuration.
La capacité de la cellule à utiliser l'HCY en fonction de l'apport en méthionine implique l'existence d'une régulation commune aux deux voies, réalisée par au-moins deux mécanismes :

- Activation de la voie de transsulfuration par la SAM avec diminution de la synthèse de 5- méthylTHF nécessaire à la reméthylation de l'HCY. La concentration intracellulaire en SAM détermine donc la voie métabolique de l'HCY.
- Deuxième mécanisme : dépend de la régulation de la concentration intracellulaire en SAM. Les enzymes qui catalysent la synthèse de la SAM présentent une affinité différente pour la méthionine : la méthionine adénosyl transférase 1 et 3, présentent une forte affinité pour la méthionine et fonctionnent dans les conditions physiologiques. Par contre, la méthionine adénosyl transférase 2 a une affinité faible pour la méthionine et n'est active qu'en présence d'apports élevés en méthionine. La variation de la teneur intracellulaire en méthionine modifie donc le taux de synthèse de la SAM. En cas d'apport important en méthionine, la méthionine adénosyl transférase 2 va rapidement transformer la méthionine en SAM, dont l'augmentation de la concentration intracellulaire va entraîner l'activation de la CBS et une inhibition de la MTHFR, conduisant à un blocage de la synthèse du 5- méthylTHF. A l'inverse, en cas d'apport faible en méthionine, la concentration intracellulaire de SAM n'est pas suffisante pour activer la CBS et pour inhiber la MTHFR, et par la suite la concentration en 5- méthylTHF va augmenter. De ce fait la voie de reméthylation est favorisée par rapport à la voie de transulfuration.

III. Conséquences d'une carence en donneurs de groupements méthyles

III.1. Généralités

Vu l'importance des donneurs de groupements méthyles dans toutes les réactions décrites précédemment, une carence en donneurs de groupements méthyles conduit à de nombreuses pathologies.
La carence en folates se traduit par une réduction de la concentration en 5,10-MTHF et une augmentation du *ratio* dUMP/dTMP puisque l'activité TS sera diminuée. La capacité des

cellules à synthétiser l'ADN sera donc réduite. Aussi, l'anomalie de synthèse du dTMP à partir de dUMP induit une phosphorylation du dUMP en dUTP et une incorporation de dUTP dans les molécules d'ADN. Cette incorporation provoque des mutations ponctuelles et des cassures simples ou double brins (Forges *et coll.*, 2008) conduisant à la formation d'un ADN instable et potentiellement oncogène.

Une carence en vit B12 conduit à un blocage des réactions permettant la synthèse des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Ces désordres métaboliques affectent surtout les cellules qui se multiplient rapidement, notamment les globules rouges au cours des premières phases de leur production dans la moelle osseuse. En présence de quantités insuffisantes en purines et pyrimidines, ces cellules ne peuvent plus se diviser, mais continuent à augmenter de volume (macrocytose), d'où le développement d'une anémie mégaloblastique (*anémie de Biermer)* en cas d'une carence en vit B9 ou B12 (Scott *et coll.,* 1992).

Au cours d'une déficience en donneurs de groupements méthyles, on observe également une accumulation intracellulaire d'HCY qui a été associée à des anomalies du tube neural et à un retard de croissance intra-utérin dans le cadre des carences observées en période gestationnelle (Obeid et Herrmann, 2005).

L'association de l'hyperhomocystéinémie avec le risque cardiovasculaire (Wald *et coll.,* 1998) et des accidents vasculaires cérébraux, ainsi que des maladies neurodégénératives (Mattson et Shea, 2003 ; Tchantchou, 2006 ; Obeid *et coll.,* 2011) a largement été décrite dans la littérature.

De nombreuses études ont établi l'association entre les polymorphismes C677T de la MTHFR (Lewis *et coll.,* 2005) et A2756G de la méthionine synthase (MTR) (Laraqui *et coll.,* 2006) et le risque cardiovasculaire. Le polymorphisme A66G de la méthionine synthase réductase (MTRR) est également impliqué : une étude menée dans notre équipe a montré une association significative avec l'homocystéinémie et les maladies coronariennes dans un échantillon de la population française (Guéant-Rodriguez *et coll.*, 2005). De plus, une association significative de l'homocystéinémie avec le risque de survenue de l'accident vasculaire cérébral a été mesurée dans une cohorte de patients siciliens âgés de 60 à 80 ans (Stella *et coll.,* 2007).

III.2. Carence en donneurs de méthyles et système nerveux central (SNC)

L'HCY est un puissant neurotoxique, connu pour son effet pro-oxydant et pro-apoptique, et entraînant une altération de l'équilibre prolifération/différentiation cellulaire lorsqu'il s'accumule dans les cellules (Lipton *et coll.,* 1997 ; Parsons *et coll.,* 1998 ; Kruman *et coll.,* 2000 ; Battaglia-Hsu *et coll.,* 2009 *;* Akchiche *et coll.,* 2012). Des études ont montré que les rats présentant une accumulation d'HCY dans le cerveau souffraient d'un retard de croissance neuronale et cognitif (Algaidi *et coll.,* 2006).

III.2.1. Conséquences au niveau cellulaire

Induction d'un stress oxydant

Bien que les mécanismes de sensibilisation des neurones au stress oxydant par l'HCY soient mal décrits, il a été proposé que le groupement sulfhydryle de l'HCY soit oxydé en produisant l'anion superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Wall *et coll.,* 1980; Starkebaum and Harlan, 1986 ; Jakubowski, 2007). La diminution de l'activité de la glutathion peroxydase, consécutive à l'accumulation d'HCY, contribuerait également à l'augmentation de la teneur intracellulaire en H_2O_2 (Nishio and Watanabe 1997 ; Upchurch *et coll.,* 1997).
Les espèces réactives dérivées de l'oxygène produites par l'HCY jouent un rôle majeur dans la survenue de lésions neurodégénératives (Ho *et coll.,* 2003 ; James *et coll.,* 2004), notamment en entraînant la peroxydation des lipides membranaires des cellules neuronales (Jara-Prado *et coll.,* 2003). Aussi, l'HCY réagit avec les résidus lysine des protéines à l'origine de leur perte de fonction ou activité catalytique pour les enzymes. Ainsi, le dysfonctionnement des systèmes enzymatiques participant à la régulation de la production des espèces réactives de l'oxygène, est à l'origine des effets délétères liés au stress oxydant.
Les folates jouent un rôle antioxydant dans le SNC. Une étude clinique a montré que les vitamines du groupe B pouvaient atténuer les dommages oxydatifs lorsqu'elles étaient administrées immédiatement après une ischémie cérébrale (Ullegaddi *et coll.,* 2002). Dans un modèle expérimental d'ischémie chez le rat, Villalobos *et coll.* (2000) ont montré que l'addition de SAM entraînait une réduction du taux de peroxydation lipidique ainsi qu'une augmentation de la production de GSH, protégeant les neurones. Ces effets antioxydants de la SAM ont été confirmés dans une autre étude sur le cerveau de rat (De La Cruz *et coll.,* 2000).

Effet pro-apoptotique

Une carence en donneurs de groupements méthyles provoque une altération des mécanismes de régulation épigénétique, en conséquence de la diminution des concentrations en méthionine et en SAM et la réduction du taux de méthylation de nombreux gènes qui en découle (Wainfan et Poirier, 1992 ; McKay *et coll.,* 2011).

Cette hypométhylation favorise l'accessibilité des brins d'ADN au clivage par l'endonucléase entraînant des cassures des brins et des altérations des mécanismes de réparation de l'ADN déclenchant une apoptose (Pogribny *et coll.*, 1995). En effet, les cassures des brins de l'ADN vont activer une enzyme de réparation de l'ADN simple brin, la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), qui catalyse la synthèse de poly (ADP-ribose) en utilisant le NAD^+ comme substrat. Ce mécanisme de réparation épuise les réserves en ATP et active la protéine p53 (suppresseur de tumeur) ainsi que la caspase-3, déclenchant ainsi l'apoptose des neurones en culture (Kruman *et coll.,* 2000).

Dans une étude menée chez des souris transgéniques homozygotes pour le gène *MTHFR*, la diminution de la prolifération cellulaire et l'augmentation de l'apoptose contribuent à la perte des cellules granulaires dans le cervelet (Chen *et coll.,* 2005).

Inversement, la voie de méthylation de l'ADN joue un rôle important dans l'inhibition de l'apoptose induite par l'HCY : une supplémentation en SAM a une action bénéfique sur les lésions ischémiques en réduisant la mort neuronale chez les gerbilles (Rao *et coll.,* 1997). Egalement, une supplémentation en vitamines B protège les cellules granulaires du cervelet en culture de l'apoptose (Lin *et coll.,* 2004).

III.2.2. Carence en donneurs de méthyles et développement de pathologies neurodégénératives

Au cours du vieillissement, l'augmentation du taux d'HCY circulant, du stress oxydant, des mécanismes d'excitotoxicité, de l'altération de l'ADN et de l'apoptose sont impliqués dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives (Kronenberg *et coll.,* 2009).

III.2.2.1. Maladie d'Alzheimer

Un ensemble de données cohérentes de la littérature montre une relation entre l'hyperhomocystéinémie et la maladie d'Alzheimer (MA) (Seshadri *et coll.,* 2002). Ainsi, selon certains auteurs, elle pourrait constituer un marqueur précoce des troubles cognitifs (Clarke *et coll.,* 1998 ; Lehmann *et coll.,* 1999 ; De Jager *et coll.,* 2012). Une association entre

la survenue de la MA et plusieurs variants génétiques des enzymes clés du métabolisme de l'HCY, dont le polymorphisme 667C>T de la MTHFR, a été reportée dans l'équipe (Anello *et coll.,* 2004).
Des résultats obtenus sur des cerveaux de patients atteints de la MA tendent à confirmer que le transport et la voie d'action de l'HCY sont particulièrement altérés et laissent supposer qu'elle favoriserait la formation de dépôts amyloïdes (White *et coll.,* 2001).
Par ailleurs, d'autres données montrent qu'une carence en folates chez la souris provoque une altération de la plasticité synaptique et de la neurogenèse dans l'hippocampe, ainsi qu'une apparition de dépôts de type amyloïde dans les vaisseaux cérébraux (Zhuo *et coll.,* 2010). En effet, l'accumulation d'HCY consécutive à la carence en folates peut potentialiser la neurotoxicité du peptide amyloïde β (Aβ) dans des cellules neuronales de l'hippocampe en culture, ainsi que chez des souris sur-exprimant le précurseur de la protéine amyloïde (Kruman *et coll.,* 2002). Une privation en folates induirait, en plus de l'accumulation d'HCY, une augmentation de la production des espèces réactives par le peptide Aβ, alors qu'une supplémentation en folates aurait un effet préventif (Ho *et coll.,* 2003). Les folates pourraient donc moduler l'effet neurotoxique d'Aβ.

Le phénomène d'excitotoxicité lié à l'HCY et son rôle dans la pathogénie de la MA reste assez mal connu. Hasegawa et ses collaborateurs ont proposé que ce serait l'acide homocystéique, un produit d'oxydation de l'HCY, qui favoriserait la production du peptide Aβ et contribuant ainsi à la pathogénèse de la MA (Hasegawa *et coll.,* 2005).

Enfin, le lien entre l'accumulation d'HCY et la MA pourrait également impliquer la protéine HERP *(Homocysteine-inducible Endoplasmic Reticulum stress Protein)*, présente dans la membrane du réticulum endoplasmique. HERP augmente l'activité de la γ-sécrétase, enzyme permettant le clivage du précurseur du peptide A β en peptide A β42, forme toxique du peptide (Sai *et coll., 2002*). D'autres travaux seront nécessaires pour préciser le rôle des HERP dans la MA.

III.2.2.2.Maladie de Parkinson

Bien que le lien entre la maladie de Parkinson et l'altération du métabolisme de l'HCY soit moins bien documenté que dans la MA, certaines études suggèrent que les folates d'origine alimentaire et les taux plasmatiques d'HCY sont associés à cette maladie.

En effet, une hyperhomocystéinémie a été mesurée (Yasui *et coll.,* 2000 *;* Blandini *et coll.,* 2001) et a été associée à la mutation C677T de la MTHFR chez les individus atteints de cette pathologie. L'administration de lévodopa, utilisée dans le traitement de la maladie, pourrait favoriser l'épuisement des groupements méthyles suite à sa méthylation par la catéchol-O-méthyltransférase, provoquant une élévation du taux d'HCY dans le cerveau **(**Liu *et coll.,* 2000). Ceci conduirait à une accélération du processus neurodégénératif au lieu d'atténuer la maladie.

Chez des souris traitées au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), modèle animal de la maladie de Parkinson, la carence en donneurs de méthyles associée à une hyperhomocystéinémie entraînerait une augmentation de la perte des neurones dopaminergiques. De même, la carence en folates et la concentration accrue en HCY sensibiliseraient des neurones dopaminergiques humains en culture à une mort cellulaire induite par la roténone et le fer, deux agents impliqués dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson (Duan *et coll.,* 2002). Ces résultats suggèrent que la carence en folates et une augmentation du taux d'HCY pourraient endommager les neurones dopaminergiques et accélérer l'apparition et la progression de la maladie de Parkinson.

III.2.3 Carences en donneurs de méthyles et développement de désordres neuropsychiatriques

Les troubles psychiatriques sont assez fréquents chez l'adulte. En France, les épisodes de dépression et d'anxiété touchent respectivement 8% et 13% de la population, alors que moins de 1% souffre de schizophrénie au cours de la vie. Les facteurs génétiques contribuent à la mise en place des troubles psychiatriques, mais les facteurs environnementaux joueraient également un rôle majeur.

Il y a plus de trois décennies, une étude a montré pour la première fois un lien entre la carence en donneurs de méthyles et la dépression : les individus souffrant de dépression présentaient des taux de folates plasmatiques diminués par rapport à des patients témoins (Reynolds *et coll.,* 1970). En outre, une supplémentation en folates chez des patients souffrant de dépression a permis de freiner la pathologie (Alpert *et coll.,* 2000). Une autre étude a montré que les taux diminués du métabolite de la sérotonine, l'acide 5-hydroxyindolacétique, dans le liquide céphalorachidien de patients atteints de dépression, ceux-ci étant restaurés par une supplémentation en folates (Botez *et coll.,* 1982).

La diminution des concentrations en SAM, principal donneur de groupements méthyles, aurait également un impact important puisque les réactions de méthylation participent à la synthèse de nombreux neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline dont les déficits sont impliqués dans la physiopathologie de la dépression (Bottiglieri *et coll.,* 2000).

La schizophrénie représente un autre trouble psychiatrique qui serait associé au métabolisme des folates. Une étude menée par Susser *et coll.,* (1998) a montré une augmentation du risque de développer la maladie associé à une carence en folates, ce risque n'étant pas retrouvé en cas d'une carence en folates sans modification de l'homocystéinémie. De plus, les patients homozygotes pour le polymorphisme *MTHFR C677T* présentent une hyperhomocystéinémie associée à un risque accru pour développer une schizophrénie (Regland *et coll.,* 1995 ; Stover, 2011).

III.2.4 Cas particuliers des carences gestationnelles en folates

Au cours de la grossesse, une carence en folates associée à une hyperhomocystéinémie augmente le risque d'apparition des pathologies affectant le développement du SNC dont les défauts de la fermeture du tube neural (DFTN) (Smithells *et coll.,* 1976 ; Safi *et coll.,* 2012), le meningocèle, l'encéphalocèle et l'anencéphalie. La carence en donneurs de groupements méthyles est également associée à des accouchements prématurés et la mort fœtale *in utero*. Il est à présent admis que la supplémentation péri-conceptionnelle en acide folique diminue le facteur de risque de ces malformations congénitales (Moyers and Bailey, 2001 ; Fekete *et coll.,* 2012)

Les recommandations actuelles de la HAS (*Haute Autorité de Santé*) préconisent une supplémentation en folates chez toutes les femmes ayant un désir de grossesse. Selon les données de l'AFSSA, environ trois quarts des femmes en âge de procréer auraient des apports alimentaires insuffisants. Une supplémentation systématique est donc recommandée à 400 µg d'acide folique par jour et 5 mg/j chez les femmes à risque, 4 semaines avant la conception et jusqu'à la 12ème semaine d'aménorrhée. Cependant, en 2010, seulement 40,3 % des femmes qui avaient donné naissance à un enfant en avaient bénéficié et, parmi celles-ci, 34,2% l'avaient débutée avant la grossesse. Face à ce manque, l'Inpes lance actuellement un appel

auprès des professionnels de santé (médecins, pharmaciens) pour relayer au mieux cette recommandation auprès des femmes

Les DFTN se produisent durant les premiers stades de l'embryogenèse. Un déficit en vit B12 pourrait également être en cause (Guerra-Shinohara *et coll.,* 2002) et selon de nombreux auteurs, le programme de la lutte contre les DFTN devrait associer l'administration péri-conceptionnelle en acide folique et en vit B12. Une étude effectuée chez les femmes au cours de la première moitié de la grossesse, montre des taux significativement plus bas de folates plasmatiques mais aussi de vit B12 sérique, chez les mères ayant un fœtus atteint de DFTN (Kirke *et coll.,* 1993 ; Groenen et coll., 2004). D'autres études ont montré que les nouveau-nés porteurs d'une anomalie du tube neural présentent une réduction des taux plasmatiques d'acide folique (Steegers-Theunissen *et coll.,* 1994 ; Brouwer, 2000).

Les anomalies du développement sont également reliées à certaines mutations enzymatiques. En effet, le polymorphisme *MTHFR* C677T est associé à une augmentation du taux d'HCY et à une apparition d'un DFTN (Shields *et coll.,* 1999). Le polymorphisme *MTRR* 66GG, combiné à des taux faibles de vit B12, a également été rapporté pour son implication dans les DFTN au Canada, alors que les génotypes *TCN* 776GG et *MTRR* 66GG associés au génotype *MTHFR* 677CC sont des prédicteurs des DFTN dans une étude réalisée en Sicile (Guéant *et coll.,* 2003).

Durant l'enfance, la mutation C677T du gène de la *MTHFR* peut entraîner une régression psychomotrice, un retard mental sévère et des symptômes psychiatriques (Haworth *et coll.,* 1993). Une hyperhomocystéinémie sévère associée à des mutations du gène *CBS* ou des déficits héréditaires en transcobalamine II peut entraîner des complications neurologiques comprenant un retard mental, les troubles psychiatriques, des convulsions et des dystonies (Mudd *et coll.,* 1985 ; Thomas *et coll.,* 1982). La carence en vit B12 peut produire une régression psychomotrice, une neuropathie sensorielle, une hypotonie sévère, des convulsions et une apathie, qui pourraient résulter d'un défaut de myélinisation (Hall, 1990 ; Lovblad *et coll.,* 1997). L'association entre les déficits en vit B9 et B12 et l'autisme a également été décrite (Lowe *et coll.,* 1981 ; Schmidt *et coll.,* 2012) et, plus récemment, une étude norvégienne vient de mettre en évidence que les femmes supplémentées en vit B9 présentaient un risque plus faible de donner naissance à un enfant autiste (Surén *et coll.,* 2013).

Au niveau cellulaire, les anomalies du développement résultent d'une altération de la prolifération, de la différenciation et de la mort des cellules neuronales. Des études menées sur des cellules en culture au laboratoire ont montré que la carence en folates réduit la

prolifération des cellules embryonnaires de la lignée H19-7 (Kruman *et coll.,* 2005 ; Akchiche *et coll.,* 2012). La carence en vit B12 réduit la prolifération et active la différentiation des cellules de la lignée de neuroblastome NIE115 (Battaglia-Hsu SF *et coll.,* 2009). D'autres études ont montré que la carence en folates entraîne l'inhibition de la prolifération des cellules souches neuronales et une apoptose des neurones nouvellement formés (Kruman *et coll.,* 2002 ; Crasinescu *et coll.,* 2004). Selon les auteurs, les neuroblastes mitotiques sont très sensibles au défaut d'incorporation d'uridine au cours de la phase de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire, ce qui expliquerait en partie l'inhibition de la prolifération des cellules. Par contre, une supplémentation en folates favorise la neurogenèse (Liu *et coll.,* 2010 ; Zhang *et coll.,* 2012) et la régénérescence des axones dans le système nerveux des rongeurs (Iskandar *et coll.,* 2010).

Une carence gestationnelle en donneurs de groupements méthyles présente aussi des effets à long terme, ce qui est en accord avec l'hypothèse du « *fetal programming* » défini par les effets de facteurs environnementaux sur le développement du fœtus et sur des maladies neurologiques à l'adolescence et à l'âge adulte (Swanson *et coll.,* 2009).

IV. Les conséquences d'une altération du métabolisme des folates sur la stéroïdogénèse

En 1928, Evans montrait qu'une carence en vitamines B réduisait la taille et la fonction des glandes sexuelles et qu'elle entraînait un dysfonctionnement du métabolisme des hormones sexuelles (Evans, 1928). Cependant, en dehors de quelques observations portant sur les stéroïdes sexuels et la fonction reproductrice, il existe peu de données dans la littérature quant aux conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur la synthèse des stéroïdes.

Chez l'homme, une association entre le polymorphisme C677T du gène de la MTHFR et l'infertilité masculine a été reportée (Bezold *et coll*., 2001). L'implication de ces troubles du métabolisme de l'HCY dans l'infertilité s'explique par l'altération de la synthèse d'ADN qui par conséquent perturbe la spermatogenèse. Chez la souris, une déficience en MTHFR provoque une réduction du poids des testicules et du nombre de spermatozoïdes (Kelly *et coll.*, 2005). Dans une autre étude réalisée sur le porc carencé en folates, des auteurs ont mesuré une diminution du nombre de cellules germinales et des concentrations circulantes en

LH, en testostérone et en estradiol, associées à une altération de l'activité de l'aromatase ainsi qu'un accroissement de l'activité MS dans les cellules de leydig (Wallock-Montelius *et coll.,* 2007). Or, selon Halested *et coll*. (2002), une déficience en folates favoriserait l'hypométhylation de l'ADN dans le foie des porcs. Une étude antérieure basée sur une carence en donneurs de groupements méthyles (dont l'acide folique et la vit B12) avait montré une diminution du rapport SAM/SAH dans les testicules de rats mâles (Shivapurkar et Poirier, 1983).

La carence en folates peut réduire le taux d'estrogènes circulants. Chez la femme, des corrélations négatives ont été mesurées entre la concentration en HCY dans le liquide folliculaire et sa qualité, ainsi que le degré de maturation ovocytaire (Szymanski et Kazdepka-Zieminska, 2003). Plus récemment, Twigt *et coll* (2011) ont reporté que la carence en folates entraînait une réduction du taux d'estradiol associée à une diminution de la fertilité ou une altération de la prolifération cellulaire chez les femmes subissant une stimulation ovarienne.
Selon une étude effectuée sur une population humaine d'origine américaine, la concentration sérique en estradiol est inversement proportionnelle au taux d'HCY circulante (Morris *et coll.,* 2000). L'accumulation de SAH affecte le métabolisme des catéchol-estrogènes (métabolites actifs impliqués dans la carcinogenèse mammaire) en inhibant l'activité enzymatique de la catechol-O-méthyltransférase responsable de sa méthylation (Zhu, 2003).
L'altération de la biosynthèse des stéroïdes en cas de carence en donneurs de groupement méthyles pourrait être liée à une diminution de l'activité et/ou de l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse. Une étude antérieure montre que les taux de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) ont diminué significativement dans plusieurs tissus de rats recevant un régime carencé en donneurs de méthyles (Henning *et coll.,* 1997). Or, Les enzymes telles que la P450scc, la 3β-HSD, la 17β-HSD et l'aromatase utilisent les cofacteurs type nicotinamides ($NADPH/NADP^+$ et $NADH/NAD^+$) pour catalyser les réactions (Agarwal et Auchus, 2005). La diminution du rapport $NADPH/NADP^+$ ou $NADH/NAD^+$ se traduit par une diminution de l'activité de ces enzymes qui pourrait conduire à une altération de la voie de synthèse.

En résumé, le métabolisme des folates pourraient jouer un rôle important dans la synthèse des stéroïdes à travers leur implication dans les réactions de méthylation. A notre connaissance, aucune donnée n'existe dans la littérature quant aux éventuelles interactions entre la carence en donneurs de méthyles et la synthèse locale de stéroïdes dans le cerveau.

CHAPITRE II : La neurostéroïdogénèse

Grâce aux études pionnières de Baulieu et ses collaborateurs (Corpéchot *et coll.,* 1981), il a été montré au cours de ces deux dernières décennies que le cerveau était capable de synthétiser les stéroïdes *de novo*. Après ablation des glandes stéroïdogènes telles que les glandes surrénales et les gonades, un taux élevé de déhydroépiandrostérone (DHEA) a été mesuré au niveau cérébral. Dès 1981, Corpechot *et coll*., avaient proposé le terme « *neurostéroïdes »* pour désigner les hormones stéroïdes telle que la DHEA, qui est synthétisée dans le cerveau des rats adultes et présente à une concentration plus élevée que dans le plasma et les gonades.

Cependant, il a fallu attendre plusieurs années avant que la notion de neurostéroïdogenèse (NSG) soit reprise. Grâce à la technique de RT-PCR, il a été montré que les enzymes de la stéroïdogenèse comme le cytochrome P450 scc (*P450 side-chain cleavage*), le cytochrome P450 aromatase (CYP19) et d'autres enzymes étaient présentes dans les cellules granulaires du gyrus denté et dans les cellules pyramidales des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. Ces enzymes sont également exprimées dans les astrocytes (Zwain *et coll.,* 1999) et dans les cellules de *Purkinje* du cervelet (Furukawa *et coll.,* 1998 ; Tsutsui *et coll.,* 2006). Ces observations ont permis de confirmer l'existence d'une synthèse locale d'estrogènes au niveau cérébral (Hojo *et coll.,* 2008).

D'autre part, il a été démontré que dans les conditions physiologiques, il existe une activité basale de la NSG dans les neurones. En cas de dommages cérébraux, la microglie (essentiellement les astrocytes) synthétise localement les neurostéroïdes pour protéger efficacement les neurones. Ce concept de NSG ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement de pathologies neurodégénératives et d'autres pathologies du SNC, vu le rôle pléiotrope des stéroïdes pour promouvoir la neurogenèse et la plasticité synaptique.

I. La voie métabolique de synthèse des neurostéroïdes (Figure 6)

La NSG, à l'instar de la stéroïdogenèse dans les gonades, a pour but la formation d'hormones sexuelles à partir du précurseur commun, le cholestérol. Ce dernier est synthétisé localement dans le cerveau à des niveaux plus élevés en période post-natale précoce qu'à l'âge adulte (Waelsch *et coll.,* 1940).

Il est capté sous forme de cholestérol estérifié dans les LDL *via* les LDL récepteurs. Une fois intégré dans la cellule, il va être libéré dans le cytoplasme sous forme de cholestérol libre. Il

est ensuite transporté à travers les membranes mitochondriales grâce à un complexe protéique, le « transduceosome » incluant la protéine StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) et la TSPO (*Translocator Protein*) qui jouent un rôle majeur dans ces mécanismes. Cette étape constitue l'étape limitante de la NSG. Une fois présent dans la mitochondrie, le cholestérol est pris en charge par le cytochrome P450scc ou CYP11A1 pour être transformé en prégnénolone (PREG).

La PREG va alors migrer dans le réticulum endoplasmique, où elle va être déshydrogénée en progestérone par la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD). L'allopregnanolone (3α, 5α-tetrahydroprogestérone), un métabolite de la progestérone, est également synthétisée par les enzymes 5α-réductase et 3α-HSD.

La progestérone va être transformée par la cytochrome P450 17α-hydroxylase/c17, 20-lyase (P450 17α-lyase) en androstènedione (Tsutsui *et coll.,* 2011). Cette enzyme va également convertir la PREG en déhydroépiandrostérone (DHEA). Notons que la PREG et la DHEA existent toutes les deux sous forme de prégnénolone sulfate (PREG-S) et DHEA sulfate qui sont des formes de réserves. La DHEA va être déshydrogénée par la 3β-HSD pour aboutir à la formation d'androstènedione.

A partir de cette étape, il existe deux voies de synthèse utilisant les mêmes enzymes et aboutissant au même produit de réaction: l'estradiol. L'androstènedione peut être pris en charge par la 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17β-HSD) pour former la testostérone, qui sera à son tour être transformée en 17β-estradiol grâce à la cytochrome P450 aromatase (P450 arom) ou CYP19. L'androstènedione peut aussi être d'abord modifiée par la P450 arom en estrone qui sera ensuite pris en charge par la 17β-HSD pour aboutir à la formation de 17β-estradiol (Shibuya *et coll.,* 2003).

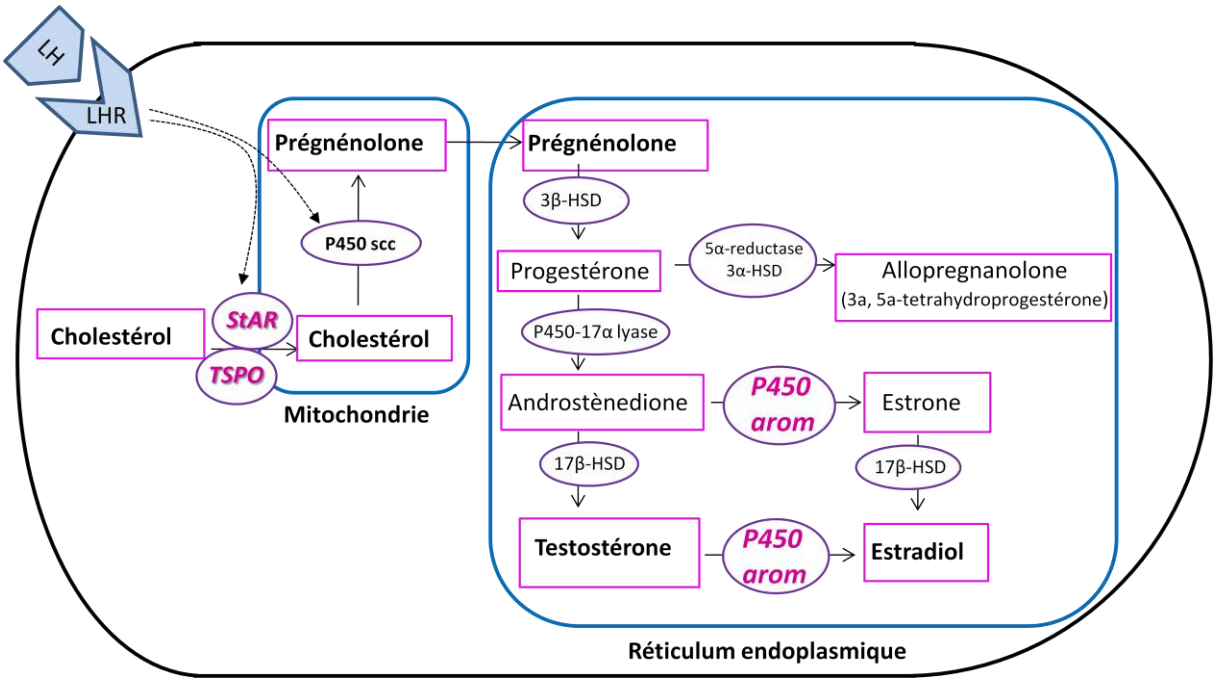


Figure 6: Schéma représentant les différentes étapes de la neurostéroïdogénèse. LH : hormone lutéinisante. LHR : récepteur de l'hormone lutéinisante. StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. TSPO : *translocator protein*. P450 scc : *cytochrome P450 side-chain cleavage*. 3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase. P450 17α-lyase : P450 17α-hydroxylase/c17,20-lyase. 17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase. P450 arom : cytochrome P450 aromatase.

II. Mécanisme de transfert du cholestérol à travers les membranes mitochondriales *via* les protéines StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) et TSPO (*Translocator Proteine*)

La synthèse des neurostéroïdes implique le recrutement d'un complexe protéique, le *transduceosome,* situé dans la membrane externe de la mitochondrie. Ce complexe permet le transport du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie afin d'atteindre la P450scc pour être transformé en PREG (Midzak *et coll.,* 2011).

Dans les tissus stéroïdogéniques, le *transduceosome* (Figure 7) est activé en réponse à une stimulation hormonale permettant d'activer une voie de signalisation AMPc-dépendante qui, à son tour, va activer la protéine kinase A (PKA). La protéine TSPO (*translocator protein,* 18kDa), localisée dans la membrane externe de la mitochondrie, forme un complexe avec d'autres protéines, notamment les protéines VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*, 34kDa) et ANT (*Adenine Nucleotide Transporter*, 30kDa) présentes dans la membrane interne de la mitochondrie (McEnery *et coll.,* 1992). Ce complexe interagit avec la protéine PAP7 (*PBR associated protein 7*) qui va recruter la sous-unité PKA-RIα activée permettant la phosphorylation de la protéine StAR. Sous cette forme phosphorylée, la protéine StAR

devient active et capable d'interagir avec les autres protéines du *transduceosome* pour assurer le transfert du cholestérol dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 7).

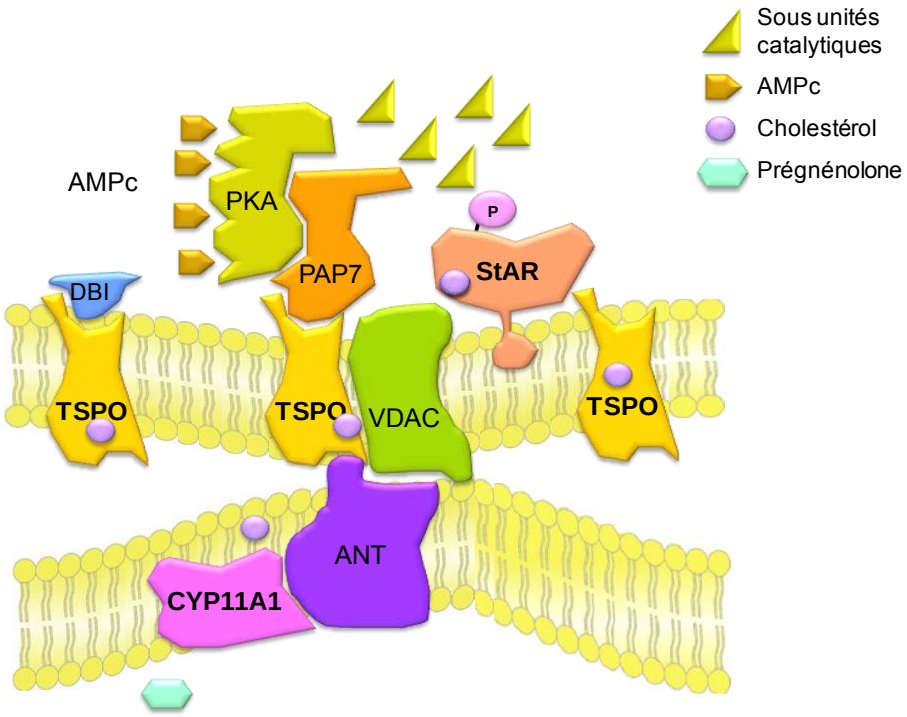


Figure 7: Représentation schématique de l'interaction entre les différentes protéines formant le transduceosome, (*D'après Rone et coll., 2009*). StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. TSPO : *translocator protein*. PKA: protéine kinase A. VDAC : *Voltage-Dependent Anion Channel*. ANT : *Adenine Nucleotide Transporter*. PAP7 : *PBR associated protein 7*. DBI : *diazepam binding inhibitor*.

II.1. La protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein)

La protéine StAR est une protéine mitochondriale de 30 kDa issue d'un précurseur de 37 kDa. Elle est activée par phosphorylation sur un résidu serine en position 195 par la protéine PKA. La mutation de ce résidu réduit la capacité de StAR à transporter le cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie (Arakane *et coll.,* 1997 ; Baker *et coll.,* 2007). Elle contient le domaine STRAT (*StAR related lipid transfert*) en son extrémité C-terminale, responsable du transfert du cholestérol et des lipides (Chang *et coll.*, 2012). Ce domaine est constitué d'une structure en feuillet β entourée de 2 hélices α représentant une poche hydrophobe pouvant recevoir un stérol (Strauss *et coll.*, 2003) (Figure 8). La structure est stabilisée par la fixation du cholestérol.

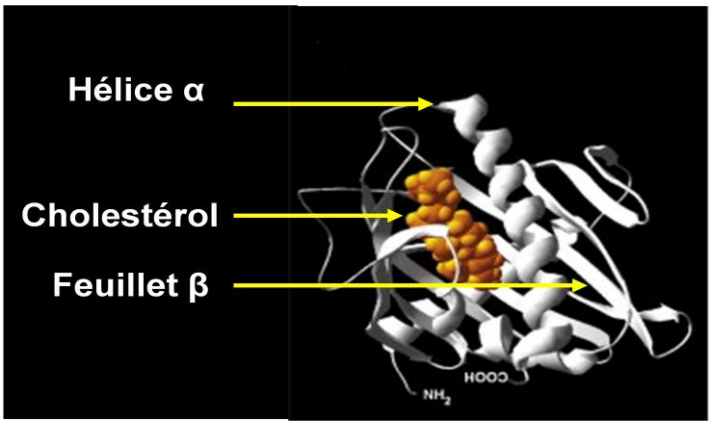


Figure 8: Structure du domaine START de la protéine StAR, (*D'après Rone et coll., 2009*)

Dans le SNC, la protéine StAR a été localisée dans plusieurs types cellulaires : les épendymocytes, l'astroglie, les cellules de Schwann des nerfs périphériques ainsi que dans les cellules en prolifération au cours du développement (King *et coll.,* 2002 ; Sierra *et coll.,* 2003 ; Lavaque *et coll.,* 2006b). Dans le cerveau de rat adulte, elle est co-localisée avec les autres enzymes de la NSG, et on la retrouve dans les neurones pyramidaux des régions CA1-CA3 de l'hippocampe ainsi que dans les cellules granulaires du gyrus denté (Kimoto *et coll*., 2001).

La protéine StAR est retrouvée dans les zones de neurogenèse du cerveau, comme les progéniteurs neuronaux de la zone sub-ventriculaire (SVZ) ainsi que les bulbes olfactifs (BO), zone de projection des précurseurs neuronaux *via* la voie de migration rostrale. Son effet neuroprotecteur a largement été décrit et son expression augmente fortement dans l'hippocampe de rats traités à l'acide kaïnique (Sierra *et coll.,* 2003) ou après une lésion cérébrale (Mizoguchi *et coll.,* 1992). La protéine StAR assure la survie des neurones non seulement en promouvant la NSG mais aussi en régulant le métabolisme du cholestérol dans le cerveau (Sierra, 2004). Elle permet son transfert vers des enzymes produisant les oxystérols (dérivés oxygénés de cholestérol) telles que la cholestérol 27-hydroxylase. Les oxystérols traversent facilement la membrane cellulaire et sont connus pour contrôler l'homéostasie du cholestérol, ce qui est essentiel pour le maintien structural et fonctionnel de la membrane cellulaire des neurones.

Au cours de développement cérébral, ses niveaux d'expression sont particulièrement élevés durant la période post-natale. Une étude montre que l'expression de l'ARNm de StAR en période post-natale chez le rat varie selon les régions cérébrales. Dans l'hippocampe, il reste

faible les 2 premières semaines avant de s'accroître rapidement à la troisième semaine. Dans le cervelet, son expression la plus élevée apparaît chez les femelles à la cinquième semaine post-natale tandis que chez les mâles, elle apparaît à la dixième semaine. Enfin, dans les BO, l'expression de l'ARNm de StAR est également accrue au cours de développement (Kim *et coll.*, 2002).

La régulation de l'expression de StAR a surtout été décrite dans les tissus stéroïdogéniques. L'expression du gène *StAR* est régulée par des mécanismes épigénétiques. En 2004, une étude faite par Liu *et coll*. montre que les cellules surrénales traitées par un inhibiteur de méthylation de l'ADN, la 5-aza-2'-déoxycytidine (azad), entraînait une diminution de son expression. Dans une autre étude effectuée sur des cellules lutéales de rat en culture, l'inhibition de l'activité histone déacétylase par la trichostatine A augmente l'expression du gène *StAR* et le taux de synthèse des stéroïdes (Liu Q *et coll.,* 2007).

L'expression du gène *StAR* est stimulée par la fixation de l'hormone lutéinisante (LH) sur son récepteur (LHR) (Figure 9). Cette fixation de LH sur son récepteur va déclencher les deux voies de signalisation intracellulaire PKA et PKC-dépendantes permettant la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription situés dans la région promotrice du gène *StAR*, dont SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*) et CREB (*cAMP Response Element Binding protein*) (Manna *et coll.,* 2009). La phosphorylation de CREB sur sa sérine 133, permet le recrutement de son co-activateur CBP (CREB *Binding Protein*). Ce complexe permet de stimuler la transcription de gène *StAR* (Manna *et coll.,* 2003 ; Stocco, 2008) par le biais de sa fixation à l'élément de réponse à l'AMPc (CRE). Enfin, le résidu Ser133 constitue une cible des phosphatases (PP1, PP2A, calcineurine) qui inhibent l'activité de CREB par déphosphorylation (Lonze et Ginty, 2002).

Malgré l'absence de description de cette voie dans le cerveau, le LHR a été retrouvé dans les différentes régions de cerveau des fœtus et des rats adultes telles que le cervelet, l'hippocampe et les BO (Lei *et coll.,* 1993 ; Liu T *et coll*, 2007 ; Wang *et coll.,* 2012). L'expression des autres enzymes stéroïdogéniques, par exemple, la P450scc est fortement dépendante des *Selective promotor factors* (Sp) tels que Sp1, Sp2 ou Sp4 (Hammer *et coll.,* 2004). Ces facteurs sont également retrouvés dans les régions promotrices de la 3β-HSD humaine et de l'aromatase (Val *et coll.,* 2003).

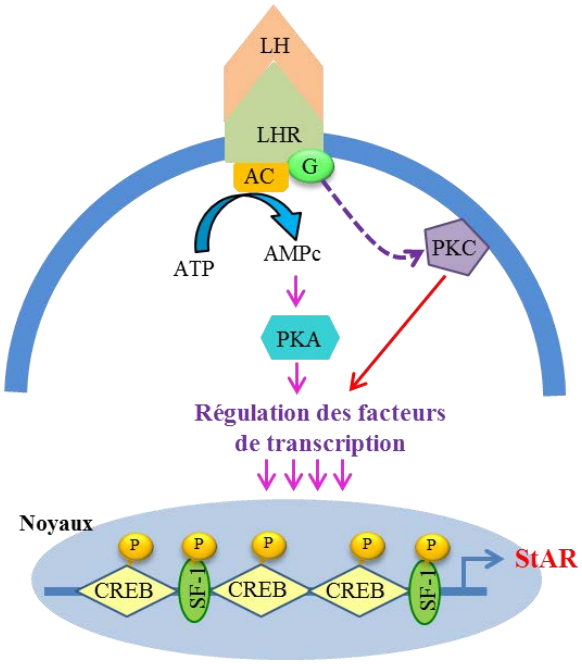


Figure 9: Schéma représentant la voie de signalisation régulant l'expression du gène StAR, (*Modifié d'après Manna et coll., 2009*). LH : hormone lutéinisante. LHR : récepteur de l'hormone lutéinisante. StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. PKA: protéine kinase A. PKC: protéine kinase C. G: protéine G. AC: adénylate cyclase. SF-1 : *Steroidogenic Factor-1*. CREB : *cAMP Response Element Binding protein.*

II.1.1. Régulation de la synthèse des stéroïdes

Le récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR)

Vu son rôle déterminant dans l'induction de l'expression de la plupart des enzymes de la stéroïdogenèse, le récepteur LHR tient une place importante dans le développement cérébral, en agissant sur la différentiation neuronale et la croissance des neurites (AL-Hader *et coll.,* 1997). Dans le cerveau adulte, il sera plutôt impliqué dans la régulation de fonctions comme celles intervenant dans la reproduction, la mémoire et la coordination motrice (Apaja *et coll.,* 2004).

Le récepteur LHR appartient à la famille des récepteurs transmembranaires couplés à la protéine G. C'est une glycoprotéine membranaire de 674 acides aminés de poids moléculaire de 85 à 95 kDa. Il comporte un domaine extracellulaire très long et fortement glycosylé capable de fixer l'hormone dans sa partie N-terminale, un domaine transmembranaire à sept hélices α et un domaine intracellulaire lié à la protéine G du côté C-terminal. Ce récepteur, décrit dans les cellules de la granulosa et les cellules lutéales de la femme et sur les cellules de Leydig de l'homme (Ascoli *et coll.,* 2002), est également exprimé dans le SNC et le système

nerveux périphérique du rat, en particulier dans les zones impliquées dans les fonctions sensorielles. Son expression débute chez le fœtus de rat à partir du 14ème jour embryonnaire et persiste à l'âge adulte dans les BO, l'hippocampe et le cervelet (Apaja *et coll.,* 2004).

Le facteur de transcription Steroidogenic factor 1 (SF-1)

SF-1 (*Steroidogenic factor 1*) également nommé Ad4BP (*Adrenal 4-binding protein*) ou NR5A1 (*nuclear receptor 5A1*), a été identifié par deux équipes recherchant les facteurs régulant les gènes de la stéroïdogénèse dans les glandes surrénales bovines (Honda *et coll.*, 1993; Lala *et coll.*, 1992).

Le gène codant pour le facteur de transcription SF-1 est un homologue murin du gène *Ftz-F1* (fushi tarazu factor 1) identifié chez la drosophile (Lavorgna *et coll.*, 1991). Il code pour quatre protéines: ELP1 (embryonic long terminal repeat-binding protein), ELP2, ELP3 et SF-1 (Parker et Schimmer, 1997). Bien que les ELPs jouent un rôle dans la répression de la transcription (Kotomura *et coll.*, 1997), une étude sur les souris invalidées pour le gène *SF-1* a montré qu'il était à lui seul l'activateur clé de la fonction endocrine (Luo *et coll.*, 1995).

Le facteur de transcription SF-1 fait partie des récepteurs nucléaires orphelins dont les ligands n'ont pas été identifiés. En effet, il comporte un domaine de liaison à l'ADN (DBD) dans sa partie amino-terminale, un domaine de liaison au ligand (LBD) et un domaine d'activation de la transcription (AF-2 : *activation function 2*) dans sa partie carboxy-terminale (Parker et Schimmer, 1997) (Figure 10).

L'expression du gène *SF-1* est régulée par des mécanismes épigénétiques. En 2007, une étude faite par Xue *et coll*. montre que les cellules stromales de l'endomètre traitées par un inhibiteur de méthylation de l'ADN, l'azad, entraînait une déméthylation du promoteur SF-1 et une augmentation de son expression. L'activité de SF-1 est contrôlée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'acétylation et la sumoylation ainsi que par la fixation de plusieurs ligands comme les phospholipides. La sumoylation inhibe l'activité de SF-1 (Chen *et coll.,* 2004) tandis que l'acétylation induite par la protéine p300, a un effet activateur (Chen *et coll.,* 2005). La phosphorylation de SF-1 déclenchée par plusieurs protéines kinase telles que la PKA et la MAPK (*mitogen-activated protein Kinase*), (Hammer *et coll.,* 1999) agit d'une façon indirecte sur l'activation de SF-1 en facilitant son recrutement au niveau du site d'initiation de la transcription. Aussi, les phospholipides comme la

phosphatidylcholine et la phosphatidylétahanolamine augmentent l'activité transcriptionnelle de SF-1 (Sablin *et coll.,* 2009).

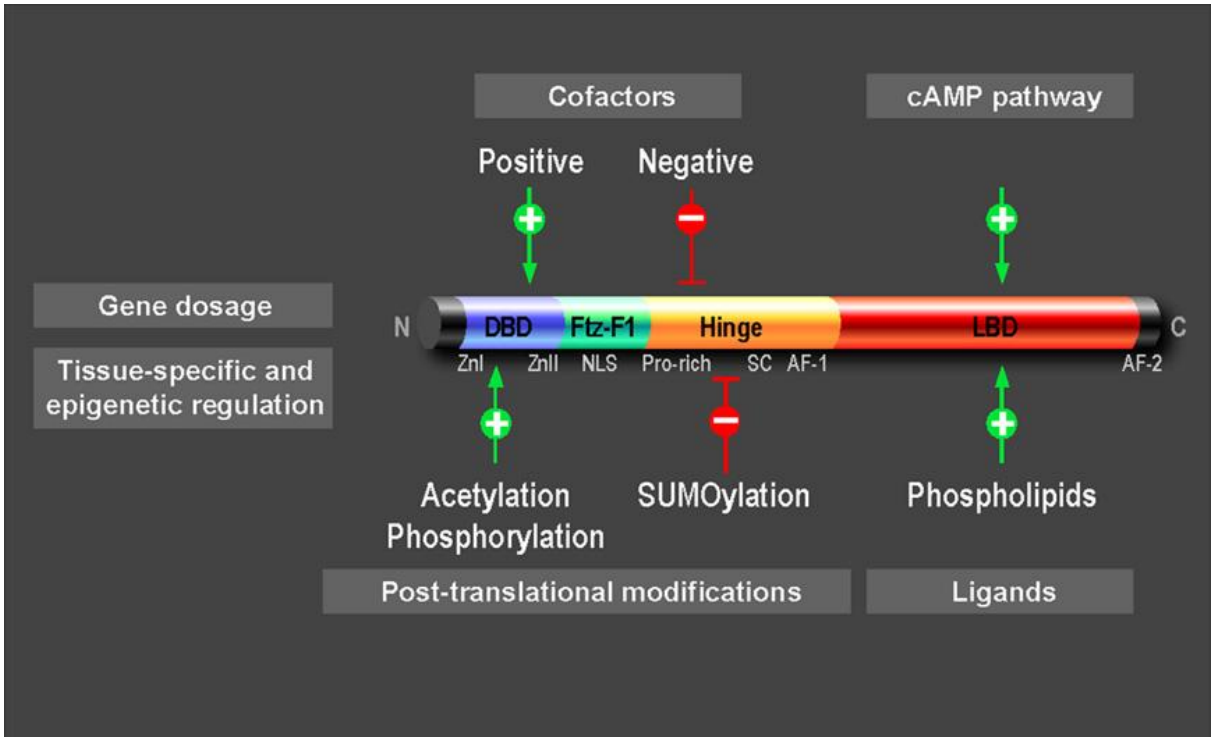


Figure 10: Structure de la protéine SF-1 et les mécanismes de contrôle de son activité transcriptionnelle, (*D'après Lalli et coll., 2013*). DBD : domaine de liaison à l'ADN à deux doigts de zinc (ZnI et ZnII). Ftz-F1 : boite Ftz-F1. NLS : *nuclear localization signal*. Hinge : région charnière. Pro-rich : région riche en proline. LBD : domaine de liaison au ligand. AF1 et AF2 : *activation function 1 and 2*.

Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, SF-1 se fixe sous forme d'un monomère sur les éléments de réponse présents dans la région promotrice des gènes cibles (Wilson *et coll.*, 1993) codant pour la protéine StAR et l'aromatase pour réguler la synthèse des stéroïdes. L'intérêt de ce facteur de transcription dans l'étude de la régulation des gènes de la stéroïdogenèse réside dans le fait qu'elle est essentiellement médiée *via* les modifications épigénétiques propres à SF-1, peu de sites de méthylation étant localisés dans les régions promotrices des gènes, et plus particulièrement celui de StAR (Martinez-Arguelles et Papadopoulos, 2010).

SF-1 est exprimé dans tous les tissus stéroïdogéniques tels que les glandes surrénales, les testicules et les ovaires. Dans le cerveau, selon les études précédentes, sa localisation serait restreinte aux neurones de la région ventro-médiale de l'hypothalamus (VMH). Seule l'étude

de Wehrenberg et ses collaborateurs (2001) montre la présence de SF-1 dans les cellules pyramidales de l'hippocampe du rat.
Au niveau de VMH, il joue un rôle dans la régulation de l'anxiété, des comportements sexuels féminins et du poids corporel *via* la modulation de l'activité physique (Budefeld *et coll*, 2012). De plus, chez les souris invalidées pour le gène *SF-1*, ont été observées une baisse de la fertilité (Kim *et coll.*, 2010) et une augmentation de l'anxiété lorsque ces dernières sont soumises à un nouvel environnement (Zhao *et coll.,* 2008).

II.2. La protéine translocatrice ou TSPO (Translocator Protein)

Des multiples sites d'initiation de la transcription ont été identifiés dans le promoteur du gène *TSPO* dont l'expression est sous le contrôle des voies PKC$^{\varepsilon}$-ERK1/2-AP-1/STAT3. Les facteurs de transcription Ets, Sp1/Sp3, AP2, AP1 et GATA jouent également un rôle majeur dans la régulation de l'expression de TSPO (Giatzakis et Papadopoulos, 2004).

La protéine TSPO, d'abord identifiée sous le terme de récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), est une protéine à 5 domaines transmembranaires localisée dans la membrane externe de la mitochondrie (Culty *et coll.,* 1999). A son extrémité C-terminale, un site de liaison de haute affinité au cholestérol, appelé le domaine CRAC (*cholesterol recognition amino acid consensus*), est responsable du transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie (Li *et coll.,* 1998).
Dans le SNC, la protéine TSPO se trouve principalement dans les cellules gliales et en très faible quantité dans les neurones. En effet, tout comme StAR, son expression est induite dans la microglie et les astrocytes lors d'une lésion neuronale ou en cas d'inflammation (Cosenza-Nashat *et coll.,* 2009). Ceci suggère que la protéine TSPO pourrait être impliquée dans les processus de neuroprotection. Une modification de l'expression de la protéine TSPO a été reliée au cours des années précédentes à plusieurs maladies, y compris les pathologies cancéreuses (Han *et coll.,* 2003), les lésions cérébrales (Batarseh *et coll.,* 2010) et les maladies neurodégénératives. Elle joue ainsi un rôle prépondérant dans les désordres psychiatriques puisque son expression est altérée dans l'anxiété et les troubles de l'humeur (Rocca *et coll.,* 1998). Dans la MA et la maladie de Parkinson, elle a été proposée comme un biomarqueur de l'inflammation et de la gliose réactive. Enfin, plusieurs données suggèrent que les endozépines (ligands endogènes des récepteurs aux benzodiazépines mitochondriales), telles que le triakontatétraneuropeptide et l'octadécaneuropeptide, augmentent la production des

neurostéroïdes à partir de PREG ou de cholestérol (Papadopoulos *et coll.,* 1991; Do-Rego *et coll.,* 2008). Ces données indiquent que la biosynthèse des neurostéroïdes serait sous le contrôle de nombreux neurotransmetteurs et/ou neuropeptides, mais les mécanismes impliqués dans cette régulation restent encore à clarifier.

A l'heure actuelle, TSPO représente une cible thérapeutique d'intérêt et différents ligands de TSPO sont en cours de développement comme l'isoquinoline PK 11195. En effet, ces composés présentent des effets anxiolytiques dénués des effets secondaires habituellement décrits pour les benzodiazépines (Rupprecht *et coll.,* 2009). De plus, le ligand Ro5-4864 de TSPO exerce des effets neuroprotecteurs dans le SNC après une lésion neuronale (Veiga *et coll.,* 2005).

III. La conversion des androgènes en estrogènes par la cytochrome P450 aromatase (CYP19)

C'est une protéine monomérique de 503 acides aminés (55 kDa), contenant un noyau héménique.

Elle appartient à la famille des cytochromes P450 et nécessite donc comme cofacteur le NADPH et le dioxygène. Elle est composée de 12 hélices α et 10 feuillets β (Ghosh *et coll.*, 2010) et s'insère dans la membrane du réticulum endoplasmique *via* son extrémité N-terminale glycosylée (Shimozawa *et coll.,* 1993). Ses substrats, l'androstènedione et la testostérone, se fixent dans la cavité distale héménique ou site actif de l'enzyme et réagissent avec le noyau ferrique de l'hème pour être transformés en estrone et 17β-estradiol, respectivement.

Le gène de l'aromatase (*CYP19*), d'une taille de 123 Kb, est localisé sur le bras long du chromosome 15 (Chen *et coll.,* 1988). Sa région régulatrice contient au moins dix promoteurs distincts exprimés de manière tissu-spécifique (gonade, tissu adipeux, cerveau, peau et placenta), (Figure 11). L'activation du promoteur va générer une même région codante allant de l'exon II jusqu'à l'exon X (environ 80 Kb) et une région 5'-UTR (*5'untranslated region*) contenant le premier exon qui varie en fonction du tissu (Bulun *et coll.*, 2003). A ce jour, dix différents premiers exons ont été trouvés dans le gène *CYP19*.

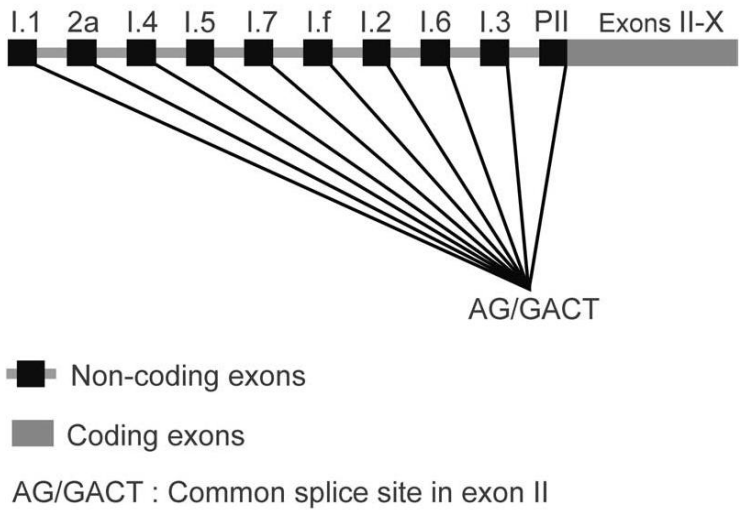


Figure 11: Représentation schématique du gène de l'aromatase humain, (*D'après Yague et coll., 2006*). Les différentes variantes de l'exon I non codant sont représentées en noir.

Dans le cerveau de rat, trois principaux promoteurs ont été décrits et sont situés en aval de l'exon I (type hypothalamus), en aval de l'exon II (type ovarien) et avant l'exon IV (type cortical). Le promoteur cortical étant exprimé avant l'exon IV, la région codante n'est pas entièrement transcrite (absence des exons II et III). On retrouve donc un taux d'ARNm relativement important mais une activité enzymatique faible dans le cortex cérébral (Kato *et coll.,* 1997).

Il existe deux voies d'activation de l'expression de l'aromatase au niveau cérébral :

- La voie génomique, responsable d'une expression lente et durable. Elle dépend des récepteurs aux stéroïdes qui s'homodimérisent suite à la liaison des stéroïdes et se fixent sur les séquences d'ADN spécifique. Ces récepteurs induisent le recrutement de plusieurs facteurs de transcription et des cofacteurs nécessaires à l'activation génomique de l'aromatase.
- La voie non génomique permet une expression rapide et transitoire de l'aromatase. Elle dépend du récepteur LHR et des récepteurs aux estrogènes (ERα et ERβ) localisés dans la membrane plasmique. Ces récepteurs interagissent avec les protéines G activant la voie AMPc-dépendante. Ce dernier va permettre l'activation des protéines PKA et PKC (Wade et Dorsa, 2003) et l'activation des facteurs de transcription CREB et SF-1.

La cytochrome P450 aromatase a été localisée dans les cellules de l'hypothalamus, mais aussi dans l'hippocampe et dans le cortex cérébral (MacLusky *et coll.,* 1994 ; Hojo *et coll.,* 2004). Son expression dans le cerveau diminue après la naissance et à l'âge adulte. Deux sites de phosphorylation dans la séquence de l'aromatase (la thréonine 455 et 486) sont responsables de la diminution de son activité dans le cerveau (Balthazart *et coll.,* 2003).

L'aromatase est impliquée dans la différentiation sexuelle du cerveau en période pré- et post-natale caractérisée par l'apparition de pics des niveaux d'expression de l'enzyme, intervenant à des périodes différentes chez les mâles et les femelles. L'expression de l'enzyme dépend donc d'un dimorphisme sexuel, ce qui permet la modulation des taux d'estrogènes nécessaires à la mise en place des circuits neuronaux sexe dépendants, qui à leur tour régulent les fonctions de reproduction (Colciago *et coll*, 2005).
Plus récemment, il a été montré que, en dehors de ses fonctions liées à la maturation sexuelle, l'aromatase intervient pour promouvoir la croissance des dentrites, la synaptogenèse et la formation des épines dendritiques dans le cerveau, notamment dans le cervelet en période de développement post-natal (Tsutsui, 2006). Une altération de la croissance dendritique a été observée dans les cellules de *Purkinjé* de souris invalidées pour le gène de l'aromatase (Sasahara *et coll*, 2007).
Le rôle neuroprotecteur de l'aromatase a largement été décrit. Lors des dommages cérébraux tels qu'une agression chimique ou une ischémie, les astrocytes sont capables d'accroître leur production en aromatase pour augmenter rapidement le taux d'estrogènes au niveau local (Garcia-Segura *et coll*, 2003). Dans l'hippocampe, l'aromatase joue un rôle prépondérant dans la plasticité synaptique et la neurogenèse grâce à une régulation fine et précise du taux d'estrogènes. Leur synthèse *de novo* dans les neurones hippocampaux permet une action locale et rapide au cœur de la synapse. La fixation des estrogènes sur les récepteurs ERα va permettre l'augmentation de la densité des épines dendritiques via l'activation de la voie de signalisation Erk/MAP kinase (Figure 12) (Hojo *et coll.*, 2008).

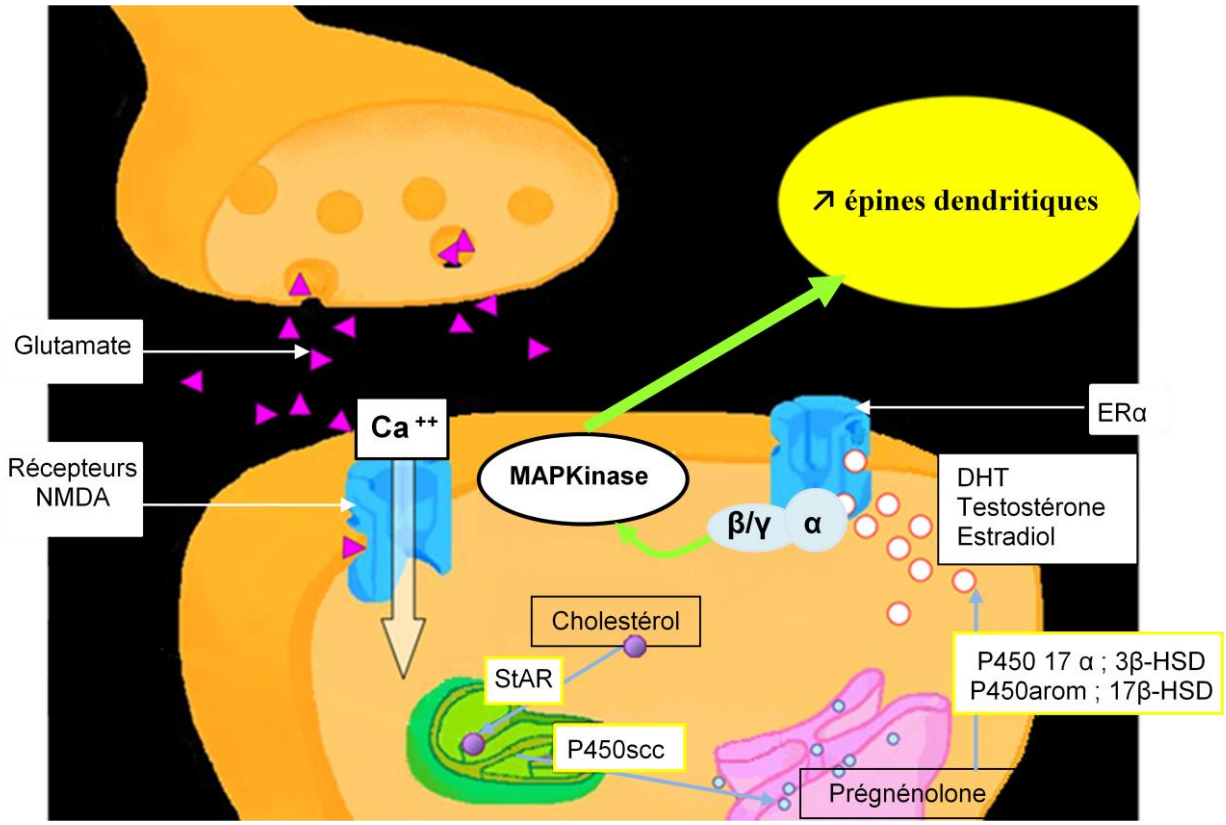


Figure 12: Schéma représentant les effets de l'estradiol sur la transmission synaptique dans l'hippocampe. (*Modifié d'après Hojo et coll., 2008*). StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. P450 scc : *cytochrome P450 side-chain cleavage*. 3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase. P450 17α-lyase : P450 17α-hydroxylase/c17,20-lyase. 17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase. P450 arom : cytochrome P450 aromatase. NMDA : N-méthyl-D-aspartate. ER : *Estrogen receptor***.** DHT : dihydrotestostérone. MAPKinase : *mitogen-activated protein Kinase*

IV. Rôle et localisation des récepteurs aux estrogènes dans le cerveau

En 1986, deux groupes de travail ont réussi à cloner et séquencer pour la première fois l'ADN complémentaire du récepteur aux estrogènes (ER) humain, l'ERα (Green *et coll.,* 1986). En 1996, un second ADNc codant l'isoforme β a été cloné chez l'homme (Kuiper *et coll.,* 1996). Les deux récepteurs (ERα et ERβ) sont les produits de deux gènes différents localisés sur des chromosomes distincts (Enmark *et coll.,* 1997). L'ERβ présente une forte homologie avec l'ERα au niveau du domaine de liaison à l'ADN (95%) et celui de liaison au ligand (55%) (Kuiper *et coll.,* 1996).

Les deux isoformes présentent 6 domaines communs à la structure de tous les récepteurs nucléaires, indépendants mais interactifs au niveau fonctionnel.

Les taux d'expression d'ER sont généralement élevés dans les zones cérébrales impliquées dans le comportement lié à la reproduction, notamment l'hypothalamus (Behl, 2002). L'ERβ se localise plutôt dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, alors que l'ERα se trouve dans les interneurones de la région CA1 et dans les cellules pyramidales et granulaires. Ces deux récepteurs contribuent également au rôle joué par les estrogènes dans la plasticité synaptique et les fonctions cognitives (Spencer-Segal *et coll*, 2012).

Au cours du développement du cervelet en période post-natale, les deux types de récepteurs sont exprimés, tandis que seul l'ERβ est détectable à l'âge adulte. En effet, les ERs vont permettre la mise en place des circuits neuronaux du cervelet ainsi que la maturation sexuelle qui s'achève autour du 23ème jour post-natal (Jakab *et coll.,* 2001, Fan *et coll.,* 2010). L'ERα est également exprimé dans les BO où il permet l'action des estrogènes dans les processus de neurogenèse intervenant dès la naissance des ratons, indispensables à la mise en place de l'apprentissage de l'odeur maternelle de la mère, étape cruciale pour leur survie (Veyrac et Bakke, 2011).

V. Rôle des neurostéroïdes dans le développement du cervelet

L'ARNm de StAR et de l'aromatase est fortement plus élevée pendant le développement du cervelet en période post-natal qu'à l'âge adulte. Une différence dans leur expression entre les mâles et les femelles a été retrouvée : au 10ème jour post-natal on observe un pic d'expression de l'ARNm de StAR et de l'aromatase chez les mâles, tandis que chez les femelles le pic d'expression de l'ARNm de l'aromatase apparaît au 5ème jour post-natal et celui de StAR s'étend du 10ème jour jusqu'au 20ème jour post-natal (Lavaque *et coll.,* 2006a).

L'augmentation de l'expression des enzymes de la NSG pendant la période post-natale suggère que la NSG agit sur le cervelet en déclenchant les mécanismes intracellulaires impliqués dans la croissance, la différentiation et la viabilité des neurones et des cellules gliales au cours de développement. Le dimorphisme sexuel dans leur expression permet la mise en place des circuits neuronaux sexe dépendante.

V.1. Rôle particulier de la progestérone et de l'alloprégnanolone

La maturation des cellules de *Purkinje* a lieu après la naissance. Durant cette période néonatale, les fortes concentrations de la progestérone et de son métabolite l'allopregnénelone

sont impliquées dans le développement du cervelet (Ukena *et coll.,* 1999). La progestérone favorise la croissance dendritique et la formation des épines dendritiques des cellules de *Purkinje in vivo* et *in vitro.* L'administration de RU486, antagoniste du récepteur de la progestérone (PR), inhibe l'action de la progestérone sur les dendrites des cellules de *Purkinje* (Sakamoto *et coll.,* 2001). Durant le développement, la progestérone agit directement sur les cellules de *Purkinje* à travers les récepteurs nucléaires (PR-A et PR-B) et le récepteur membranaire PR (25-Dx) (Sakamoto *et coll.,* 2004). Cette action induit l'expression des facteurs neurotrophiques tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et la neurotrophine 3 (NT-3) directement impliqués dans la croissance dendritique, la spinogenèse et la synaptogenèse des cellules de *Purkinje* et granulaires au cours de développement (Tsutsui, 2008a). L'alloprégnénolone est impliqué dans la survie des cellules de *Purkinje* et des cellules granulaires (Griffin *et coll.,* 2004).

V.2. Importance de l'estradiol

L'estradiol synthétisé *de novo* agit localement sur la maturation de cervelet au cours de développement post-natal en activant les récepteurs ERα et ERβ.

Chez le rat, pendant les trois premières semaines après la naissance, le récepteur ERβ est fortement exprimé dans les précurseurs des cellules granulaires. Il permet leur différentiation en stimulant la croissance des dendrites et des fibres parallèles. L'ERβ active donc l'expression des protéines du cytosquelette, telles que la protéine Tau, MAP1b (microtubule-associated protein 1b) et les neurofilaments qui sont essentiels pour la croissance axonale (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1986; Riederer *et coll.,* 1993; Riederer and Binder, 1994). Au cours de la deuxième semaine post-natale, peu de cellules granulaires qui migrent à travers la couche moléculaire primitive expriment l'ERβ. Il semble donc peu probable que l'ERβ joue un rôle important dans les mécanismes liés à la migration neuronale (Jakab *et coll.,* 2001).

Puisque l'interaction entre les cellules granulaires et les cellules de *Purkinje* influence sur la différenciation des cellules de *Purkinje in vitro* (Baptista *et coll.,* 1994), il est possible que la migration des cellules granulaires induise l'expression d'ERβ dans les cellules de *Purkinje*. Une forte expression d'ERβ est détectée dans les cellules de *Purkinje* au cours de la deuxième et la troisième semaine post-natale (Jakab *et coll.,* 2001). A ce stade, l'estradiol présent en forte concentration dans le cervelet, agit *via* ERβ directement sur les cellules de *Purkinje* pour activer l'expression des gènes codant pour le facteur neurotrophique (BDNF : *brain-derived*

neurotrophic factor) et de son récepteur TrkB (*tyrosine-related kinase*). Ce dernier adressé à la surface des cellules granulaire et des cellules de *Purkinje*, en présence de BDNF, déclenche la croissance dendritique, la synaptogenèse et la spinogenèse (Tsutsui, 2008b), (Figure 13). Durant les deux premières semaines post-natales, l'ERβ est également exprimé dans les cellules gliales lors de la migration. Son expression n'est plus détectable dans les cellules gliales matures (Jakab *et coll.,* 2001), au stade adulte.

D'autres études ont montré qu'en plus de l'ERβ, l'ERα est fortement exprimé pendant la période de la différentiation des cellules de *Purkinje*, permettant la croissance dendritique et la formation des synapses (Ikeda et Nagai, 2006).

En plus de la régulation de l'expression des gènes, l'estradiol agit directement pour activer les voies de signalisation intracellulaire telle que la voie ERK1/2 impliquée dans la prolifération et la différentiation neuronale et dans la migration des neurones et des cellules gliales dans le cervelet en développement (Belcher, 2008 ; Zsarnovszky et Belcher, 2004).

A l'âge de 21 jours, l'ERβ exprimé dans l'arborisation dendritique mature des cellules de *Purkinje* (Jakab *et coll.,* 2001) peut être impliqué dans la neurotransmission. Egalement, chez l'adulte, l'estradiol favorise la neurotransmission glutamatergique (Smith *et coll.,* 1988) entre les fibres parallèles des cellules granulaires et les dendrites des cellules de *Purkinje*.

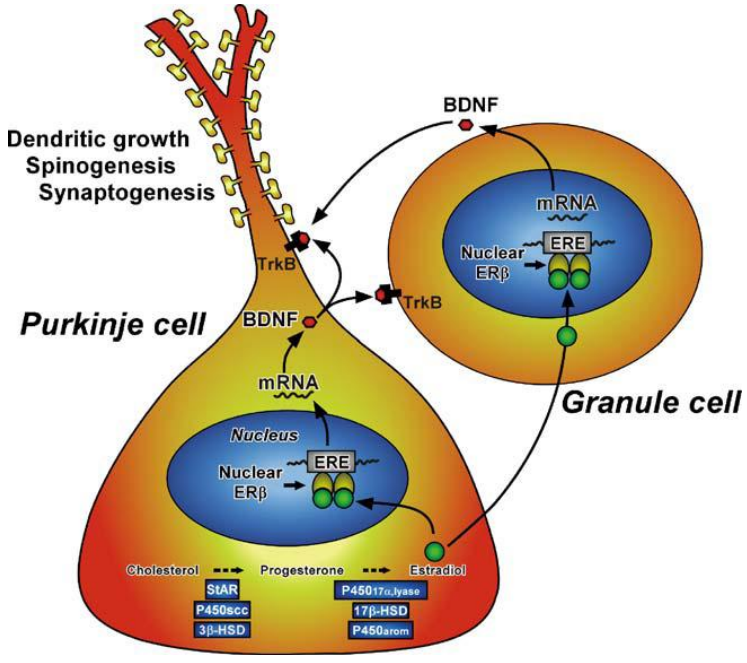


Figure 13: Un modèle schématique de l'action d'estradiol dans les cellules de *Purkinje* au cours du développement néonatal, (*D'après Tsutsui, 2008b*). StAR : s*teroidogenic acute regulatory protein*. P450scc : c*ytochrome P450 side-chain cleavage*. 3β-HSD : *3β-hydroxysteroid dehydrogenase*. P450 17α,lyase : cytochrome P450 17α-hydroxylase/c17,20-lyase. 17β-HSD : *17β-hydroxysteroid dehydrogenase*. P450arom : cytochrome P450 aromatase. ERβ *: estrogen receptor-β*. ERE : *estrogen response element*. BDNF : *brain-derived neurotrophic factor*. TrkB *: tyrosine-related kinase B*

V.3. Rôle de la prégnénolone sulfate

La prégnénolone sulfate (PREG-S) joue un rôle au cours de développement de cervelet. Elle augmente la libération transitoire de glutamate qui intervient dans la maturation des synapses situées entre les cellules de *Purkinje* et les fibres grimpantes en agissant sur le récepteur AMPA au niveau post-synaptique (Zamudio-Bulcock et Valenzuela, 2011). Egalement, le rôle de la PREG-S a été démontré dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Mameli *et coll.,* 2005). En augmentant la libération de glutamate, elle induit la potentialisation à long terme. Ces effets peuvent être médiés par le recepteur NMDA dont son expression est fortement augmentée au cours de développement (Monyer *et coll.,* 1994). Des études comportementales ont montré que le PREG-S améliore la mémoire chez la souris (Flood *et coll*., 1995).

VI. Importance des neurostéroïdes dans le développement post-natal des zones de la neurogenèse du cerveau

La neurogenèse est un processus qui se compose de la prolifération des cellules souches neurales et de la différentiation de ces cellules en neurones matures. Normalement observée lors du développement embryonnaire, la neurogenèse se poursuit après la naissance et tout le long de la vie adulte. Deux zones de neurogenèse post-natale ont été définies : la zone sub-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Eriksson *et coll.,* 1998 ; Lie *et coll.,* 2004).

Chez le rat, pendant la période de développement post-natale et à l'âge adulte, les cellules souches neurales sont présentes dans la SVZ pour générer de nouveaux neurones (Gubert *et coll.,* 2009). Les précurseurs neuronaux (cellules de types B) se divisent pour donner naissance à des cellules prolifératives (cellules de type C) qui se différencient en neuroblastes (cellules de type A) (Doetsch *et coll.,* 1999). Les neuroblastes migrent de la SVZ selon un flux de migration appelé RMS (*Rostral migratory stream*) vers les BO où ils se différencient en neurones granulaires et périglomérulaires.

L'intégration des nouveaux neurones dans les BO au cours de la vie post-natale est essentielle pour la survie, permettant aux rats nouveaux-nés d'identifier l'odeur maternelle (Lledo et Saghatelyan, 2005) et d'améliorer la discrimination olfactive en maximisant les différences entre les odeurs similaires. Une étude montre que l'altération de la migration des précurseurs

des neurones olfactifs chez les souris affecte la discrimination olfactive (Gheusi *et coll.,* 2000).

Dans l'hippocampe, la neurogenèse post-natale a lieu au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté. Cette zone contient des cellules souches neurales ou cellules génératrices de type I capable de se diviser en cellules progénitrices de type II. Ces dernières prolifèrent et se différencient en neuroblastes qui migrent dans la couche granulaire. Les neuroblastes ont la capacité de devenir des cellules granulaires matures (neurones excitateurs). De plus, une petite portion des cellules progénitrices de type II sera capable de se transformer en cellules gliales (Gage, 2000). L'intégration des nouvelles cellules granulaires matures dans le circuit neuronal préexistant contribue à l'apprentissage et la mémorisation dans le gyrus denté (Kee *et coll.,* 2007).

Les récepteurs aux estrogènes (ERα, ERβ) sont exprimés dans les BO pendant la période néonatale (Guo *et coll.,* 2001). Durant cette période, l'estrogène agit sur la neurogenèse en augmentant la survie des nouveaux neurones (Veyrac *et coll.,* 2011). Il peut également activer la neurogenèse et par la suite la discrimination olfactive en stimulant la prolifération des précurseurs neuronaux dans la SVZ (Smith *et coll.,* 2001). Cet effet a été montré chez les souris mâles invalidées pour le gène de l'aromatase qui ne présentent pas une préférence pour un partenaire de sexe opposé (Bakker *et coll.,* 2004).
D'autres études ont montré que les récepteurs aux estrogènes sont présents dans le gyrus denté de l'hippocampe (Weiland *et coll.,* 1997). A ce niveau, l'estrogène va agir sur la neurogenèse en augmentant la prolifération (Mazzucco *et coll.,* 2006), la survie et l'activation des nouveaux neurones ce qui permet d'améliorer l'apprentissage chez le rats (McClure *et coll.,* 2013).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Parmi les nombreuses pathologies associées, la carence précoce en donneurs de groupements méthyles (vit B9 et B12) pourrait altérer les capacités de la neurogenèse et de la plasticité synaptique au cours du développement post-natal.

Dans le modèle animal de carence gestationnelle en donneurs de méthyles développé et standardisé au laboratoire, l'accumulation d'HCY dans le cerveau des ratons âgés de 21 jours s'accompagnait d'une augmentation de l'apoptose associée à une altération des capacités cognitives et des aptitudes motrices des ratons de 21 jours (Blaise *et coll.,* 2007a, 2009). Aussi, un retard de croissance et un poids corporel réduit ont été mis en évidence (Blaise *et coll.,* 2005, 2007a). L'ensemble de ces observations nous avait conduit à l'hypothèse selon laquelle un déficit précoce en donneurs de groupements méthyles pourrait affecter la plasticité synaptique et la neurogenèse (Daval *et coll*, 2009). Or, ces processus sont étroitement liés à la NSG particulièrement active dans le cerveau en période post-natale.

Au cours de cette dernière décennie, il a clairement été établi que le cerveau présentait une capacité endogène de synthèse des stéroïdes (appelés *neurostéroïdes*), indépendamment des gonades et autres organes stéroïdogènes. Les neurostéroïdes participent à la prolifération et la différentiation des cellules souches neuronales, la mise en place des fonctions cognitives et exercent un effet neuroprotecteur à l'âge adulte.

A notre connaissance, hormis quelques rares études rapportant une altération de la synthèse des stéroïdes sexuels suite à une carence en folates (Wallock-Montelius *et coll*., 2007 ; Twigt *et coll.,* 2011), aucune donnée n'existe dans la littérature quant aux conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la NSG.

L'hypothèse de travail que nous nous sommes proposée de développer était de vérifier si le retard de croissance et les dommages cérébraux observés lors d'une carence précoce en donneurs de méthyles, étaient associés à une altération de la NSG au cours du développement.

Ce travail a consisté en 3 étapes principales :

- Le cervelet est particulièrement vulnérable en période post-natale puisque son développement s'achève autour du 21ème jour post-natal. Nous avons donc entrepris l'étude de l'expression des protéines clés de la NSG (StAR, TSPO et l'aromatase) ainsi que celles impliquées dans la régulation de cette voie métabolique. Nous avons poursuivi ces investigations par la mesure

de l'expression des récepteurs aux estrogènes et le contenu en neurostéroïdes, notamment l'estradiol, dans les extraits de tissus cérébelleux.

- Le retard de croissance et la perte de poids des nouveaux-nés carencés nous ont conduits à vérifier l'hypothèse selon laquelle ils seraient associés à des troubles nutritionnels résultant d'une altération de la discrimination olfactive des nouveaux-nés. Or, celle-ci se met en place dès la naissance, grâce à une neurogenèse particulièrement active dans les BO. Nous avons donc développé des tests comportementaux visant à évaluer les performances olfactives, que nous avons confrontés à une mesure des principaux déterminants de la NSG dans les BO.

- Enfin, l'impact de la carence en donneurs en méthyles a été étudié dans d'autres régions cérébrales dont la région CA1 de l'hippocampe, siège d'une neurogenèse active au cours du développement et régulant le développement des capacités d'apprentissage et des performances mnésiques en période post-natale.

MATERIELS ET METHODES

I. Modèle animal

I.1. Les animaux

Les expérimentations ont été réalisées sur des rats Wistar adultes (Charles River, l'Arbresle, France). Les animaux sont maintenus dans une animalerie à une température ambiante de 22-23°C, un cycle lumière/obscurité de 12 h, avec un libre accès à la nourriture (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) et à l'eau de boisson. Les manipulations ont été effectuées selon les recommandations du Comité d'Ethique Lorraine en Matière d'Expérimentation Animale.

I.2. Traitement des animaux

Un mois avant la mise en accouplement des animaux, 2 groupes de femelles (groupe témoin et groupe carencé) ont été fournis. Les rates du groupe carencé ont reçu une alimentation dépourvue de donneurs de groupements méthyles (vit B12, folates et choline) comme décrit précédemment (Blaise *et coll.,* 2007a, 2007b, 2009) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Ce régime a été maintenu tout au long de la gestation et durant l'allaitement jusqu'au sevrage des ratons, soit 21 jours après leur naissance (Figure 14).

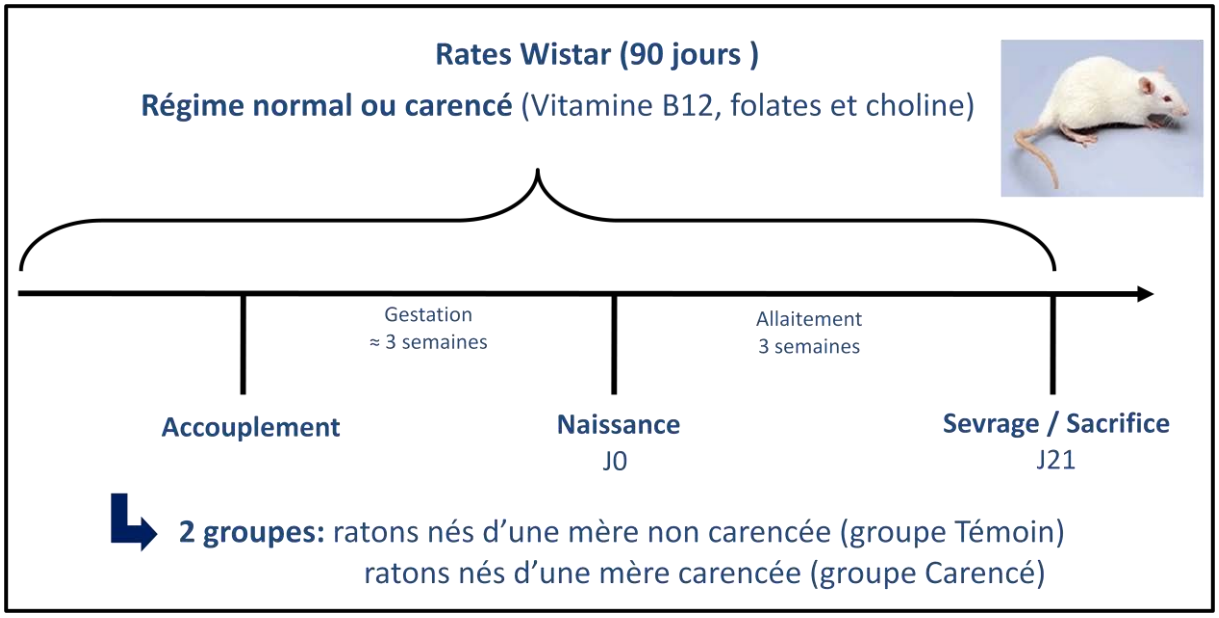


Figure 14: Schéma représentant le modèle animal de carence en donneurs de groupements méthyles développé par notre équipe.

I.3. Prélèvement des échantillons tissulaires et sanguins

Les rats nouveau-nés ont été pesés puis sacrifiés 21 jours après la mise-bas. Au moment du sacrifice, les animaux sont placés sous isofluorane (Abbott, Rungis, France) et un échantillon de sang est prélevé sur héparine (tubes® Microtainer) à l'aide d'une seringue hypodermique par ponction intracardiaque. Les tubes sont centrifugés 10 min à 3 000 *g* et le sérum est stocké à -20°C.

L'animal est ensuite décapité, le cerveau est rapidement recueilli et les régions suivantes sont microdisséquées : BO, cervelet et hippocampe. Les ovaires, les testicules et les poumons sont également prélevés.

Les échantillons réservés à des analyses biochimiques ultérieures sont plongés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C. Les cerveaux destinés à l'analyse par immunohistochimie sont plongés immédiatement dans une solution de méthylbutane froid (-30°C) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) avant d'être stockés à -80°C.

II. Profil biochimique

II.1. Marqueurs nutritionnels

Les marqueurs nutritionnels étaient dans notre étude les vitamines B9 et B12. Pour le dosage de ces paramètres, voir les fiche 1 et fiche 2 dans l'annexe.

II.2. les métabolites de cycle de la méthylation

Dans notre étude, les métabolites du cycle de la méthylation étaient l'HCY, la SAM et la SAH. Le dosage de l'HCY a été réalisé par chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC) couplée à la détection par spectrométrie de masse tandis que le dosage des autres métabolites a été réalisé par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Pour le dosage de ces paramètres, voir la fiche 1, la fiche 3 et la fiche 4 de l'annexe. L'HCY a été étudiée par un marquage immunohistochimique dans les différentes régions cérébrales en utilisant la fiche 5 et la fiche 6.

II.3. Etude des protéines clés de la neurostéroïdogenèse et les facteurs intervenant dans leurs régulations

Pour étudier l'expression des protéines clés de la NSG (StAR, TSPO, aromatase) et les facteurs intervenant dans leurs régulations (LHR, PKA, PP2A, PKC, pPKC, SF-1, CREB, pCREB) nous avons réalisé des Western blot (fiches 7 à 12). Nous avons aussi réalisé un Western blot de GAPDH et de β-actine, qui ont été utilisés comme protéines de référence pour normaliser l'expression des protéines d'intérêts à l'aide du logiciel Image J. D'autre part, nous avons étudié l'expression des protéines de la NSG, de LHR et de SF-1 par immunohistochimie en utilisant les fiches 5 et 6. Finalement, nous avons mesuré le taux d'AMPc dans le cervelet en utilisant la fiche 30.

II.4. Etude de l'expression des gènes de la neurostéroïdogenèse et les facteurs intervenant dans leurs régulations

Dans notre étude, nous avons quantifié les transcrits des gènes *StAR, TSPO, aromatase, ERα et SF-1*. Pour ces mesures, voir les fiches 14 à 18. Nous avons également étudié la méthylation des îlots CpG dans le promoteur du gène SF-1 en utilisant les fiches 20 à 28.

II.5. Etude des conséquences associées aux altérations de la neurostéroïdogenèse

Pour explorer les conséquences associées aux altérations de la NSG, nous avons mesuré les taux de cholestérol et des hormones stéroïdes (prégnenolone, prégnenolone sulfate, testostérone, 17β-estradiol) dans le cervelet en utilisant la fiche 19. Nous avons également étudié le taux de l'estradiol et l'expression de ses récepteurs (ERα et ERβ) dans les différentes régions cérébrales par immunohistochimie en utilisant les fiches 5 et 6 et par Western blot en utilisant les fiche 7 et les fiches 9 à 12.

II.6. Etude de l'apoptose, de la prolifération cellulaire et de la méthylation globale de l'ADN dans les bulbes olfactifs

Nous avons étudié l'apoptose et la prolifération cellulaire par immunohistochimie en utilisant des anticorps dirigés contre la caspase 3 clivée et la protéine Ki67 respectivement. Pour cette étude voir les fiches 5 et fiche 6. Pour étudier l'effet de la carence en donneurs de

groupements méthyles sur le taux de la méhtylation global de l'ADN dans les bulbes olfactifs nous avons utilisé la fiche 29.

III. Etude comportementale

Afin de suivre l'acquisition de la discrimination olfactive à l'âge post-natal, les ratons nés des mères recevant un régime normal ou carencé ont été soumis à des tests olfactifs durant la période d'allaitement (*Homing test*) et de sevrage (discrimination olfactive).

III.1. Homing test

Ce test est utilisé pour évaluer la capacité d'apprentissage et de mémoire olfactive chez les jeunes rongeurs avant le sevrage. Il est basé sur les aptitudes des rongeurs à reconnaître et suivre les informations environnementales afin de retrouver leur environnement maternel habituel. Il est effectué pendant la phase d'allaitement à partir du moment où l'activité exploratoire des individus commence à se développer ($5^{ème}$ jour post-natal).

Le dispositif expérimental est un labyrinthe en T de 30 cm de hauteur, composé d'un couloir (9 cm de largeur, 46 cm de longueur) et d'une barre horizontale du T de 60 cm de longueur (Figure 15). Aux extrémités du T (droite et gauche), deux zones d'arrivée (A et B) sont définies. Chacune de ces zones reçoit la même quantité de litière soit fraiche, soit provenant de la cage maternelle d'élevage des jeunes rongeurs testés. La position des deux types de litière est répartie de façon aléatoire entre les côtés droit et gauche du labyrinthe.

Les rats sont testés un à un aux jours 5, 7, 9, 14 et 19 après la naissance. L'animal-test est déposé au point de départ à la base du T et est laissé libre de ses mouvements pendant 2 minutes. L'animal avance et choisit la zone de gauche ou droite du labyrinthe. Le dispositif est filmé par le dessus grâce à un système de video-tracking et l'enregistrement est lancé. Le labyrinthe est débarrassé de la litière et soigneusement nettoyé à l'alcool 50° entre chaque animal. Le paramètre enregistré par le logiciel Viewpoint est le temps nécessaire pour atteindre la zone contenant la litière provenant de la cage d'élevage. Si le rat n'a pas trouvé cette zone dans le temps imparti, le maximum de temps lui est attribué (2 min). Le test est considéré comme réussi si le rat visite directement la zone contenant la litière provenant de la cage d'élevage de l'individu testé sans aucune visite de la zone contenant la litière fraîche ou retour à la branche de départ.

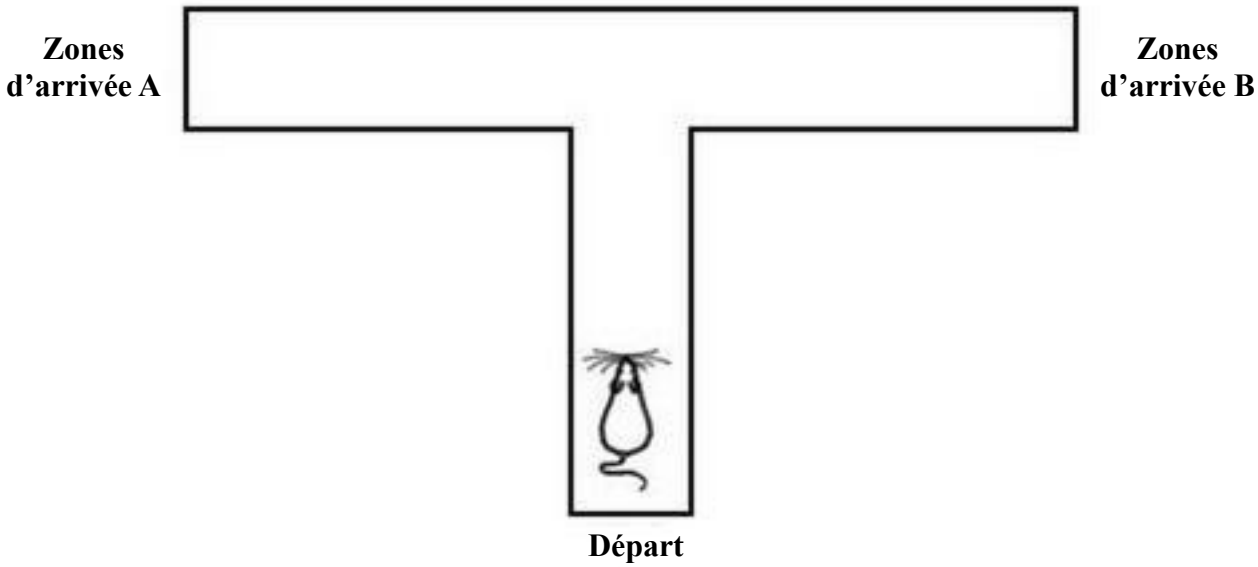


Figure 15: Schéma représentant le dispositif expérimental de labyrinthe en T.

III.2. Discrimination olfactive

Ce test est utilisé pour évaluer la capacité de discrimination olfactive chez les rongeurs à partir d'un âge où la locomotion est suffisamment développée. Il est basé sur l'approche-évitement de sources odorantes et est effectué le jour de sevrage au moment où la neurogenèse olfactive est augmentée chez les rats.

Le dispositif expérimental est un couloir dont la taille doit être adaptée aux âges des rats testés (80 cm de long pour 8 cm de large et 15cm de haut, pour des rats de 15 à environ 50 jours). Aux deux extrémités du couloir se trouvent des zones de taille réduite, non accessible aux animaux dans lesquelles sont déposés un papier filtre (généralement 1 x 1 cm) imbibé avec 15 µL de toluène pur ou de l'eau distillée (Figure 16). Les zones de dépôts sont recouvertes par une plaque pour limiter la diffusion des odorants à l'extérieur du dispositif. La position des produits odorants et de l'eau est répartie de façon aléatoire entre les côtés droit et gauche du couloir. Ce dernier est formé de trois zones de taille équivalente dessinées grâce au logiciel dont une zone répulsive du côté de toluène, une autre zone contrôle du côté de l'eau et une zone neutre entre les 2 premières.

Les rats sont testés un à un au jour 21 après la naissance. Au moment du test, chaque rat est déposé au centre de la zone neutre et est laissé libre de ses mouvements pendant 3 minutes. Le dispositif expérimental est filmé par le dessus grâce à un système de video-tracking. Le paramètre enregistré et analysé par le logiciel Viewpoint est le temps passé dans chaque zone. Les papiers filtres sont changés entre chaque rat, avec le même dépôt d'odorant. Le couloir est

nettoyé rapidement à l'alcool 50° entre chaque animal. Le test est considéré comme réussi si le rat visite directement la zone du côté de l'eau sans aucune visite de la zone du côté de toluène.

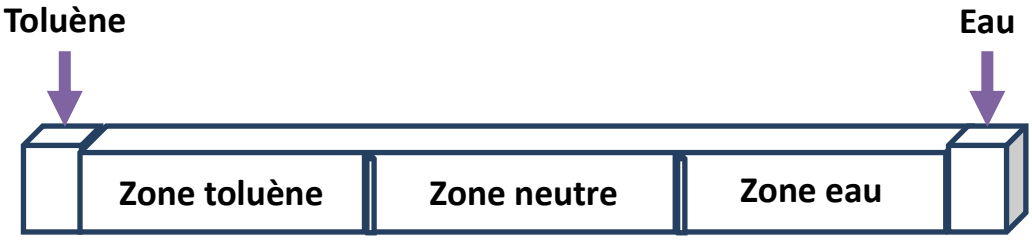


Figure 16: Schéma représentant le dispositif expérimental du test discrimination olfactive.

RESULTATS

I. La carence précoce en donneurs de méthyles altère l'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse et du facteur de transcription SF-1 nouvellement décrit dans le cervelet des rats femelles nouveaux-nés.

Une carence précoce en donneurs de groupements méthyles (acide folique, vit B12) provoque l'accumulation d'HCY, un acide aminé toxique associé à des anomalies de fermeture du tube neural et un retard de croissance intra-utérin (Obeid et Herrmann, 2005). Selon Chen *et coll.* (2005), l'HCY s'accumulerait de manière hétérogène entre les différentes régions cérébrales, les taux les plus élevés étant retrouvés dans le cervelet. De plus, dans un modèle de souris transgéniques déficientes en MTHFR, Craciunescu *et coll*. (2004) ont reporté une perte des cellules granulaires du cervelet associée à un accroissement de l'apoptose. A l'inverse, une supplémentation en vitamines B exerce un effet protecteur sur les cultures de cellules granulaires de cervelet vis-à-vis de la mort neuronale (Lin *et coll*., 2004).

Dans le modèle animal de carence gestationnelle en donneurs de méthyles (vit B9, B12) caractérisé au laboratoire, l'accumulation d'HCY dans le cerveau des ratons âgés de 21 jours nés de mères carencées s'accompagnait d'une apoptose dans les principales zones de neurogenèse, notamment le cervelet. Ces dommages tissulaires étaient associés à des déficits cognitifs ainsi que des troubles de la posture et de la coordination motrice (Blaise *et coll.,* 2005; Blaise *et coll.,* 2007a; Blaise *et coll.,* 2007b ; Blaise *et coll.,* 2009), qui résulteraient d'une altération de la neurogenèse et de la plasticité synaptique (Daval *et coll.,* 2009).

Le cervelet est particulièrement vulnérable durant les 20 premiers jours post-nataux, période de développement des tissus cérébelleux, de mise en place de l'architecture neuronale, grâce à une NSG active. Les enzymes de la NSG sont exprimées dès la naissance (Tsutsui, 2006) et, dans le cas de la protéine StAR, les taux les plus élevés d'ARNm sont mesurés spécifiquement en période post-natale (Kim *et coll.,* 2002). Enfin, l'estradiol produit localement participe directement à la croissance dendritique des cellules de *Purkinje* et la formation des synapses. Ces effets sont médiés par les récepteurs ERα et ERβ qui jouent chacun des rôles distincts au cours de cette phase de développement (Fan *et coll.,* 2010).

L'ensemble de ces observations nous a conduits à rechercher si les troubles moteurs observés chez les ratons carencés âgés de 21 jours étaient liés à une altération de la NSG dans le cervelet.

Pour ce faire, nous avons d'abord étudié l'effet de la carence en donneurs de méthyles sur les niveaux d'expression des protéines clés de la NSG (StAR, TSO, aromatase) et des récepteurs aux estrogènes, en association avec les déterminants classiques du métabolisme de l'HCY, dans le cervelet des rats âgés de 21 jours. Le taux de neurostéroïdes a été déterminé, notamment celui de l'estradiol dont nous avons pu évaluer le contenu dans les cellules de *Purkinje* par immunohistochimie.

Enfin, nous avons exploré la voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMPc régulant l'expression des gènes de la NSG, en mesurant les niveaux d'expression de LHR, SF-1, CREB, PKA, PKC et PP2A ainsi que la concentration en AMPc dans le cervelet des ratons.

I.1. Validation du modèle animal par rapport aux études antérieures

Afin de valider le modèle animal, nous avons mesuré la concentration en HCY dans le plasma prélevé au moment du sacrifice des ratons.

L'hyperhomocystéinémie a été confirmée dans les ratons de 21 jours issus des mères soumises au régime carencé par rapport aux études précédentes de l'équipe (Blaise *et coll*., 2007a). Dans le cas des femelles, l'accroissement de la concentration plasmatique en HCY en situation de carence semble plus important (76,3%) que chez les mâles (68,8%), comparé aux témoins (Tableau I: Concentration plasmatique en homocystéine dans le plasma des ratons âgés de 21 jours.).

Tableau I: Concentration plasmatique en homocystéine dans le plasma des ratons âgés de 21 jours.

	Femelles		**Mâles**	
	Témoins	Carencées	Témoins	Carencés
Homocystéine (µmol/L)	9,27 ± 0,91	39,24 ± 21,78**	9,45 ± 1,03	30,24 ± 14,11**

Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05), (**p<0,01). N = 5 par groupe.

A l'issue de la période d'allaitement (21ème jour post-natal), le poids corporel des ratons soumis à la carence était significativement diminué, ce qui est en adéquation avec les études

précédentes de l'équipe (Blaise et *coll.,* 2005; Blaise *et coll.,* 2007a). De plus, dans notre étude, nous avons pu constater que cette diminution de poids entre ratons témoins et carencés était significativement plus élevée ($p<0.01$) dans le groupe des femelles que dans celui des mâles (Tableau II: Poids corporel des ratons âgés de 21 jours.).

Tableau II: Poids corporel des ratons âgés de 21 jours.

	Femelles		Mâles	
	Témoins	Carencées	Témoins	Carencés
Poids (g)	39.72 ± 3.08	17.32 ± 4.39	39.25 ± 4.10	21.86 ± 4.85

Moyenne ± écart-type, N = 20 par groupe. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (***$p<0,01$).

Ces premières mesures ont donc permis de valider le modèle animal, ainsi qu'une première démonstration d'un effet dépendant du sexe de la carence gestationnelle en donneurs de méthyles, le retard de prise de poids étant plus marqué chez les ratons de sexe femelle.

I.2. Concentrations en vitamines B9, B12, de l'homocystéine et des déterminants de son métabolisme dans le cervelet.

Les concentrations en acide folique et vit B12 ont été mesurées dans les extraits de cervelet préparés à partir des ratons issus des mères recevant un régime normal ou carencé. Dans le cervelet des femelles carencées, elles sont significativement diminuées de 65,1% et 51,4% par rapport aux femelles témoins, respectivement. Ces variations sont également retrouvées chez les mâles carencés après comparaison avec les témoins de même sexe (Tableau III: Concentrations en vitamines B9 et B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans le cervelet des ratons âgés de 21 jours.III).

L'analyse par immunohistochimie montre une forte accumulation d'HCY dans les cellules de *Purkinje* des coupes de cervelet obtenues à partir des femelles carencées (Figure 17 A). Cette accumulation d'HCY sous l'effet de la carence n'est pas détectée pour les mâles (Figure 17:

Marquage immunohistochimique de l'homocystéine dans le cervelet des rats âgés de 21 jours. Les images ci-dessus sont représentatives de coupes sagittales effectuées à partir d'un cervelet de raton femelle (A) ou mâle (B). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que l'HCY est marquée en vert à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-HCY. N = 5 par groupe. Grossissement X20. B).

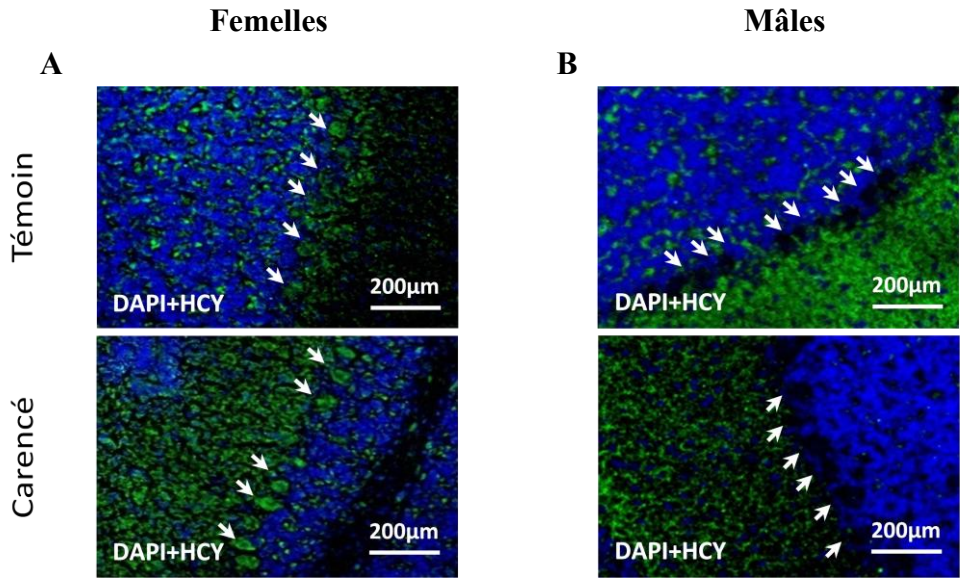


Figure 17: Marquage immunohistochimique de l'homocystéine dans le cervelet des rats âgés de 21 jours. Les images ci-dessus sont représentatives de coupes sagittales effectuées à partir d'un cervelet de raton femelle (A) ou mâle (B). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que l'HCY est marquée en vert à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin anti-HCY. N = 5 par groupe. Grossissement X20.

Les concentrations des déterminants classiques du métabolisme de l'HCY ont également été mesurées dans les homogénats cérébelleux. La SAM est le principal donneur de groupements méthyles fourni par le cycle de la méthionine. Elle est déméthylée pour former la SAH qui est finalement hydrolysée en HCY. Comme illustré dans le tableau III, la carence en donneurs de méthyles n'affecte pas la concentration en SAM quelque soit le sexe. Cependant, la concentration en SAH augmente de 45,3% conduisant à une réduction consécutive du ratio SAM/SAH de 42,2%, et ceci uniquement dans le cervelet des ratons femelles carencées, comparés aux témoins. Chez les mâles, aucune variation significative n'a été observée entre les témoins et les animaux carencés.

Tableau III: Concentrations en vitamines B9 et B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans le cervelet des ratons âgés de 21 jours.

	Femelles (21 jours)		Mâles (21 jours)	
	Témoins	Carencées	Témoins	Carencés
Vitamine B9 (nmol/g tissu)	0,92 ± 0,12	0,32 ± 0,19**	0,89 ± 0,24	0,32 ± 0,19*
Vitamine B12 (pmol/g tissu)	44,8 ± 11,34	21,76 ± 2,05**	26,63 ± 6,43	18,00 ± 2,12*
SAM (nmol/g tissu)	26,12 ± 9,00	26,23 ± 9,94	31,77 ± 4,24	31,13 ± 9,92
SAH (nmol/g tissu)	4,55 ± 1,05	8,33 ± 2,02**	4,88 ± 0,84	6,38 ± 1,96
SAM/SAH ratio	5,82 ± 1,92	3,36 ± 1,63*	6,70 ± 1,62	5,30 ± 2,30

Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05), (**p<0,01). N = 6 par groupe.

I.3. Mesure de l'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse dans le cervelet des rats nouveaux-nés.

Nous avons mesuré les niveaux d'expression des protéines clés de la NSG (les protéines StAR, TSPO et aromatase) par immunohistochimie sur coupes cérébrales, ainsi que des analyses par Western-blot et par RT-qPCR.

I.3.1. Analyse par immunohistochimie

Sur les coupes effectuées à partir de cerveaux des femelles âgées de 21 jours nées de mères carencées, il apparaît une nette diminution de l'intensité des protéines StAR (Figure 18 A), TSPO (Figure 18 C) et aromatase (Figure 18 E) dans les cellules de *Purkinje*, par rapport aux femelles témoins. Chez les ratons mâles, aucune différence n'a été observée entre carencés et témoins, quelque soit la protéine étudiée (Figure 18 B, D et F).

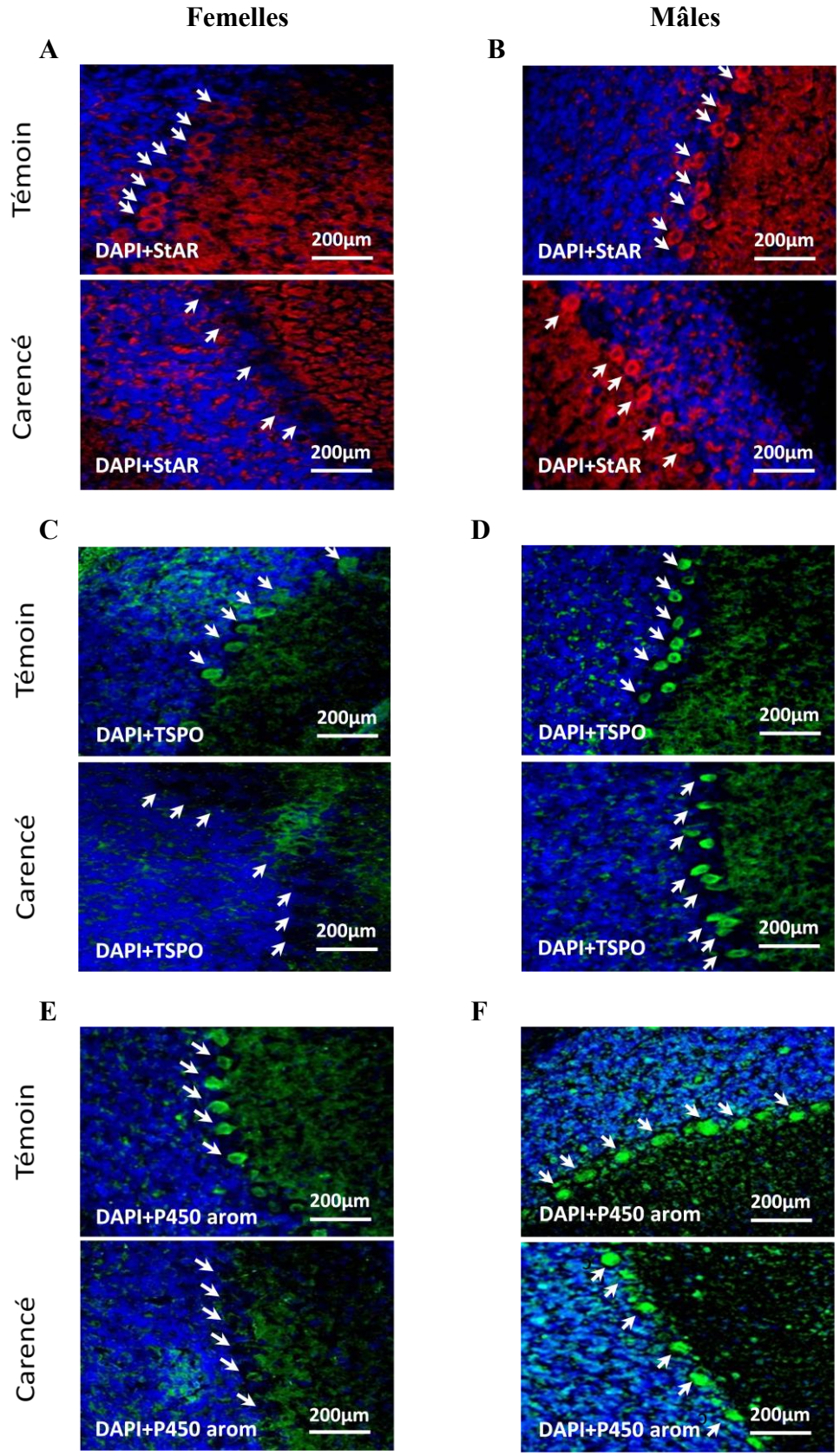


Figure 18: Marquage immunohistochimique de StAR, TSPO et aromatase dans le cervelet des rats âgés de 21 jours. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). StAR (**A** et **B**) détectée en rouge, TSPO (**C** et **D**) et aromatase (**E** et **F**) en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20. StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. P450 arom : cytochrome P450 aromatase. TSPO : *translocator protein*.

I.3.2. Analyse par western-blot

La figure 19 représente les résultats de l'analyse par western-blot des fractions mitochondriales et microsomales de cervelets de ratons âgés de 21 jours, pour les protéines StAR (Figure 19 A), TSPO (Figure 19 C) et l'aromatase (Figure 19 E). En accord avec les observations immunohistochimiques, l'analyse densitométrique montre une diminution significative de l'intensité de la bande de migration des 3 protéines, dans les préparations de cervelets des femelles issues de mères carencées, par rapport aux témoins. Concernant les mâles, aucune différence significative n'apparaît entre les animaux témoins et carencés.

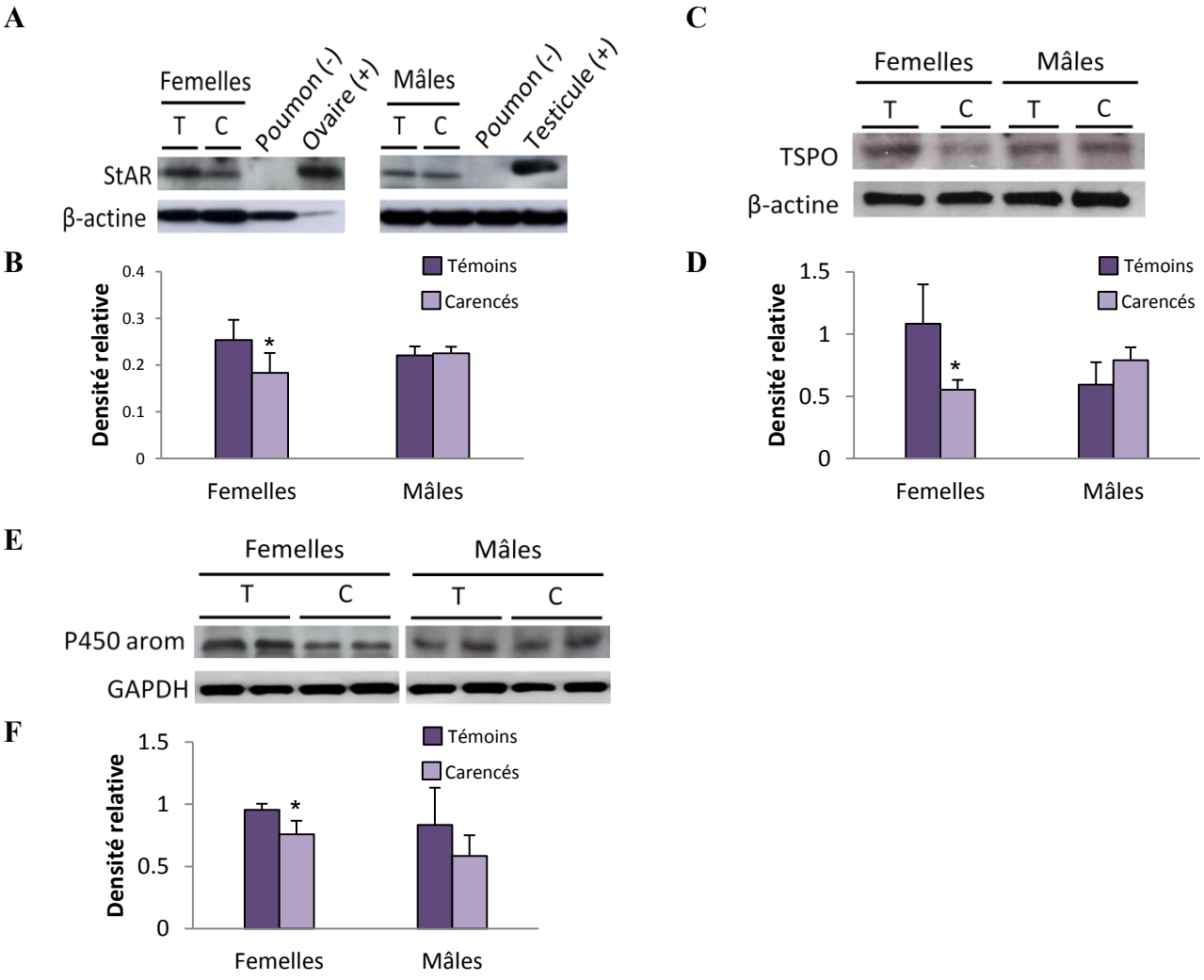


Figure 19: Analyse par western-blot de l'expression des protéines StAR, TSPO et aromatase dans le cervelet des rats à J21. A. Immunodétection de StAR sur protéines mitochondriales de cervelet (30µg), de poumons (30µg), d'ovaires (5µg) et de testicules (30µg). **C.** Immunodétection de TSPO (protéines mitochondriales, 50µg). **E.** Immunodétection de l'aromatase (protéines microsomales, 30µg). Analyse semi-quantitative de l'expression de la protéine StAR (**B**), TSPO (**D**) et aromatase (**F**) : expression de StAR et de TSPO normalisée par rapport à la β-actine, expression de l'aromatase normalisée par rapport à la GAPDH. Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05). N = 5 par groupe. T, témoins ; C, carencés ; StAR : *steroidogenic acute regulatory protein* ; P450 arom, aromatase ; TSPO : *translocator protein*.

I.3.3. Analyse par RT-qPCR

La diminution de l'expression des protéines clés de la NSG chez les ratons femelles carencées est associée à une diminution du taux de l'ARNm correspondant mesuré par RT-qPCR (Figure 20). En normalisant les données à celles du gène de référence *Pol II*, le taux de transcrits des gènes *StAR* (Figure 20 A), *TSPO* (Figure 20 B) et *aromatase* (Figure 20 C) diminuent significativement dans le cervelet des femelles carencés par rapport aux témoins de même sexe. Ces variations ne sont pas retrouvées dans le groupe des mâles.

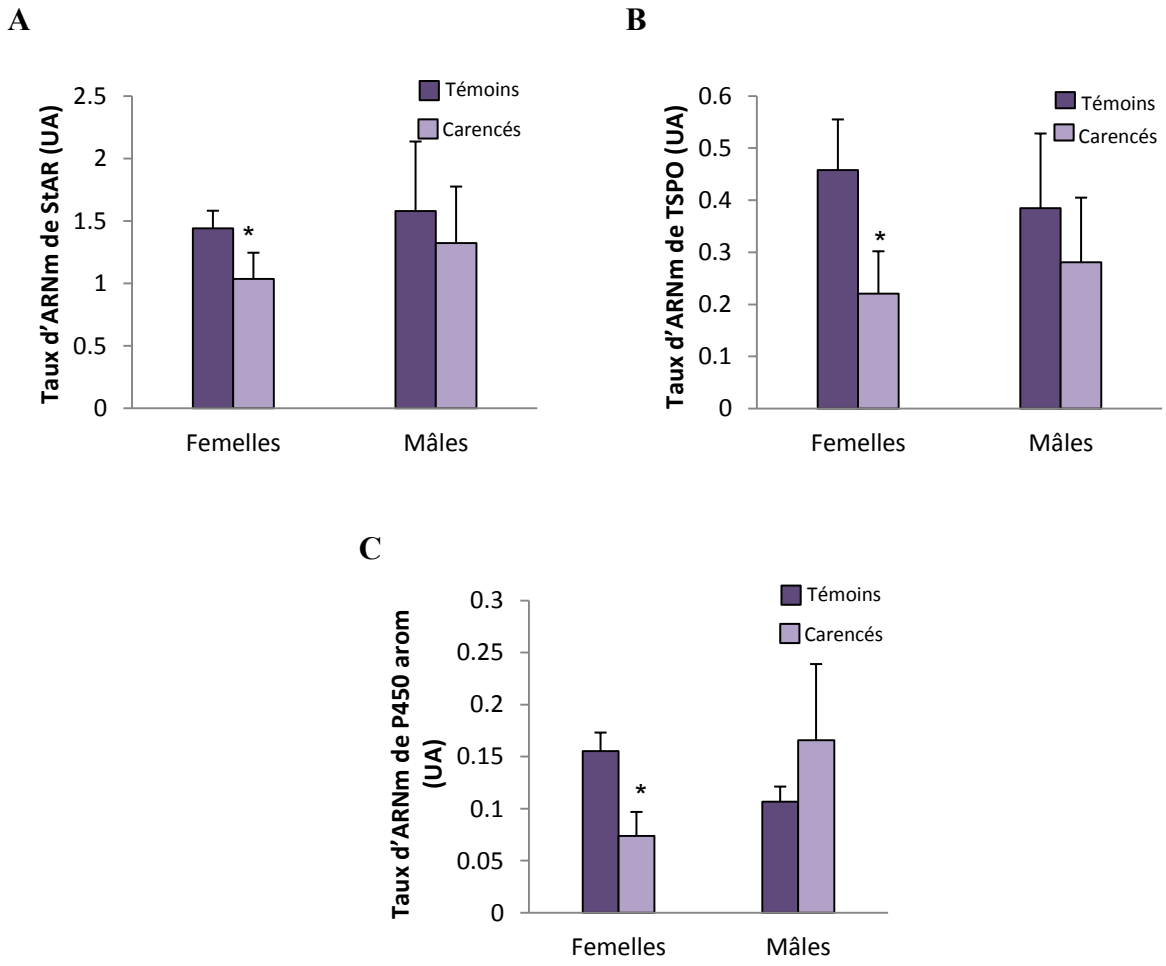


Figure 20: Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de StAR, aromatase et TSPO dans le cervelet des ratons à J21. Taux d'ARNm de StAR (**A**), TSPO (**B**) et aromatase (**C**) exprimés en unités arbitraires (UA). Moyennes ± écart-type, Test ANOVA, (N = 5). StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. P450 arom : cytochrome P450 aromatase. TSPO : *translocator protein*.

Ces premiers résultats indiquent que la carence précoce en donneurs de méthyles affecte la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de ces différents gènes dans le cervelet des ratons femelles à l'issue du sevrage.

I.4. Contenu en neurostéroïdes et expression des récepteurs ERα et ERβ dans le cervelet

Au vu des premiers résultats décrits plus haut, notre objectif était de déterminer quelles étaient les conséquences de cette diminution de l'expression des protéines clés de la NSG.

I.4.1 Contenu en neurostéroïdes dans le cervelet

Nous avons mesuré les concentrations en cholestérol, PREG, testostérone et estradiol dans le cervelet des ratons. Ces intermédiaires stéroïdiens sont directement affectés par l'altération de la protéine StAR et de l'aromatase. Les résultats présentés dans le tableau IV montrent que les concentrations en cholestérol ainsi qu'en PREG, PREG-S et en estradiol mesurées par LC-MS/MS diminuent dans les extraits de cervelets des ratons femelles déficientes, lorsque comparées aux témoins. Chez les mâles, il n'y a aucune différence significative entre animaux carencés et témoins.

Tableau IV: Concentrations en cholestérol et en neurostéroïdes mesurées par LC-MS/MS dans le cervelet des ratons âgés de 21 jours.

	Femelles (21 jours)		**Mâles (21 jours)**	
	Témoins	Carencées	Témoins	Carencées
Cholestérol (mg/g tissu)	25,85 ± 0,80	21,36 ± 4,2*	26,04 ± 1,9	23,02 ± 2,15
PREG (ng/g tissu)	38,25 ± 5,70	27,55 ± 2,17**	39,35 ± 3,12	40,15 ± 10,44
PREG-S (ng/g tissu)	214,15 ± 27,97	94,34 ± 75,09*	279,84 ± 79,79	262,60 ± 81,69
Testostérone (ng/g tissu)	0,45 ± 0,11	0,42 ± 0,24	1,00 ± 0,58	0,89 ± 0,49
Estradiol (ng/g tissu)	0,91 ± 0,35	0,31 ± 0,06*	1,47 ± 0,52	0,84 ± 0,21

Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05), (**p<0,01). N = 5 par groupe. PREG : prégnénolone. PREG-S : prégnénolone sulfate.

Les observations réalisées par immunohistochimie sur coupes cérébrales des ratons de 21 jours, montrent que le 17β-estradiol s'accumule dans les cellules de *Purkinje* du cervelet (Figure 21). La figure 21 A montre que l'immunodétection de 17β-estradiol est fortement réduite dans les cellules de *Purkinje* du cervelet des femelles âgées de 21 jours issus des mères carencées. Par contre, chez les ratons mâles aucune différence n'a été observée (Figure 21 B).

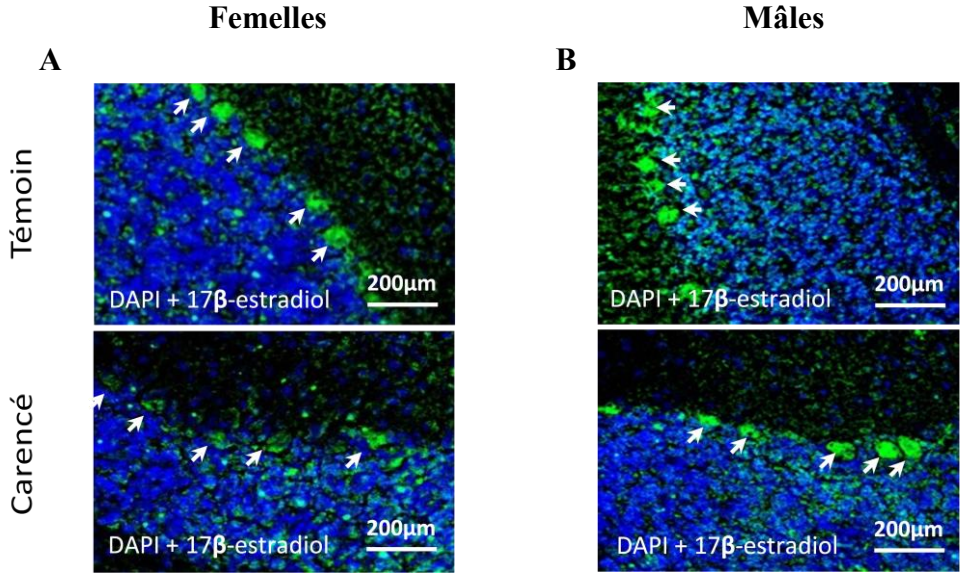


Figure 21: Marquage immunohistochimique de l'estradiol dans le cervelet des rats de 21 jours. Les images ci-dessus sont représentatives de coupes sagittales effectuées à partir d'un cervelet de raton femelle (**A**) ou mâle (**B**). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que l'estradiol est détecté en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20.

I.4.2. Expression des récepteurs ERα et ERβ dans le cervelet

L'analyse par immunohistochimie montre que les récepteurs ERα (Figures 22 A et B) et ERβ (Figures 22 C et D) sont localisés dans la couche granulaire du cervelet des rats âgés de 21 jours, et plus spécifiquement dans les cellules de *Purkinje* (Figure 22). Sur les coupes cérébrales issues des femelles carencées, l'immunomarquage des 2 récepteurs est nettement moins intense pour les 2 récepteurs par rapport aux témoins, alors que, pour les mâles, aucune différence n'est observée (Figures 22 B et D).

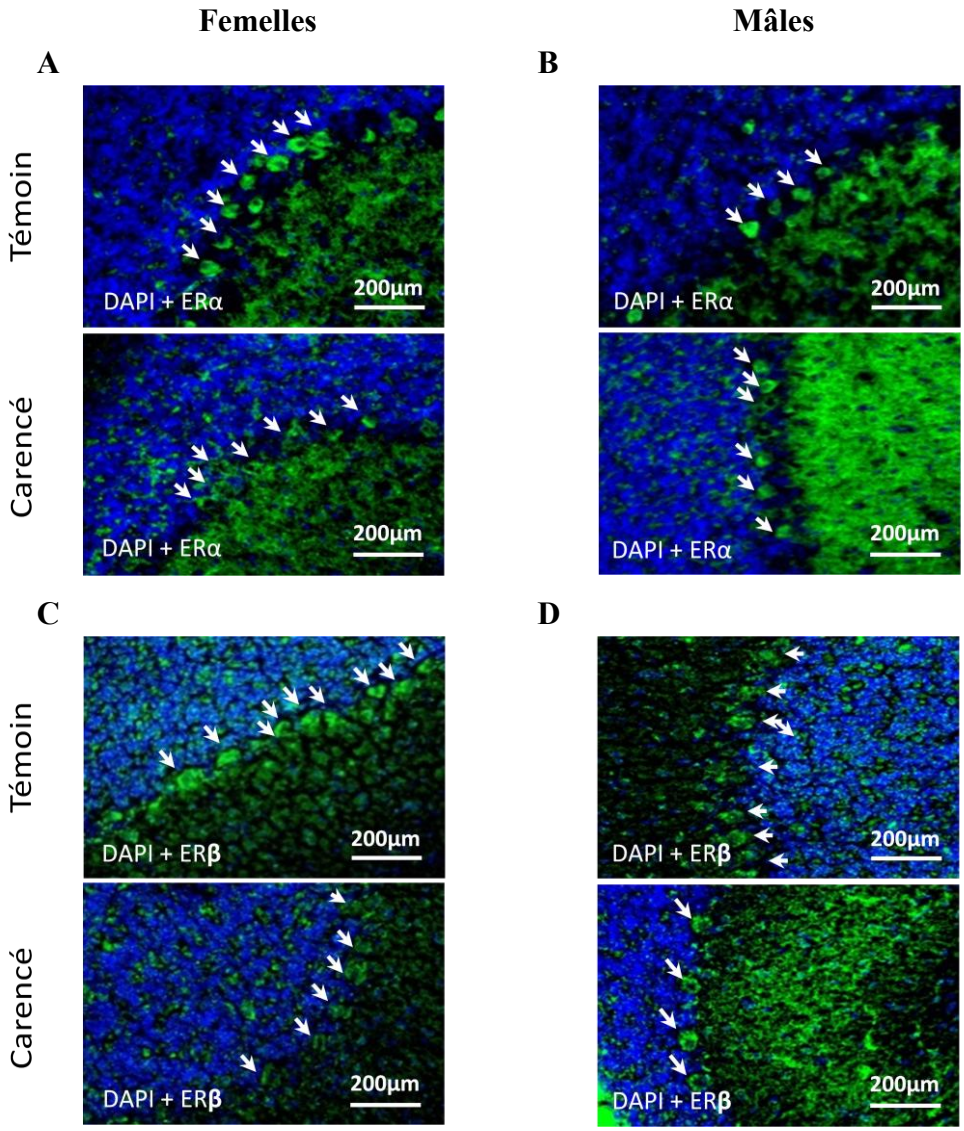


Figure 22: Marquage immunohistochimique des récepteurs ERα et ERβ dans le cervelet des rats J21. Les observations ont été limitées dans les cellules de *Purkinje* de cervelet des rats exposés au régime déficient par rapport aux rats témoins (N = 5 par groupe). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que le l'ERα (**A** et **B**) et l'ERβ (**C** et **D**) sont marqués en vert. La carence en donneurs de méthyle entraîne une diminution de l'immunoréactivité des récepteurs aux estrogènes dans les cellules de *Purkinje* du cervelet des rats femelles de 21 jours. Grossissement X20. ER : *estrogen receptor*.

Ces observations sont confirmées par l'analyse western-blot représentée figure 23. Une seule bande de migration située à 66 kDa (Figure 23 A) et à 55 kDa (Figure 23 C) apparaît pour ERα et ERβ, respectivement. En situation de carence, la réduction significative de l'intensité des bandes de ERα (Figure 23 B) et ERβ (Figure 23 D), n'est mesurée que dans le groupe des femelles.

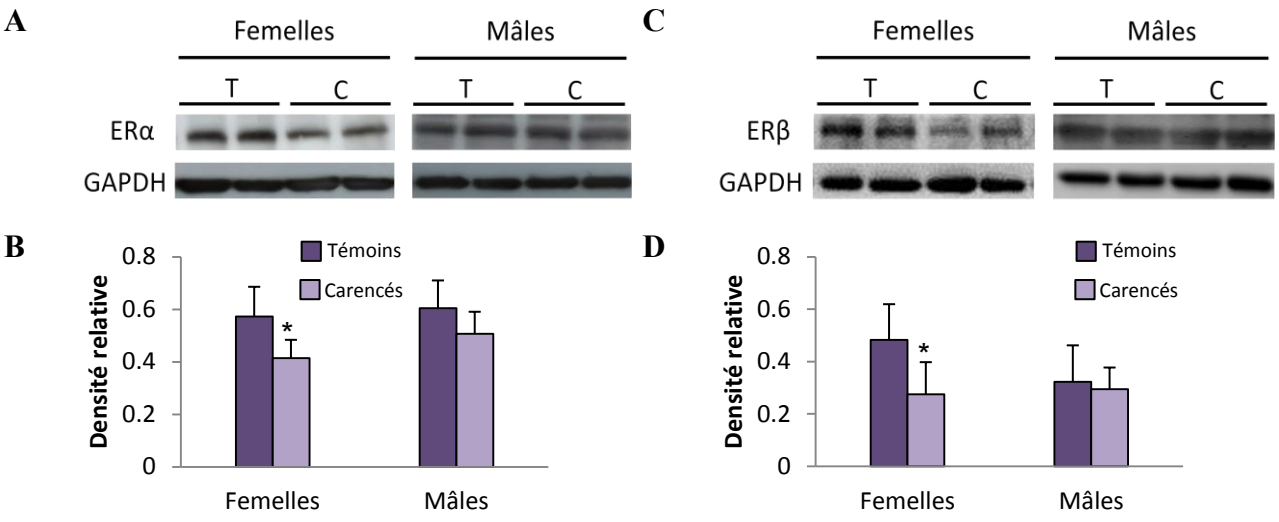


Figure 23: Analyse par western-blot de l'expression des récepteurs aux estrogènes dans le cervelet des rats J21. Immunodétection du récepteur ERα (**A**) et du récepteur ERβ (**C**) par l'approche western-blot. Les différentes pistes contiennent les protéines extraites (50µg) de cervelet des rats J21 témoins (T) et carencés (C). Comparaison semi-quantitative de l'expression de la protéine ERα (**B**) et ERβ (**D**) obtenue par western-blot. L'expression d'ERα et d'ERβ est normalisée à celle de la GAPDH.
Moyennes ± écart-types. Test ANOVA, **p*<0,05, N = 5. ER : *estrogen receptor*.

L'ensemble de ces observations suggère que l'altération de l'expression des protéines clés de la NSG, mesurée dans le cervelet des femelles soumises à une carence gestationnelle en folates, va affecter le contenu en estradiol et le taux d'expression des récepteurs ERα et ERβ, dans les cellules cérébelleuses.

I.5. Effets de la carence en donneurs sur la cascade de signalisation intracellulaire régulant la synthèse des neurostéroïdes.

Afin de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'altération de la NSG consécutive à la carence en donneurs de méthyles, nous nous sommes intéressés à l'expression des protéines majeures impliquées dans la voie de signalisation dépendante de l'AMPc.

I.5.1. Expression du récepteur LHR et mesure du taux d'AMPc

Sur les coupes cérébrales, l'immunomarquage du récepteur LHR est fortement réduit dans les cellules de *Purkinje* du cervelet des animaux carencés par rapport aux témoins, et ceci uniquement dans le groupe des ratons femelles (Figure 24 A). Ces observations ont été confirmées par l'analyse en western-blot (Figure 24 B), puisque seuls les échantillons de cervelet des ratons femelles carencées montrent une diminution significative de l'intensité de la bande de migration de LHR par rapport aux témoins.

Dans les conditions normales, la fixation du ligand (LH) sur le récepteur LHR conduit à la production d'AMPc qui va à son tour activer PKA, responsable de la phosphorylation des facteurs de transcription situés dans la région promotrice des gènes *StAR* et *aromatase*.

La mesure des concentrations en AMPc dans le cervelet des rats mâles et femelles (Figure 24 C) montre qu'elle est significativement augmentée chez les rats recevant le régime carencé, quelque soit le sexe. Cependant, dans le cas des femelles carencées, le niveau d'accroissement est plus faible par rapport aux mâles carencés (p<0,05), ce qui pourrait signifier que l'activation de la NSG, consécutive à une élevation du taux d'AMPc, serait moins efficace dans le cas des femelles, en comparaison avec les mâles carencés.

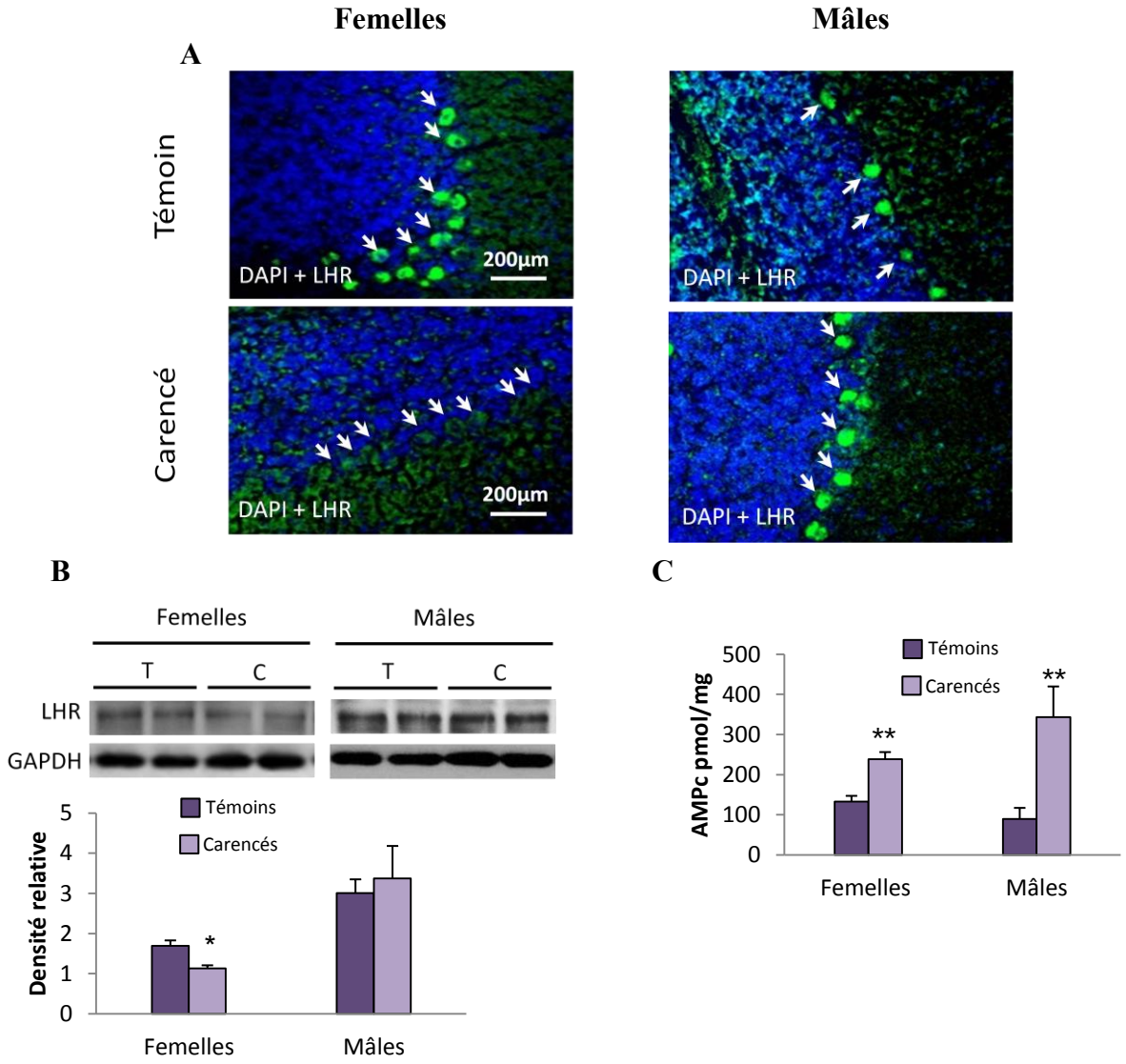


Figure 24: Analyse de l'expression du récepteur LHR et mesure du taux d'AMPc dans le cervelet des rats à J21. (**A**): Marquage immunohistochimique du récepteur LHR. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que le récepteur LHR est détecté en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20. (**B**) Immunodétection du récepteur LHR par western-blot. Les différentes pistes contiennent des protéines extraites (50µg) de cervelet des rats J21 témoins (T) et carencés (C). L'expression du récepteur LHR est normalisée par rapport à celle de GAPDH. (**C**) Taux d'AMPc dans les extraits de cervelet.
Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05), (**p< 0.01). N = 5 par groupe. LHR : récepteur à l'hormone lutéinisante.

I.5.2. Expression des kinases impliquées dans la voie de signalisation intracellulaire

Contrairement à PKA, pour laquelle aucune variation n'a été mesurée entre témoins et carencés dans les 2 sexes, (Figure 25), chez les femelles déficientes, les analyses par western blot montrent une diminution du taux de la forme phosphorylée de PKC (phospho-PKC). A

l'inverse, chez les mâles, le taux de phosphoPKC est plus élevé chez les animaux carencés par rapport aux témoins.

A l'inverse, l'expression de la phosphatase PP2A est plus élevée chez les femelles déficientes, alors qu'elle diminue chez les mâles déficients, en comparaison aux animaux témoins de chaque sexe (Figure 25).

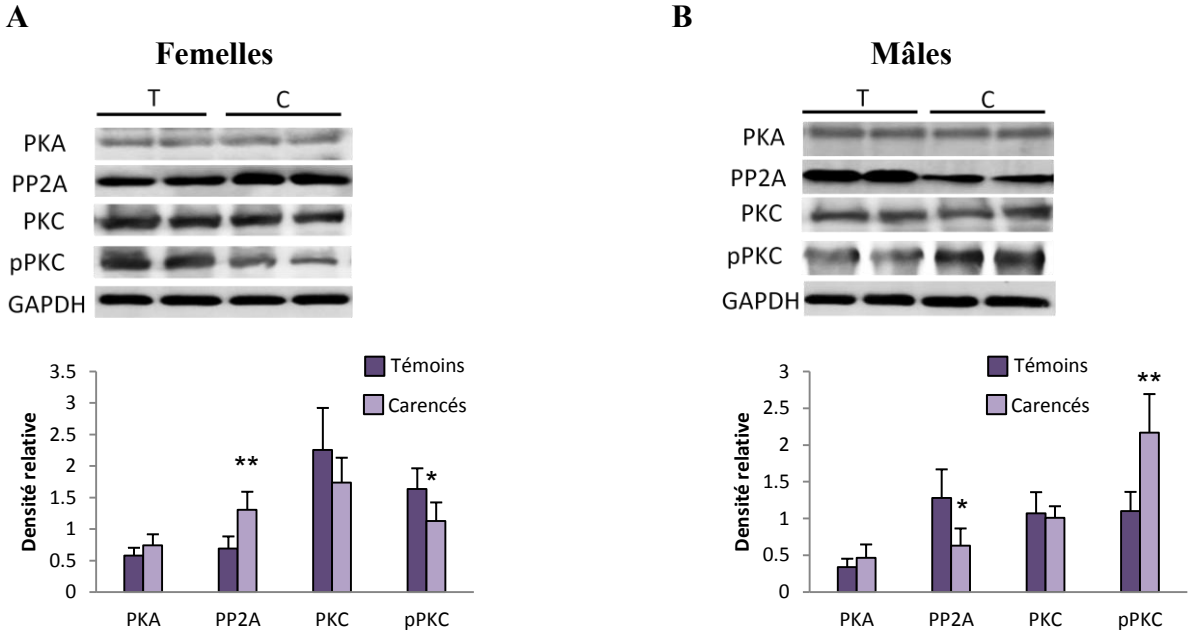


Figure 25: Analyse par western-blot de l'expression des kinases impliquées dans la voie de signalisation intracellulaire dans le cervelet des rats à J21. Immunodétection des protéines PKA, PKC, phospho-PKC et PP2A chez les rats femelles (**A**) et mâles (**B**). Les différentes pistes contiennent des protéines extraites (40µg) de cervelet des rats J21 témoins (T) et carencés (C). L'expression de chaque protéine d'intérêt est normalisée par rapport à celle de GAPDH.
Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (**p*<0,05), (***p*< 0.01). N = 5 par groupe.

I.5.3. Niveaux d'expression des facteurs de transcription situés dans le promoteur des gènes de la stéroïdogenèse

Afin de poursuivre nos investigations au niveau des mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer les effets délétères de la carence en donneurs de méthyles sur la NSG, nous nous sommes concentrés sur les facteurs de transcription liant le promoteur des gènes de la stéroïdogenèse, SF-1 et CREB.

Le facteur de transcription SF-1, largement décrit dans les tissus stéroïdogènes, joue un rôle primordial dans la synthèse des stéroïdes en se fixant sur son élément de réponse situé dans le

promoteur des gènes de StAR, LHR et des enzymes de la famille des cytochromes P450 (Martinez-Arguilles et Papadopoulos, 2010). Selon la littérature, sa localisation dans le cerveau a seulement été décrite dans la région ventro-médiale de l'hypothalamus dans laquelle il intervient dans la régulation du poids corporel, de la prise calorique et du comportement sexuel des femelles (Budefeld *et coll.,* 2012).

Comme le montrent les analyses immunohistochimiques effectuées sur les coupes de cervelet, SF-1 est présent dans les cellules de *Purkinje* des animaux témoins des 2 sexes (Figure 26 A). De plus, on peut observer une forte perte de l'immunodétection de SF-1 dans les cellules cérébelleuses des femelles carencées, ce qui n'est pas le cas pour les coupes issues des cerveaux mâles.

Ce résultat est conforté par les analyses en western-blot (Figure 26 B) effectuées sur les échantillons de cervelets, pour lesquelles l'intensité de la bande de migration de 46 kDa observée pour SF1 est fortement réduite (37,4%), et seulement dans le cas des femelles carencées comparées aux témoins du même sexe.

Ces diminutions observées au niveau protéique se confirment par l'abaissement des taux d'ARNm mesurés par RT-qPCR, uniquement dans le cervelet des femelles carencées (Figure 26 C).

Nous nous sommes également intéressés au facteur de transcription CREB, qui régule la transcription des gènes de la stéroïdogenèse, notamment celui de StAR et de l'aromatase. Comparés aux témoins, les taux de CREB et de sa forme phosphorylée (phosphoCREB) sont plus faibles dans les échantillons de cervelet de femelles carencées après analyse par western blot. Chez les mâles, l'expression de ces deux protéines augmente significativement en situation de carence (Figure 26 D).

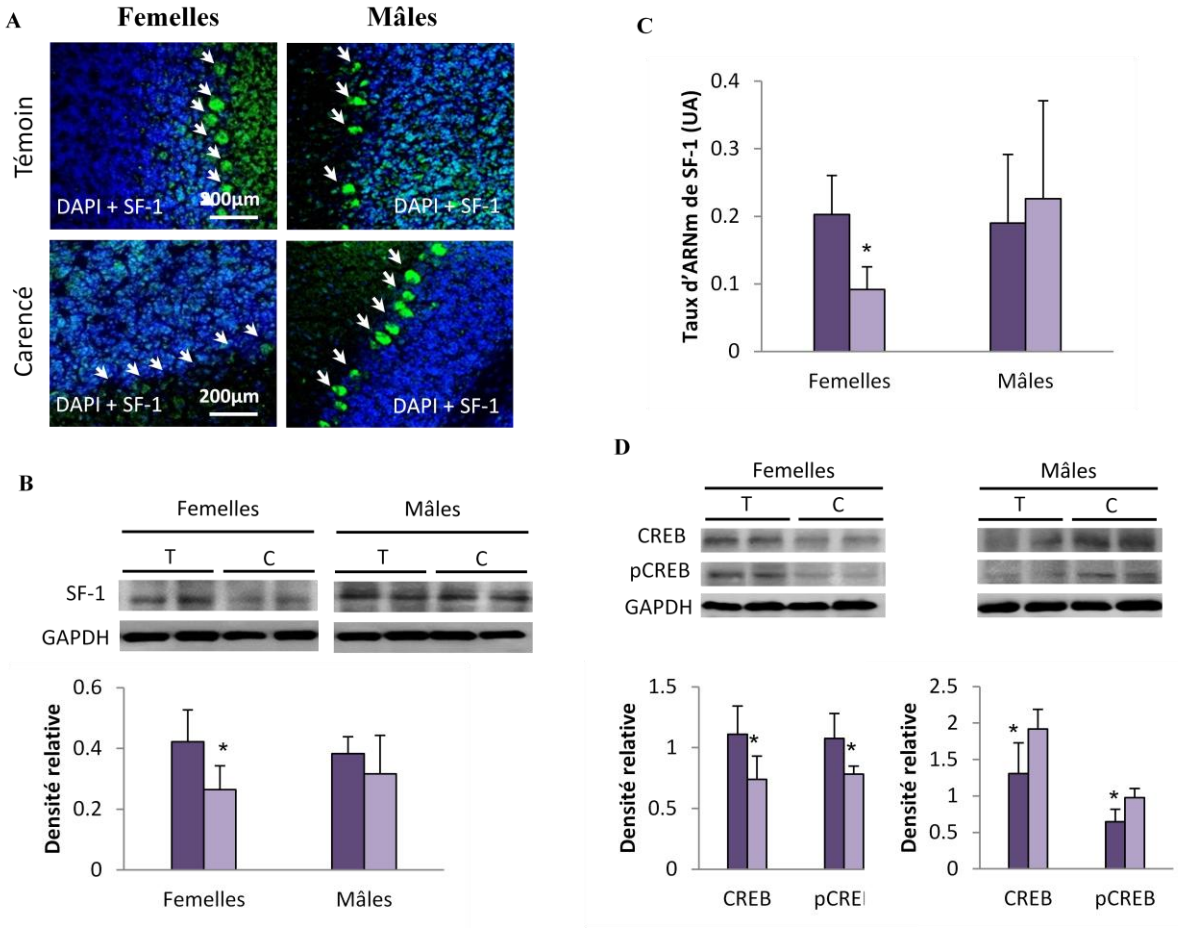


Figure 26: Analyse des niveaux d'expression des facteurs de transcription CREB et SF-1 dans le cervelet des rats à J21.

A. Marquage immunohistochimique de SF- dans les cellules de *Purkinje* du cervelet. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que SF-1 est marqué en vert. Grossissement X20. (N = 5 par groupe).

B. Analyse en western-blot de l'expression de SF-1. Les différentes pistes contiennent les protéines extraites (30µg) de cervelet des rats témoins (T) et carencés (C). L'expression de SF-1 est normalisée à celle de la GAPDH. Moyennes ± écart-types, test ANOVA, **p*<0,05, N = 5.

C. Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de SF-1. Taux d'ARNm exprimés en unités arbitraires (UA). Les valeurs sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour l'ARNm de la polymérase II. Moyennes ± écart-types, test ANOVA, **p*<0,05, N = 5.

D. Analyse en western-blot de l'expression de CREB et phospho-CREB. Les différentes pistes contiennent les protéines extraites (40µg) de cervelet des rats T et C. L'expression de chaque protéine d'intérêt est quantifiée et normalisée à celle de la GAPDH. Moyennes ± écart-types, test ANOVA, **p*<0,05, N = 5.

Ces résultats suggèrent que l'altération de la NSG associée à la carence précoce en donneurs en méthyles, résulterait, du moins en partie, d'un dysfonctionnement de la cascade de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMPc, les femelles déficientes étant caractérisées par une efficacité moindre de l'activation de la NSG.

I.6. Conclusion

La carence gestationnelle en donneurs de méthyles entraîne une altération de la NSG dans le cervelet des femelles âgées de 21 jours, qui se traduit par une perte du contenu en estradiol et en PREG consécutive à la diminution de l'expression des protéines des étapes limitantes de la NSG (StAR, TSPO, aromatase) et des récepteurs ERα, ERβ et LHR. Ces effets délétères sont associés à une atteinte de la voie de signalisation dépendante de l'AMPc et la diminution de CREB et du facteur de transcription SF-1, que nous localisons pour la première fois dans les cellules de *Purkinje*.

II. La carence précoce en donneurs de méthyles affecte les performances olfactives des ratons en période post-natale en association avec une altération de neurostéroïdogenèse dans les bulbes olfactifs.

Dans le modèle animal de carence gestationnelle en donneurs de méthyles développé au laboratoire, s'ajoutant aux différentes anomalies décrites plus haut, les animaux carencés présentaient également un retard de croissance (Blaise *et coll.,* 2005) associé à un poids corporel réduit, ce dernier point étant confirmé dans notre étude. En dehors de l'apoptose décrite dans la SVZ et le gyrus dentelé de l'hippocampe, d'autres travaux réalisés plus récemment dans notre laboratoire suggèrent que ce retard de croissance pourrait résulter en partie de l'altération de la sécrétion par les cellules de la muqueuse gastrique du peptide orexigène, la grheline (Bossenmeyer-Pourié *et coll.,* 2010).

L'hypothèse que nous nous sommes proposée de vérifier est que ces retards de croissance et de prise de poids en période d'allaitement seraient reliés à des désordres nutritionnels résultant d'une perte des capacités de discrimination olfactive chez les ratons carencés. En effet, l'installation précoce de ces performances olfactives joue un rôle crucial dans la survie des ratons en période d'allaitement puisqu'ils leurs permettront de reconnaître l'odeur maternelle. C'est grâce à la liaison de la noradrénaline sur les récepteurs β-adrénergiques des BO résultant d'une stimulation tactile, que cet apprentissage se mettra en place (Leon, 1992 ; Lledo *et coll*., 2005). En dehors du gyrus denté et de la SVZ, les BO sont reconnus comme une troisième zone de neurogenèse dans le cerveau, puisqu'ils constituent le site de projection des progéniteurs neuronaux issus de la SVZ pour se différencier en interneurones bulbaires. Or, plusieurs auteurs ont montré que la reconnaissance maternelle était dépendante de la mise en place d'une neurogenèse particulièrement active dans les BO, en période post-natale. Ces mécanismes sont étroitement liés à la NSG puisque l'estradiol exerce un effet modulateur sur le recrutement des progéniteurs neuronaux vers les BO (Brock *et coll*., 2010), ce qui montre son importance de l'estradiol sur la discrimination olfactive.

En accord avec les observations précédentes, l'objectif de ce travail était de vérifier, dans un premier temps, si la carence précoce en donneurs de méthyles entraînait une perte de la discrimination olfactive puis, en second lieu, si elle était associée à une altération de la NSG dans les BO des ratons.

Pour ce faire, nous avons d'abord étudié l'effet de la carence en donneurs de méthyles sur la performance olfactive par des tests comportementaux évaluant l'olfaction selon le sexe. En association avec les déterminants classiques du métabolisme de l'HCY, nous avons mesuré les niveaux d'expression des protéines clés de la NSG, des récepteurs aux estrogènes ERα et ERβ, ainsi que le contenu en estradiol dans les BO de ratons nés de mères soumises à un régime normal ou déficient en donneurs de méthyles. Enfin, nous avons étudié l'effet de la carence sur l'apoptose et la prolifération des neurones de la couche glomérulaire de BO des rats âgés de 21 jours, ainsi que sur le taux de méthylation global de l'ADN.

Cette étude a fait l'objet de la publication (jointe en annexe) :
« **Gestational methyl donor deficiency alters key proteins in neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs of newborn female rats and is associated with impaired olfactory performance", *Br J Nutr* (2013), *sous presse***

II.1. Effet de la carence en donneurs de méthyles sur les concentrations en vitamines B9 et B12 et les déterminants du métabolisme de l'homocystéine

Comme dans le cervelet, nous avons mesuré les variations des déterminants du métabolisme de l'HCY dans les BO des ratons nouveaux-nés (*publication en annexe, Figure 2*). Dans les BO des ratons carencés, les concentrations en folates et en vit B12 restent inférieures à celles des animaux témoins, quelque soit le sexe (*publication en annexe Figures 2A et 2B*)

Si aucune variation entre témoins et carencés concernant les taux de SAM n'apparaît (*publication en annexe Figure 2C*), les concentrations en SAH sont spécifiquement plus élevées dans le cas des femelles carencées, avec pour conséquence une diminution du ratio SAM/SAH, comparé aux témoins de même sexe (*publication en annexe Figures 2D et 2E*).

Les mesures du taux de méthylation global de l'ADN sur les extraits de BO montrent que, dans les BO des femelles carencées, il est réduit de 19,34% par rapport aux témoins. Dans le cas des mâles, on ne mesure aucune variation significative (Tableau V).

Tableau V: Mesure du taux de méthylation global dans les bulbes olfactifs des ratons âgés de 21 jours.

	Femelles (21 jours)		Mâles (21 jours)	
	Témoins	Carencées	Témoins	Carencés
% de méthylation global d'ADN	80,84 ± 12,94	65,20 ± 6,83*	74,11 ± 4,71	73,52 ± 7,37

Moyenne ± écartype, test ANOVA, (*p<0,05). N = 5 par groupe.

II.2. Immunodétection de l'homocystéine et des marqueurs d'apoptose et de prolifération cellulaire dans les BO.

L'HCY s'accumule dans la couche glomérulaire des BO des femelles carencées et plus particulièrement dans les dendrites (*publication en annexe, Figure 3B)*, ce qui n'est pas observé dans les BO des mâles carencés (Figure 27 A). Les expériences d'immunomarquage des coupes de BO effectuées à l'aide de l'anticorps dirigé contre le marqueur d'apoptose, la caspase-3 clivée, montrent une forte immunoréactivité dans les cellules glomérulaires des BO des femelles soumises à la carence (*publication en annexe, Figure 3C*). A l'inverse, en utilisant l'anticorps anti-Ki67, marqueur de prolifération cellulaire, l'immunoréactivité devient pratiquement indétectable dans ce même groupe (*publication en annexe, Figure 3D*). Dans le groupe des nouveau-nés mâles, l'immunomarquage de l'anti-caspase-3 n'est pas observable en cas de carence (Figure 27 B). Quant à la prolifération cellulaire, elle ne semble pas affectée par la carence dans les BO des mâles (Figure 27 C).

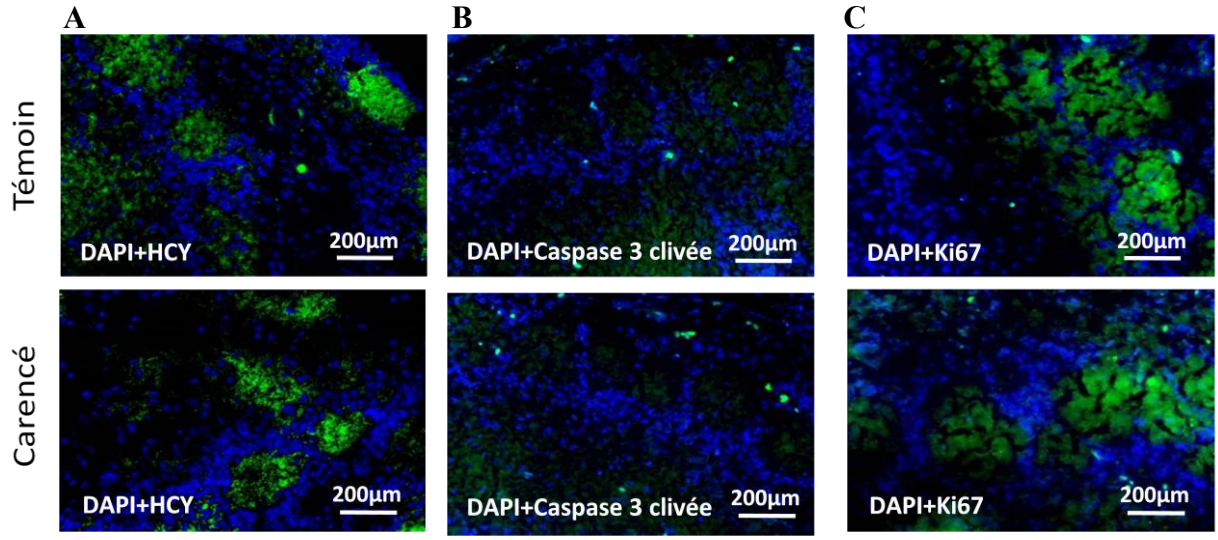


Figure 27: Marquage immunohistochimique de l'HCY, la caspase 3 clivée ainsi que la protéine Ki67 dans les BO des rats mâles à J21. Immunodétéction de l'HCY (**A**), la caspase 3 clivée (**B**) et la protéine Ki67 (**C**) sur des coupes sagittales. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que l'HCY, la caspase 3 clivée et la protéine Ki67 sont marquées en vert. N = 5. Grossissement X20.

II.3. Expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse et contenu en estradiol dans les bulbes olfactifs

II.3.1. Expresssion des protéines StAR, TSPO et de l'aromatase

Analyse par immunohistochimie

L'analyse par immunohistochimie de coupes cérébrales de BO marquées à l'anticorps anti-StAR et anti-aromatase, montre que l'immunoréactivité de ces deux protéines diminue dans la couche glomérulaire des ratons femelles carencées, alors qu'aucune différence n'est retrouvée chez les ratons mâles (*publication en annexe, Figure 4A et B*).

Nous avons également pu localiser la protéine TSPO dans la couche glomérulaire des BO, mais aucune différence n'a été observée entre les coupes issues des ratons nés de mères carencées par rapport à ceux ayant reçu une alimentation normale, quelque soit le sexe (Figure 28 A et B).

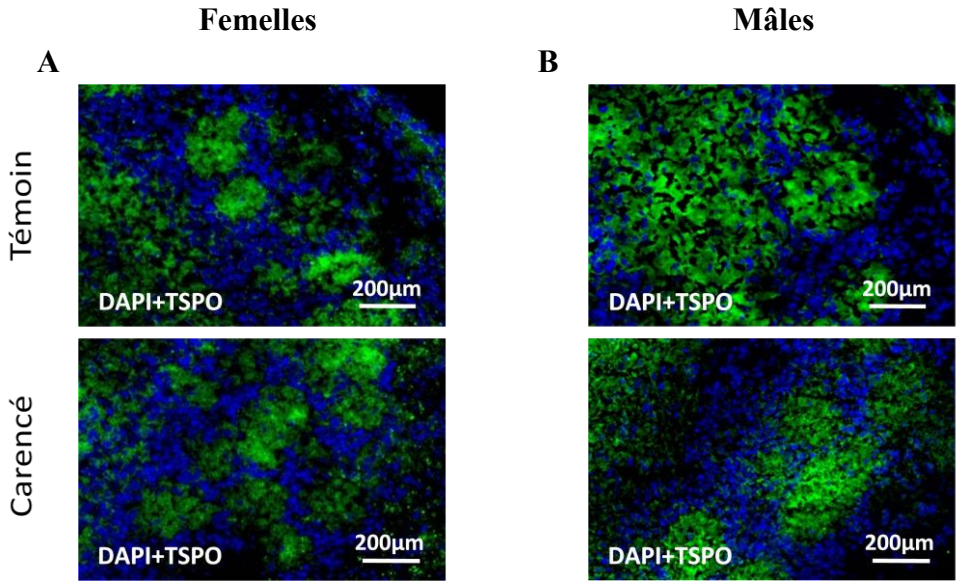


Figure 28: Marquage immunohistochimique de la protéine TSPO dans la couche glomérulaire des BO des rats âgés de 21 jours. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que TSPO est détecé en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20. TSPO : *translocator protein*.

Analyse par western-blot

Les modifications observées par immunohistochimie ont été confirmées par les analyses par western-blot. Les niveaux d'expression de StAR et de l'aromatase étaient moins élevés dans les BO des femelles issues des mères carencées, plus particulièrement pour StAR atteignant une réduction de 60% par rapport à ceux des animaux témoins (*publication en annexe, Figures 5A et B*). L'expression de ces protéines est restée inchangée entre les ratons mâles témoins et carencés.

La figure 29 représente l'analyse par western-blot de la protéine TSPO (80 kDa) obtenue à partir de fractions mitochondriales issues des BO des ratons âgés de 21 jours. Aucune différence significative n'a pu être mesurée entre les ratons témoins et carencés quelque soit le sexe.

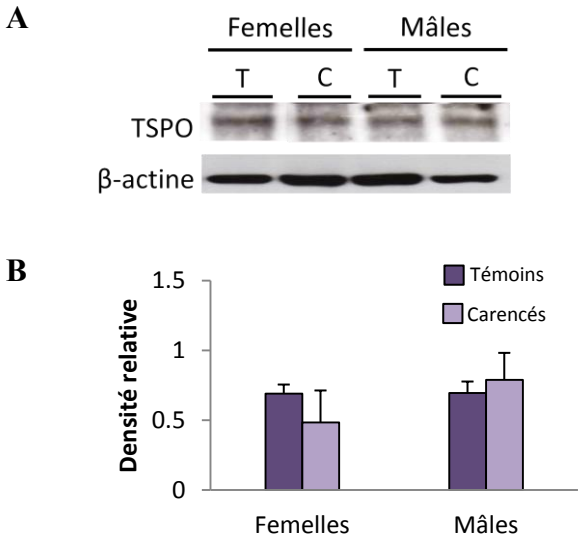


Figure 29: Analyse par western-blot de l'expression de la protéine TSPO dans les fractions mitochondriales de bulbes olfactifs des ratons âgés de 21 jours. A. Immunodétection de la protéine TSPO (50µg). **B**. Comparaison semi-quantitative de l'expression de la protéine TSPO à celle de la β-actine. Moyennes ± écart-types. Test ANOVA. N = 5 par groupe. T, témoin ; C, carencé ; TSPO, *translocator protein*.

Analyse par RT-qPCR

Les niveaux d'ARNm mesurés par RT-qPCR sont en accord avec les observations précédentes. La réduction du taux de transcrits atteint 30% pour le gène *StAR* et 32,7% pour celui de l'aromatase dans les BO des jeunes femelles carencées, uniquement (*publication en annexe, Figures 6A et B*).

II.3.2. Contenu en 17β-estradiol et expression des récepteurs aux estrogènes dans les bulbes olfactifs.

Comme dans les autres régions cérébrales, l'immunoréactivité du 17β-estradiol apparaît fortement réduite dans les cellules glomérulaires des BO prélevés à partir des femelles carencées (*publication en annexe, Figure 4D*), alors que le contenu ne semble pas affecté par la carence dans le groupe des mâles (Figure 30)

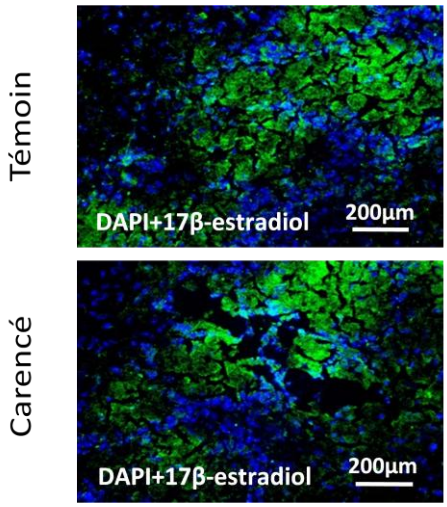


Figure 30: Marquage immunohistochimique du 17β-estradiol dans les bulbes olfactifs des rats mâles. Les noyaux des cellules glomérulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que le 17β-estradiol est détecté en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20.

Enfin, concernant les récepteurs aux estrogènes, seule l'expression d'ERα semble affectée par la carence dans les BO des rats femelles uniquement. Ceci a été démontré à la fois, par la perte important de l'immunoréactivité de l'anticorps anti-ERα dans les cellules glomérulaires (*publication en annexe, Figure 4C*), l'altération du niveau d'expression de la protéine mesurée par analyse western-blot (*publication en annexe, Figure 5C*) ainsi que la réduction de 40,8% du taux de transcrits du gène *ERα* (*publication en annexe, Figure 6C*).

Dans les BO, contrairement aux autres régions cérébrales étudiées, les analyses par immunohistochimie (Figure 31 A, B) et par western blot (Figure 31 C, D) indiquent que le niveau d'expression du récepteur ERβ ne semble pas affecté par la carence, quelque soit le sexe.

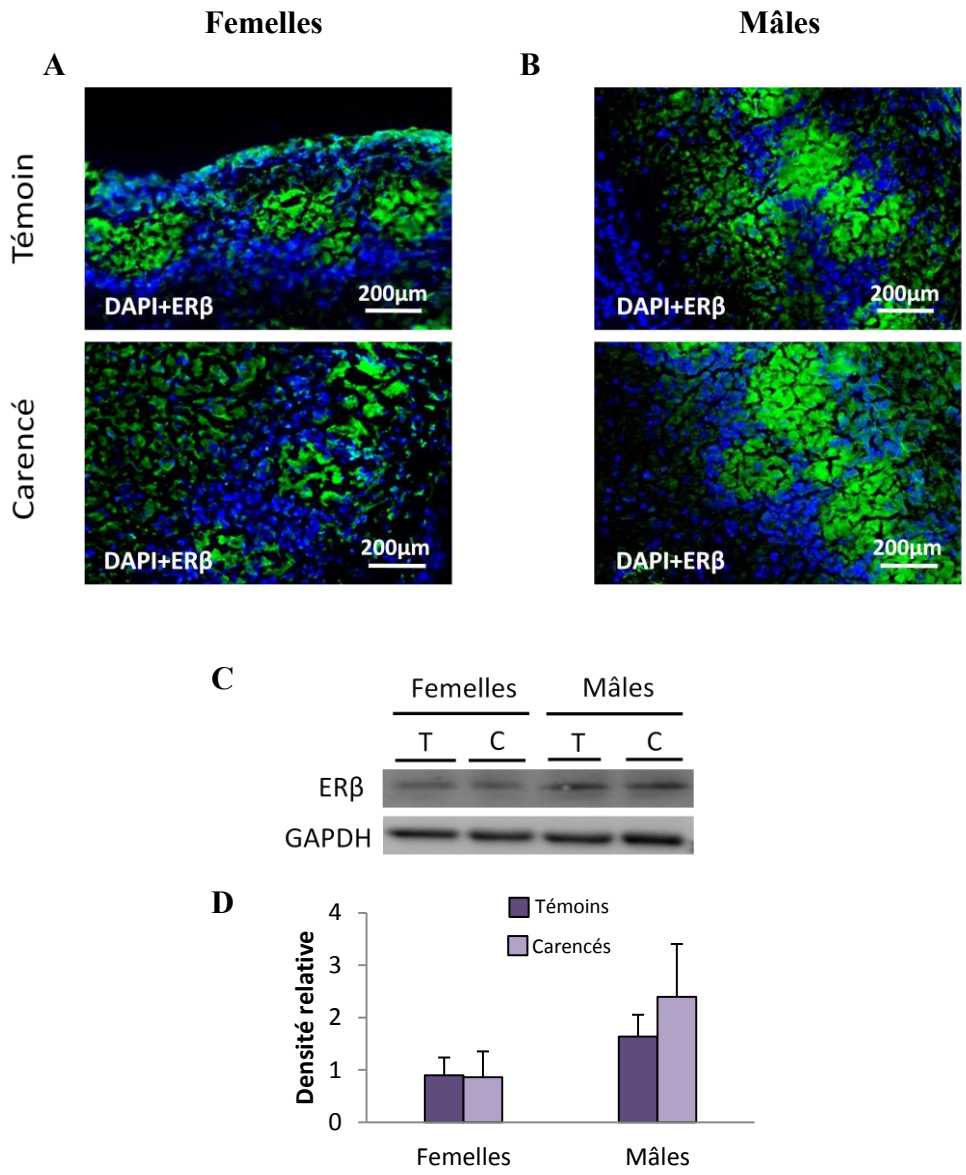


Figure 31: Expression du récepteur ERβ dans les bulbes olfactifs des rats âgés de 21 jours. A, B. Immunohistochimie par marquage des cellules glomérulaires des rats femelles (**A**) et mâles (**B**). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que ERβ est détecté en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20.

C, D. Analyse par western-blot. Immunodétection ERβ (**C**) (55 kDa, 50µg de protéines) et comparaison semi-quantitative de l'expression de la protéine (D) obtenue par western-blot normalisée à celle de la GAPDH. Les données densitométriques sont obtenues à partir de 5 expériences distinctes. Moyennes ± écart-types. Test ANOVA, **p*<0,05, N = 5. ER : *estrogen receptor*, T, témoins ; C, carencés.

II.4. Niveaux d'expression de LHR et SF-1 dans les bulbes olfactifs

Pour expliquer la diminution du taux de l'ARNm de StAR et de l'aromatase dans les BO des rats femelles carencés âgées de 21 jours, nous avons étudié l'effet de la carence sur le facteur de transcription SF-1 et le récepteur LHR impliqués dans l'expression de ces gènes.

Par analyse immunohistochimique, nous avons pu montrer que le facteur de transcription SF-1 est également présent dans les BO du cerveau de rat, tout comme dans le cervelet et l'hippocampe. Sur la Figure 32 A, l'immunomarquage en présence de l'anticorps anti-SF-1 apparaît dans la couche glomérulaire, et il est nettement atténué dans le cas des femelles carencées. Il est co-localisé avec le récepteur LHR pour lequel on observe également une immunodétection réduite figure 32 B, toujours dans le cas des femelles uniquement.

Les variations de ces 2 protéines ont été confirmées par l'analyse western-blot dont l'analyse semi-quantitative indique une diminution significative de l'intensité de la bande de migration SF-1 et de LHR par rapport aux femelles témoins. Le régime carencé ne semble pas affecter leur expression dans les BO des ratons mâles (Figure 32 C et D).

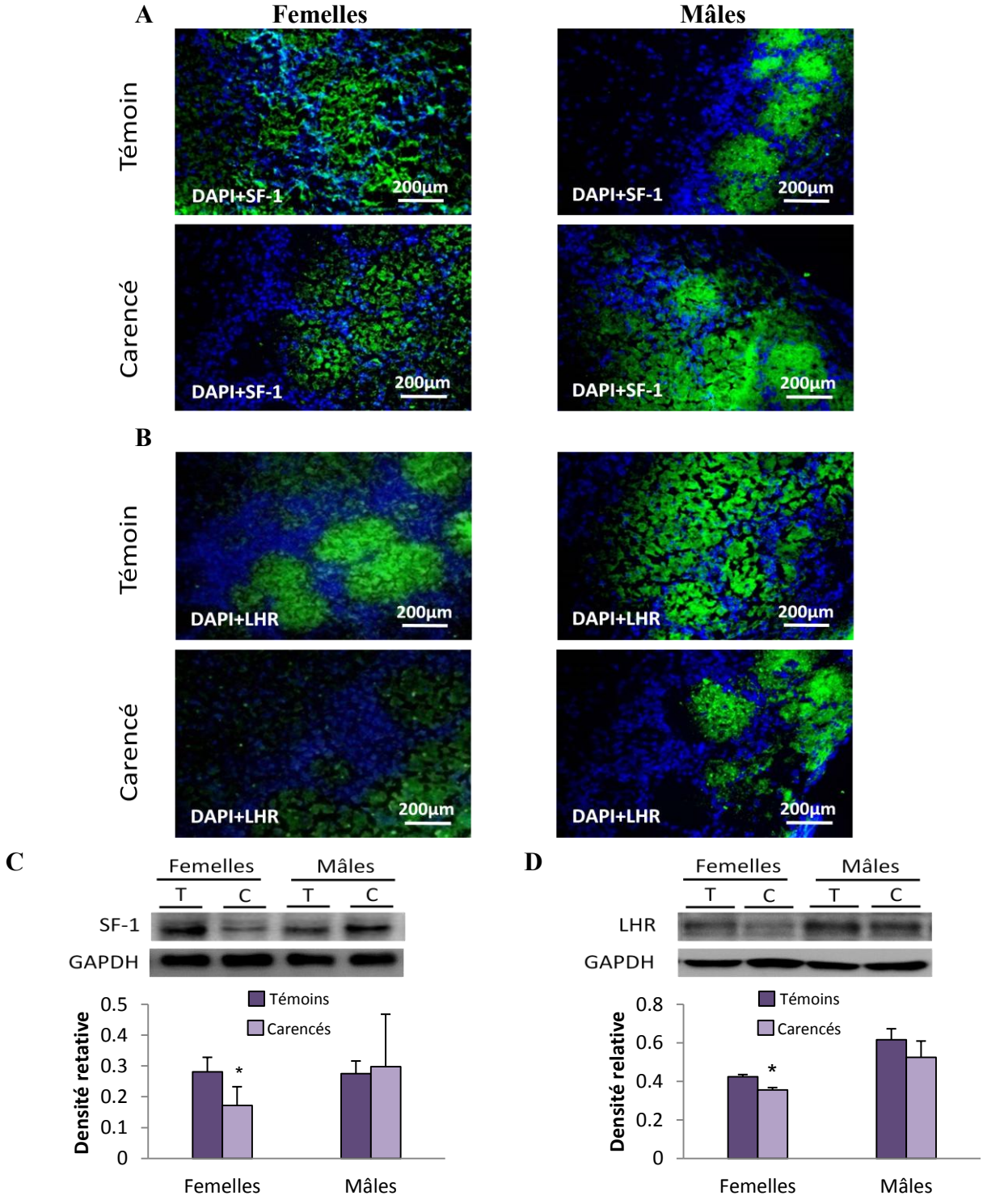


Figure 32: Effet de la carence en donneurs de méthyles sur l'expression de SF-1 et de LHR dans les BO des ratons de 21 jours. (**A** et **B**) Analyse par immunohistochimie : les images représentées ci-dessus sont prises dans la couche glomérulaire des BO. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que la protéine SF-1 et le récepteur LHR sont marqués en vert. N = 5 Grossissement X20. (**C** et **D**) Analyse par western-blot : Les différentes pistes contiennent les protéines extraites (30µg pour SF-1 et 50µg pour LHR) des BO des ratons de 21 jours témoins (T) et carencés (C). L'expression de SF-1 et de LHR est normalisée à celle de la GAPDH. Moyennes ± écart-types. Test ANOVA, **p*<0,05, N = 5 par groupe. T, témoins ; C, carencés. SF-1, *steroidogenic factor-1* ; LHR, *luteinizing hormone receptor*.

II.5. Tests comportementaux de discrimination olfactive.

Afin de vérifier les conséquences fonctionnelles de l'altération de la NSG, consécutive à la carence précoce en donneurs de méthyles dans les BO, nous avons soumis les ratons à des tests comportementaux visant à évaluer leurs performances olfactives.

Le premier test effectué était dédié à la reconnaissance olfactive ou « *homing test* ». Les figures 1A et 1B (*publication en annexe*) correspondent à la mesure du temps nécessaire pour chaque animal pour atteindre la zone contenant la litière de la cage d'élevage. Plus le temps mesuré s'accroit, moins l'animal sera performant. Les rats témoins ce sont montrés de plus en plus rapides pour reconnaître la litière de leurs cages entre les jours post-nataux J5 à J19 (décroissance du temps de 100 sec à moins de 20 sec). Malgré la chute observée à la fin de la période de lactation (21 jours) chez les animaux carencés, le temps nécessaire pour effectuer le test était significativement plus élevé par rapport aux témoins, dès le 9ème jour post-natal pour les femelles ($p = 0.044$) et le 14ème jour concernant les mâles ($p = 0.007$). Ces résultats montrent que, si la reconnaissance olfactive était affectée quelque soit le sexe, elle apparaît plus marquée chez les rats femelles carencés.

Les figures 1C et 1D (*publication en annexe*) représentent le temps passé pour chaque groupe des rats dans les 3 zones du dispositif expérimental : la zone centrale, la zone neutre (eau) et la zone exposée à une substance odorante répulsive (le toluène). Lorsque l'on compare le temps passé par les animaux dans la zone odorante par rapport à la zone centrale ou la zone neutre, les femelles témoins passent peu de temps dans la zone « toluène » (10%) ($p<0,0001$). Les femelles issues des mères carencées passent jusqu'à 28% de temps dans la zone exposée au toluène, ce qui correspond à une répartition homogène dans les trois zones ($p = 0,5438$). Ceci montre que la discrimination d'un odorant répulsif (toluène), a été significativement affectée chez les femelles carencées par rapport aux témoins. A l'inverse, chez les mâles, aucune variation du temps n'a été constatée puisque les rats témoins et carencés ne passaient que 5 et 2% de leur temps dans la zone « toluène », respectivement (*publication en annexe,* Figure 1D).

II.6. Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'altération de la NSG observée dans le cadre d'une carence précoce en donneurs de méthyles, est associée à des altérations cellulaires des BO représentées par une apoptose et une atteinte de la prolifération cellulaire, susceptibles

d’entraîner une perturbation de la discrimination olfactive. Ces effets délétères pourraient être impliqués dans le retard de croissance et de prise de poids que nous avions reportés précédemment.

III. La carence précoce en donneurs de méthyles affecte également d'autres régions cérébrales des rats nouveau-nés, notamment l'hippocampe.

Au cours des 2 premières parties, nous avons pu montrer que la carence gestationnelle en donneurs de méthyles entraînait une altération de la NSG dans les différentes régions cérébrales des ratons nouveau-nés, et plus spécifiquement chez ceux de sexe femelle.

Les premières études menées sur le modèle animal de carence gestationnelle de l'équipe avaient montré qu'en dehors d'une accumulation d'HCY et d'une apoptose dans les régions impliquées dans la neurogenèse comme la SVZ et le gyrus denté de l'hippocampe, les rats âgés de 21 jours nés des mères carencées présentaient des troubles cognitifs (Blaise *et coll.,* 2005 ; Blaise *et coll.,* 2007a; Blaise *et coll.,* 2007b ; Blaise *et coll.,* 2009). Ces dommages fonctionnels seraient une conséquence d'une altération de la neurogenèse et de la plasticité synaptique (Daval *et coll.,* 2009), mécanismes étroitement liés à la NSG. Les neurostéroïdes, plus particulièrement l'estradiol, la progésterone, la déhydroépiandrostérone et la PREG, sont principalement localisés dans les astrocytes et les neurones de la région CA1-CA3 de l'hippocampe, jouant un rôle prépondérant dans les processus d'apprentissage et de mémorisation dans le cerveau de rat (Shibuya *et coll.,* 2003). A l'inverse, les pathologies neurodégénératives liées à l'âge se caratérisent par une altération de la NSG.

La première étape de ce travail a donc consisté en l'étude des principales protéines de la voie stéroïdogénique dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours, en association avec les marqueurs du métabolisme de l'HCY.

III.1. Concentrations en vitamines B9, B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans l'hippocampe.

Les concentrations en folates et en vit B12 étaient significativement diminuées dans l'hippocampe des ratons carencés par rapport au groupe témoin (Tableau VI). Cette diminution, tout comme l'hyperhomocystéinémie, étaient comparables aux études précédentes de l'équipe (Blaise *et coll*., 2007a).

Quant aux déterminants du métabolisme de l'HCY, si la carence en donneurs de méthyle n'affecte pas la concentration en SAM, un accroissement des taux de SAH de 37,8% a pu être mesuré dans l'hippocampe des femelles carencées par rapport aux témoins, avec pour

conséquence une diminution de 22,4% du ratio SAM/SAH. Chez les rats mâles, le régime carencé n'a pas montré d'effet, ni sur la concentration en SAH, ni sur le ratio SAM/SAH (Tableau VI). L'ensemble de ces variations est comparable à celles mesurées dans les autres régions cérébrales.

Tableau VI: Concentrations en vitamines B9 et B12 et des déterminants du métabolisme de l'homocystéine dans l'hippocampe des ratons âgés de 21 jours

	Femelles (21 jours)		**Mâles (21 jours)**	
	Témoins	Carencées	Témoins	Carencés
Vitamine B9 (nmol/g tissu)	1,16 ± 0,22	0,51 ± 0,25**	1,16 ± 0,28	0,56 ± 0,23*
Vitamine B12 (pmol/g tissu)	27,73 ± 12,00	12,33 ± 3,6*	24,36 ± 5,12	12,43 ± 1,66**
SAM (nmol/g tissu)	23,06 ± 2,40	28,47 ± 3,95	22,73 ± 3,65	27,68 ± 2,85
SAH (nmol/g tissu)	2,87 ± 0,36	4,62 ± 0,93*	3,17 ± 0,80	4,05 ± 0,57
SAM/SAH ratio	8,05 ± 0,65	6,24 ± 0,70**	7,35 ± 1,32	6,87 ± 0,78

Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05), (**p<0,01). N = 6 par groupe.

III.2. Accumulation de l'homocystéine dans l'hippocampe des femelles âgées de 21 jours

Chez les ratons femelles issus des mères carencées, une accumulation d'HCY a pu être mise en évidence par immunohistochimie dans la couche *stratum pyramidale* de la région CA1 de l'hippocampe (Figure 33 A), par rapport au groupe témoin, alors que chez les mâles, cette accumulation apparaît beaucoup moins nettement (Figure 33 B).

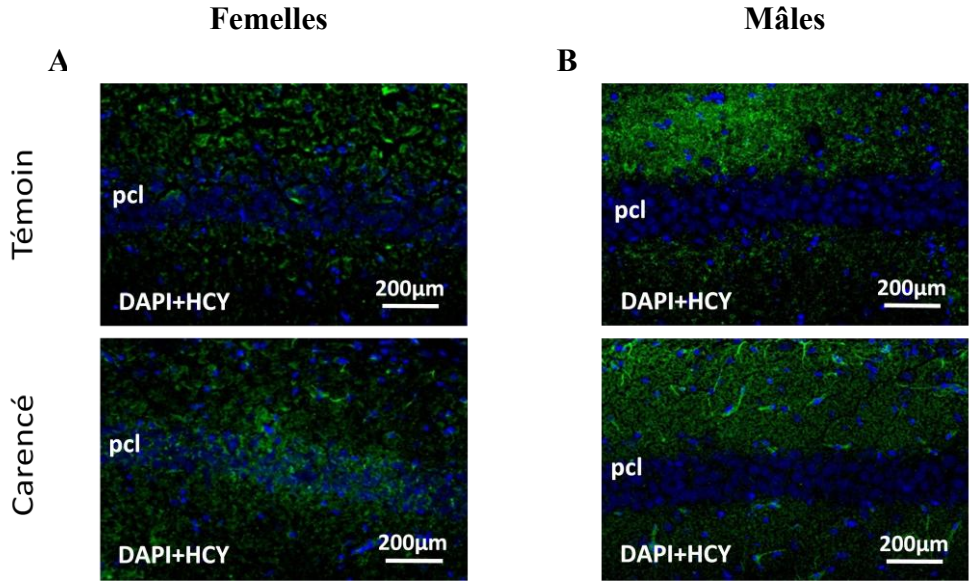


Figure 33 : Marquage immunohistochimique de l'homocystéine dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. Les images ci-dessus sont représentatives de coupes sagittales effectuées à partir d'un hippocampe de raton femelle (**A**) ou mâle (**B**). pcl (pyramidal cell layer) représente une couche cellulaire de la région CA1 (corne d'Ammon 1). Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que l'HCY est détectée en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20.

III.3. Niveaux d'expression des protéines clés de la neurostéroïdogenèse dans l'hippocampe

Analyse par immunohistochimie

L'observation des coupes tissulaires montre une répartition des protéines StAR et aromatase dans les différentes structures hippocampiques, équivalente à celles décrites par d'autres auteurs (Hojo *et coll.*, 2008). En effet, elles se localisent préférentiellement dans le gyrus denté, les régions CA1 et CA3 (Figure 34).

Chez les femelles carencées, une forte baisse de l'immunoréactivité des protéines StAR (Figure 34 A) et TSPO (Figure 34 C) a été mise en évidence dans la couche *stratum pyramidale* de la région CA1 par rapport aux témoins, ainsi que celle de l'aromatase dans cette même région de l'hippocampe (Figure 34 E). L'analyse des coupes cérébrales issues des ratons mâles n'a pas permis de montrer une différence de l'immunodétection de ces 3 protéines entre animaux témoins et carencés (Figures 34 B, D et F).

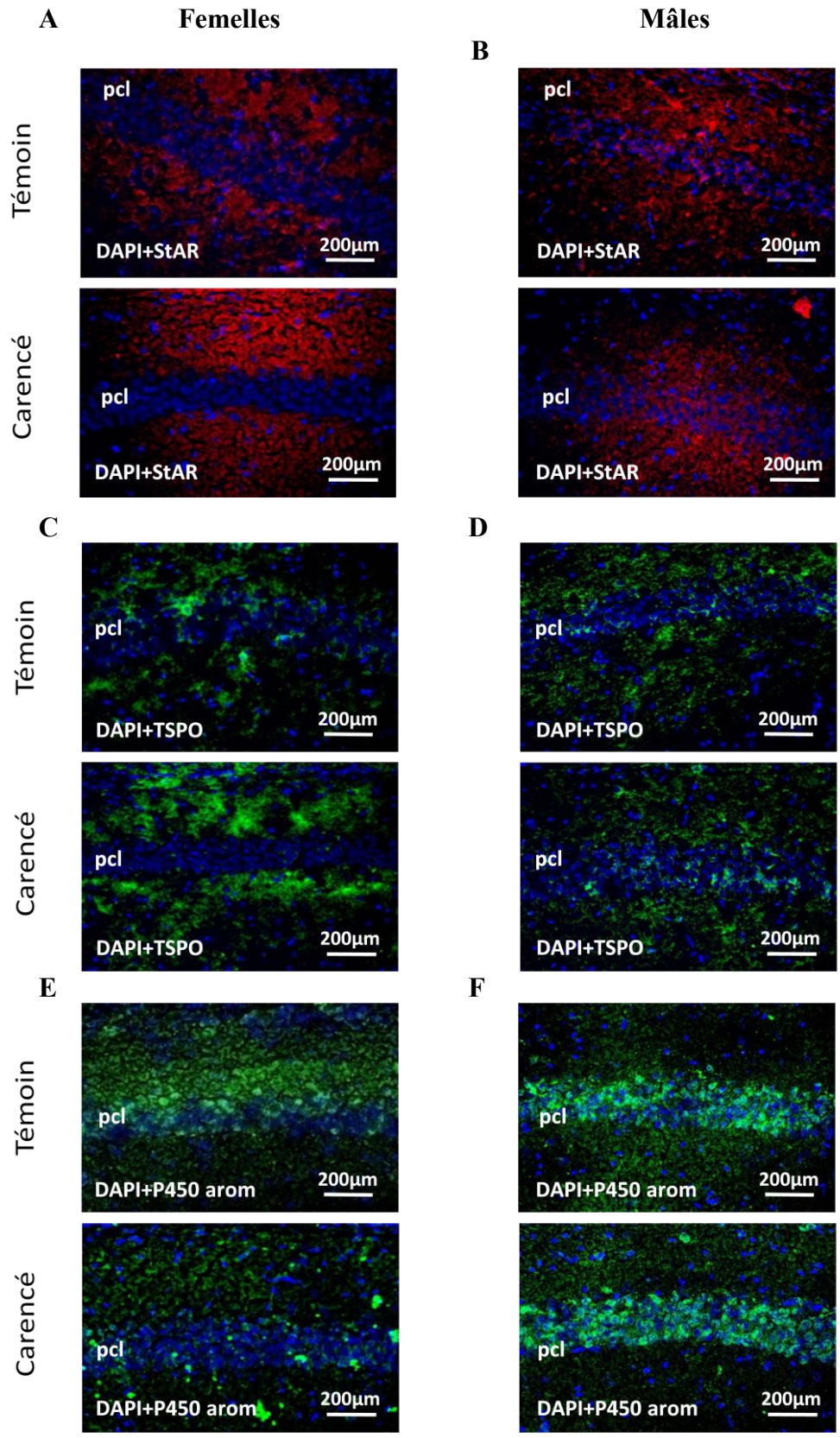


Figure 34: Marquage immunohistochimique de StAR, TSPO et aromatase dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). StAR (**A** et **B**) détectée en rouge, TSPO (**C** et **D**) et aromatase (**E** et **F**) en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20. pcl*, pyramidal cell layer* ; StAR, *steroidogenic acute regulatory protein* ; P450 arom, cytochrome P450 aromatase ; TSPO, *translocator protein*.

Analyse par western-blot

Nous avons effectué des analyses semi-quantitatives de l'expression des protéines StAR et TSPO dans les fractions mitochondriales d'hippocampe de rats à J21.

Le profil électrophorétique de la protéine StAR (30 kDa) obtenu à partir de fractions mitochondriales de l'hippocampe, des poumons et des gonades est représenté figure 35 A. Chez les femelles carencées, l'analyse densitométrique montre une diminution significative de l'intensité de la bande StAR (Figure 35 B) de 36%.

La figure 35 C représente l'analyse par western-blot de la protéine TSPO (80 kDa). Le profil électrophorétique (Figure 35 D) montre que les intensités diminuent de manière significative, de 34% dans les échantillons issus des ratons femelles carencés par rapport aux témoins

Quant à l'aromatase, une baisse significative de 37% de l'intensité de la bande de migration (55 kDa) (Figure 35 F) a également pu être mesurée après migration électrophorétique de fractions microsomales d'hippocampe de femelles carencées âgées de 21 jours.

Chez les ratons mâles, aucune différence significative entre témoins et carencés n'a été mesurée pour chacune des 3 protéines étudiées : StAR (Figure 35 B), aromatase (Figure 35 F) et TSPO (Figure 35 D).

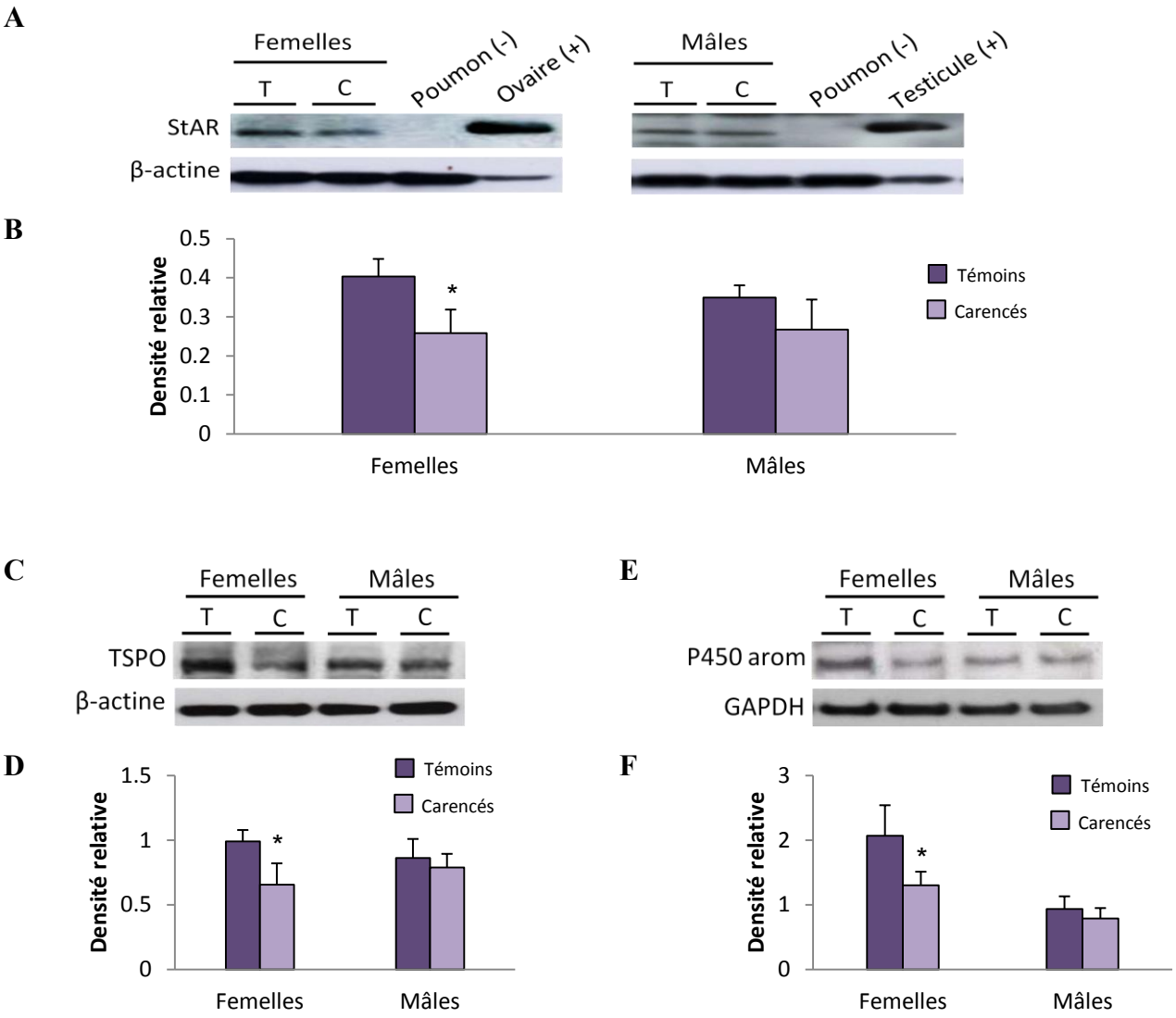


Figure 35: Analyse par western-blot de l'expression des protéines StAR, TSPO et aromatase dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. A. Immunodétection de StAR sur protéines mitochondriales de l'hippocampe (30µg), de poumons (30µg), d'ovaires (5µg) et de testicules (30µg). **C**. Immunodétection de TSPO (protéines mitochondriales, 50µg). **E**. Immunodétection de l'aromatase (protéines microsomales, 30µg). Analyse semi-quantitative de l'expression de la protéine StAR (**B**), TSPO (**D**) et aromatase (**F**) : expression de StAR et de TSPO normalisée par rapport à la β-actine, expression de l'aromatase normalisée par rapport à la GAPDH.
Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05). N = 5 par groupe.
T, témoins ; C, carencés ; StAR : *steroidogenic acute regulatory protein* ; P450 arom, aromatase ; TSPO : *translocator protein.*

Analyse par RT-qPCR

Le niveau d'expression relative des gènes *StAR*, *TSPO* et *aromatase* a été mesuré dans les extraits d'hippocampe des ratons âgés de 21 jours. Après normalisation des résultats par

rapport au gène de référence *Pol II,* aucune différence significative n'a pu être mesurée entre les animaux soumis au régime normal et carencés (Figure 36 A, B et C).

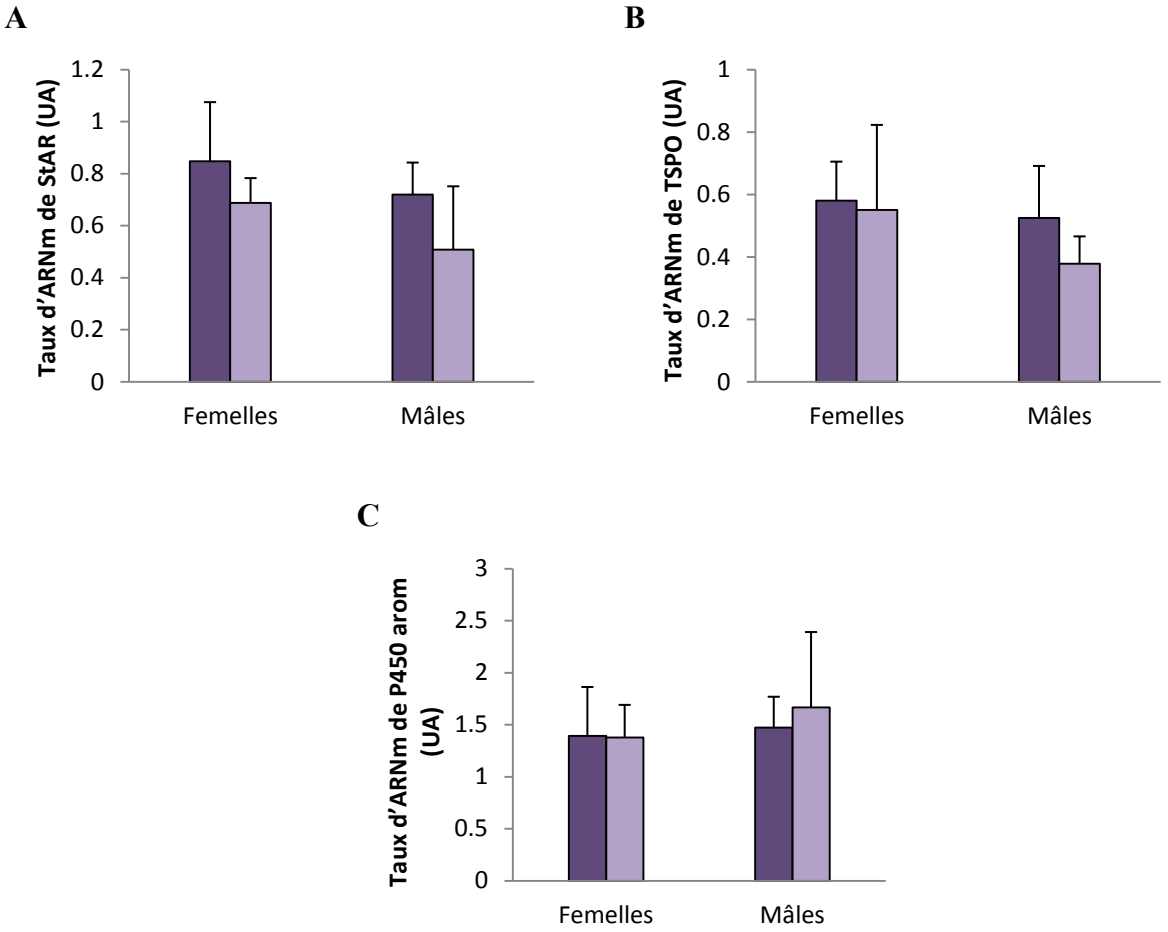


Figure 36: Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de StAR, aromatase et TSPO dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. Taux d'ARNm de StAR (**A**), TSPO (**B**) et aromatase (**C**) exprimés en unités arbitraires (UA). Moyennes ± écart-type, Test ANOVA, (N = 5). StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*. P450 arom : cytochrome P450 aromatase. TSPO : *translocator protein*.

Contrairement à la situation observée dans les 2 autres régions cérébrales étudiées, la carence en donneurs de méthyle ne semble pas affecter le taux d'ARNm des 3 protéines dans l'hippocampe des femelles âgées de 21 jours, ce qui suggère que des modifications post-traductionnelles pourraient avoir eu lieu.

III.3.1. Mesure de l'expression de la protéine kinase A et de la phosphatase A2

Selon les résultats décrits dans le paragraphe précédent, des modifications post-traductionnelles pourraient expliquer la discordance entre les analyses faites par western-blot et en RT-qPCR. Dans le cas particulier de la protéine StAR, elle représente l'étape limitante de la NSG permettant l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie. Rappelons qu'elle est localisée au sein du complexe protéique ou *transduceosome* des membranes mitochondriales, et qu'elle est activée par phosphorylation grâce à l'activation de la PKA. Cette forme phosphorylée va lui permettre d'interagir avec les autres protéines de ce complexe pour transporter le cholestérol à travers la membrane interne de la mitochondrie.

Comme le montre la Figure 37 A, le taux de PKA déterminé par western blot est moins élevé dans l'hippocampe des jeunes femelles carencées par rapport aux témoins, alors que celui de PKC ne semble pas affecté. A l'inverse, chez ces mêmes femelles carencées, on observe un accroissement de la quantité de phosphatase PP2A. Ces différences n'apparaissent pas dans le groupe des mâles (Figure 37 B).

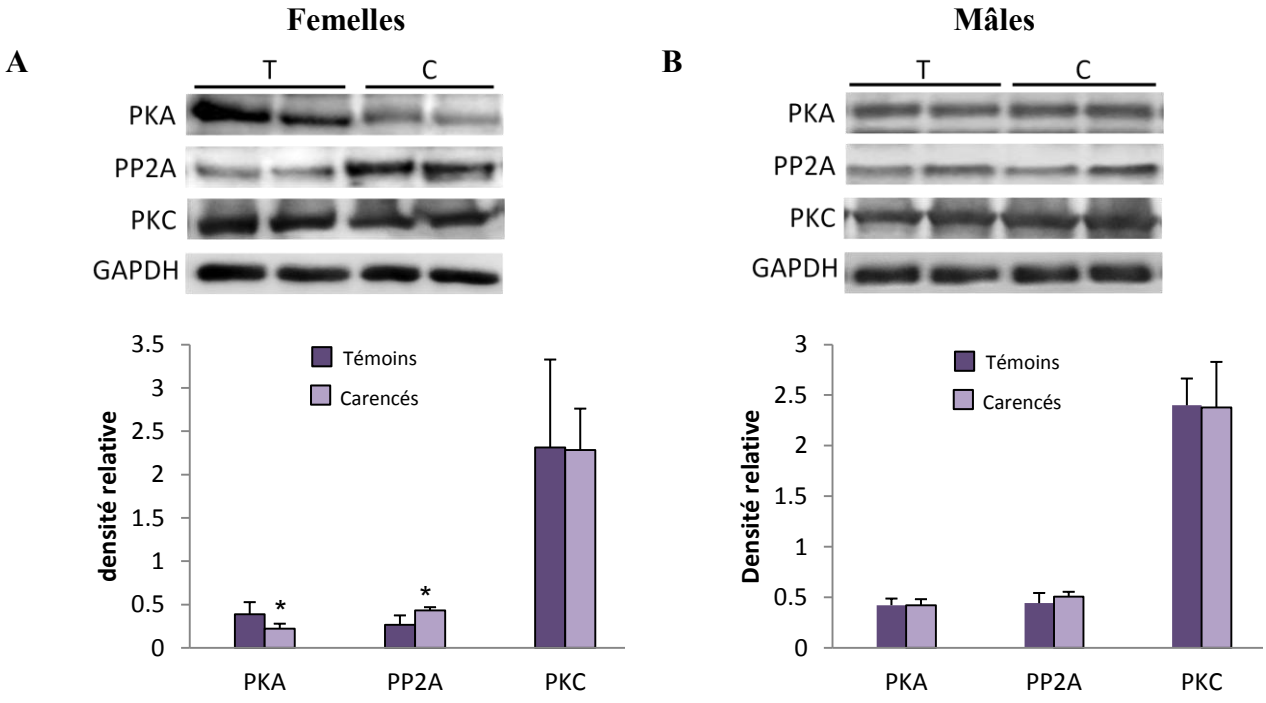


Figure 37: Analyse par western-blot de l'expression de la phosphatase PP2A et des protéines kinases PKA et PKC dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours. Immunodétection de la PKA, PKC, et PP2A chez les rats femelles (**A**) et mâles (**B**). Les différentes pistes contiennent des protéines extraites (40µg) de l'hippocampe des rats J21 témoins (T) et carencés (C). L'expression de chaque protéine d'intérêt est normalisée par rapport à celle de GAPDH.

Moyennes ± écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux témoins et carencés pour chaque sexe (*p<0,05). N = 5 par groupe.

Dans l'hippocampe des jeunes femelles, la carence gestationnelle en donneurs de méthyles affecterait le degré de phosphorylation des protéines, ce qui pourrait avoir pour conséquence une diminution de la forme phosphorylée active de la protéine StAR.

III.4. Contenu en 17β-estradiol et expression des récepteurs aux estrogènes dans l'hippocampe.

L'observation des coupes tissulaires en immunohistochimie a permis de localiser le 17β-estradiol et des récepteurs ERα et ERβ dans les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe.

Chez les femelles carencées, l'immunoréactivité du 17β-estradiol (Figure 38 A) et du récepteur ERα (Figure 38 C) est fortement réduite dans les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe par rapport aux témoins, alors qu'aucune différence d'intensité de ERβ (Figure 38 E) n'a pu être mise en évidence.

Chez les ratons mâles, aucune différence significative n'apparaît pour l'estradiol (Figure 38 B) et les récepteurs ERα (Figure 38 D) et ERβ (Figure 38 F) entre témoins et carencés.

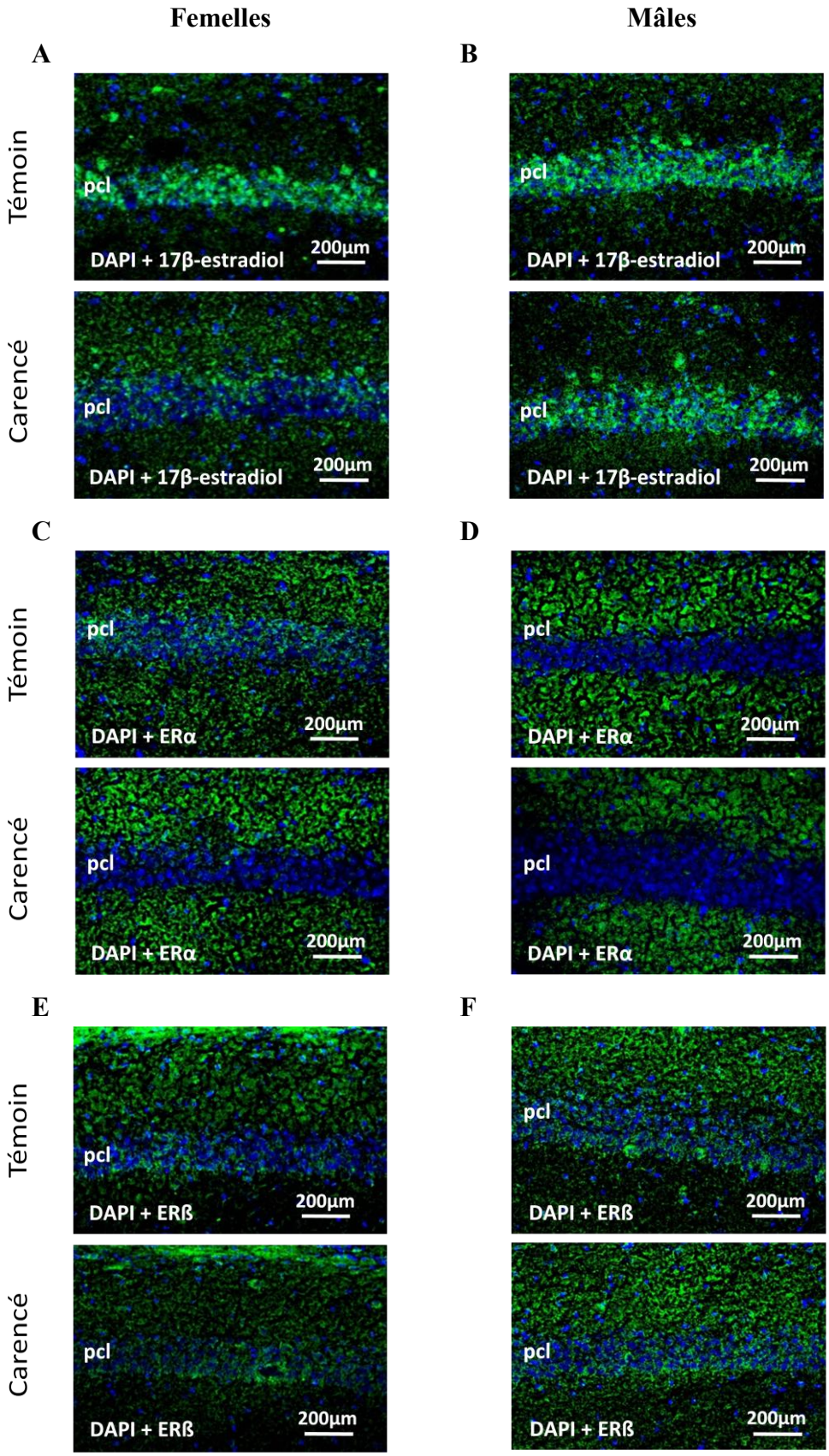


Figure 38: Marquage immunohistochimique de 17β-estradiol et des récepteurs aux estrogènes dans l'hippocampe des rats de 21 jours. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), le 17β-estradiol (**A** et **B**), l'ERα (**C** et **D**) et l'ERβ (**E** et **F**) en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20. pcl: *pyramidal cell layer*. ER : *estrogen receptor*.

Les analyses par western blot vont dans le sens des observations effectuées sur coupes cérébrales par immunohistochimie. Dans le cas des femelles carencées, l'analyse densitométrique du profil électrophorétique s'est traduite par un abaissement de l'intensité de la bande de migration de ERα (Figure 39 B) par rapport aux témoins, alors qu'aucune différence significative n'a été mesurée concernant ERβ (Figure 39 D).

Chez les mâles, quelque soit le type de récepteur, aucune variation n'a été mise en évidence entre animaux carencés et témoins (Figure 39 B et D).

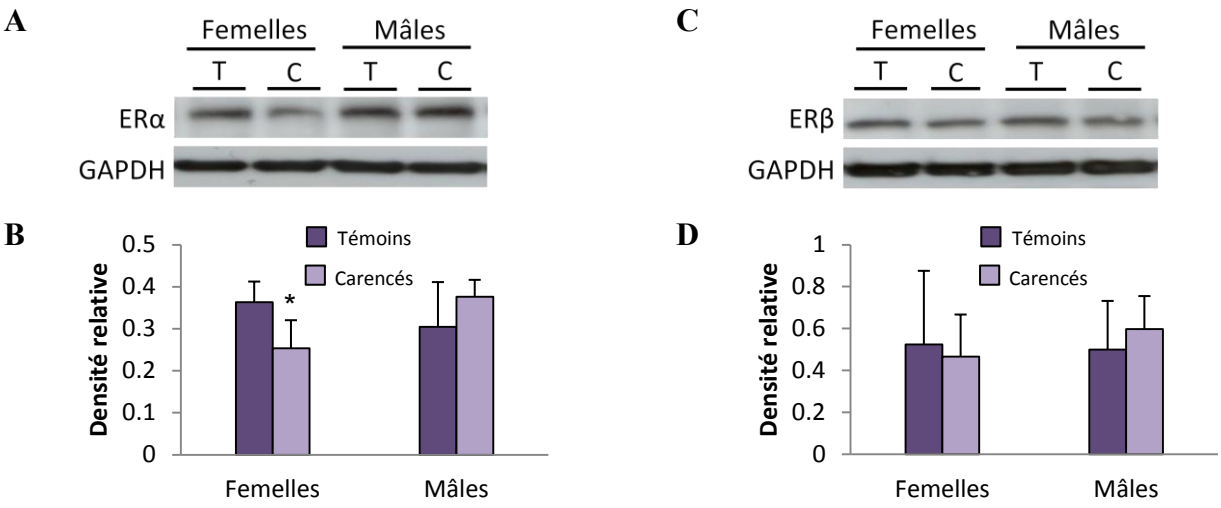


Figure 39: Analyse par western-blot de l'expression des récepteurs aux estrogènes dans l'hippocampe des rats J21. Immunodétection du récepteur ERα (**A**) et du récepteur ERβ (**C**). Les différentes pistes contiennent les protéines extraites (50µg) de l'hippocampe des rats J21 témoins (T) et carencés (C). Comparaison semi-quantitative de l'expression de la protéine ERα (**B**) et ERβ (**D**). L'expression d'ERα et d'ERβ est normalisée à celle de la GAPDH. Moyennes ± écart-types. Test ANOVA, **p*<0,05, N = 5. ER : *estrogen receptor*.

L'altération du taux des protéines clés de la NSG associée à la carence précoce en donneurs de méthyles, s'accompagne d'une réduction du contenu en 17β-estradiol et du niveau de récepteur ERα dans les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe des femelles âgées de 21 jours.

III.5. Implication des protéines régulatrices de l'expression des gènes de la neurostéroïdogenèse dans l'hippocampe des rats âgés de 21 jours

Les mécanismes de signalisation intracellulaire dépendants de l'AMPc jouent un rôle prépondérant dans la régulation des gènes de la NSG, plus particulièrement les gènes *StAR* et *aromatase*. Dans le cervelet, nous avons montré que cette voie était altérée par la carence en donneurs de méthyles. Dans l'hippocampe, les variations observées suggèrent un effet de la carence en donneurs de méthyles sur la phosphorylation des protéines plutôt que sur l'expression des gènes de la NSG. Nous avons donc entrepris l'étude de l'expression du facteur de transcription SF-1 et du récepteur LHR sur les fractions hippocampales des rats nouveaux-nés.

Analyse par immunohistochimie

Dans l'hippocampe, SF-1 est localisé dans la couche *stratum pyramidale* de la région CA1, tout comme LHR. Aucune différence d'immunoréactivité n'est observable entre les coupes issues des ratons femelles témoins et carencées (Figure 40 A et C) ainsi que dans le groupe des mâles (Figure 40 B et D).

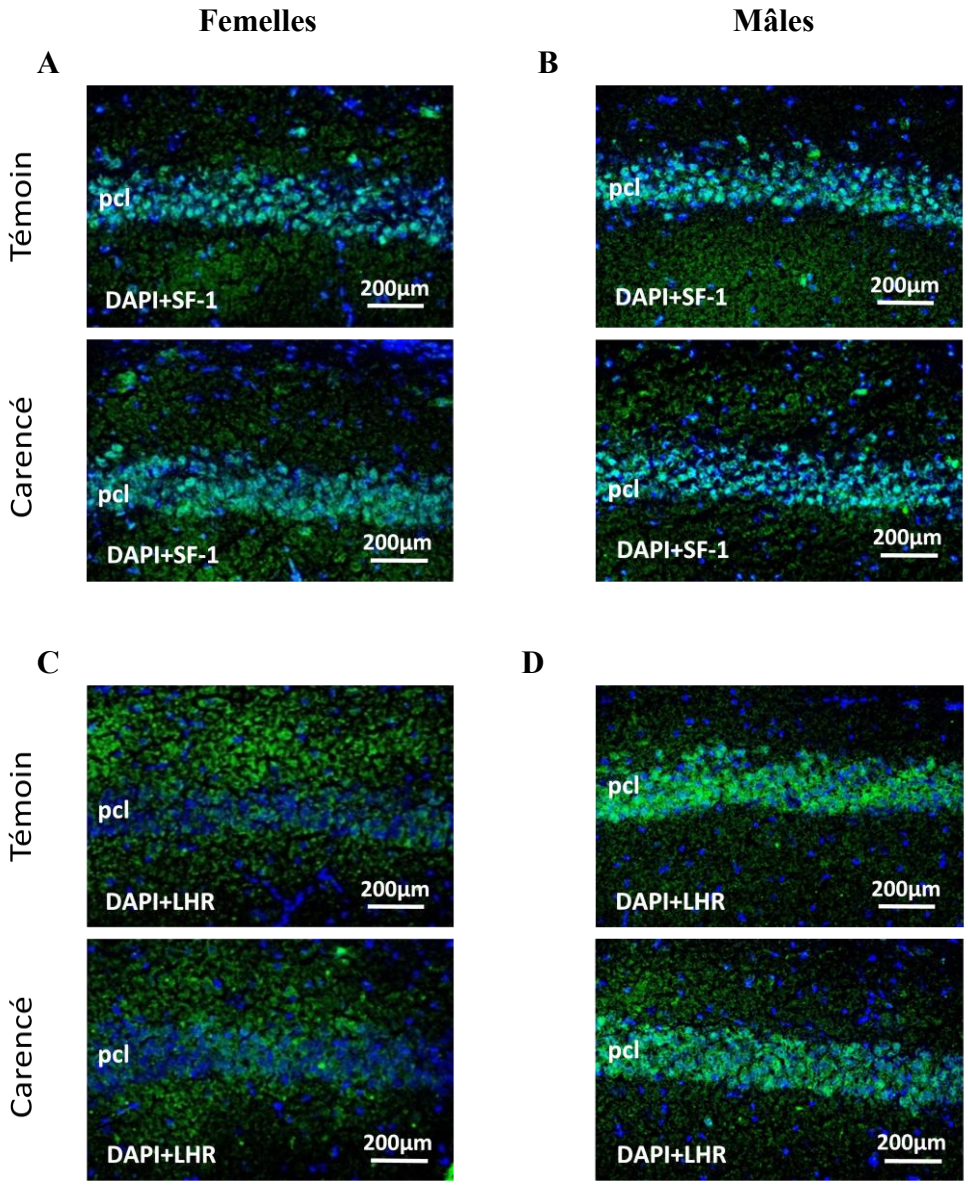


Figure 40: Marquage immunohistochimique de la protéine SF-1 et de LHR dans l'hippocampe des rats J21. Les images représentées ci-dessus sont prises dans la région CA1 de l'hippocampe des rats. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) tandis que la protéine SF-1 (**A** et **B**) et le récepteur LHR (**C** et **D**) sont marqués en vert. N = 5 par groupe. Grossissement X20. pcl: *pyramidal cell layer*. SF-1 : *steroidogenic factor-1*. LHR : *luteinizing hormone receptor*.

Analyse par western-blot

Le profil électrophorétique de la protéine SF-1 (55 kDa) et de LHR (80 kDa) obtenu à partir des échantillons de fractions protéiques de l'hippocampe des rats J21 est représenté figure 41 A et 41 C respectivement. L'analyse densitométrique montre que le régime carencé n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine SF-1 et LHR dans l'hippocampe des animaux quelque soit le sexe (Figure 41 B et D).

Ces observations confirment les analyses qualitatives obtenues par immunofluorescence sur des coupes cérébrales.

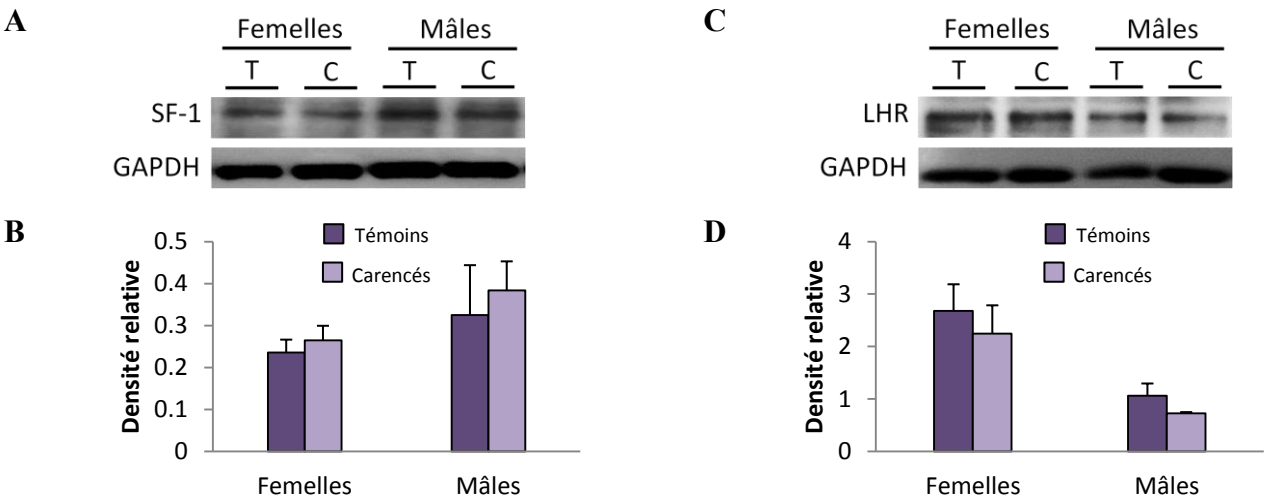


Figure 41: Analyse par western-blot de l'expression de la protéine SF-1 et de LHR dans l'hippocampe des rats J21. Immunodétection de la protéine SF-1 (**A**) et du récepteur LHR (**C**). Les différentes pistes contiennent les protéines extraites (30µg pour SF-1 et 50µg pour LHR) de l'hippocampe prélevées du cerveau des rats J21 témoins (T) et carencés (C). Comparaison semi-quantitative de l'expression de la protéine SF-1 (**B**) et LHR (**D**) normalisée à celle de la GAPDH.
Moyennes ± écart-types. Test ANOVA, **p*<0,05, N = 5. SF-1 : *steroidogenic factor-1*. LHR : *luteinizing hormone receptor*.

Analyse par RT-qPCR

Le niveau d'expression relative de SF-1 a été mesuré dans l'hippocampe prélevés à partir des cerveaux des ratons J21 témoins et carencés.

Le régime carencé n'a pas d'effet sur l'expression du gène SF-1 dans l'hippocampe des animaux par rapport au régime normal (Figure 42). Ces résultats sont en adéquation avec les analyses semi-quantitatives par western-blot dans les fractions protéiques préparées à partir de l'hippocampe.

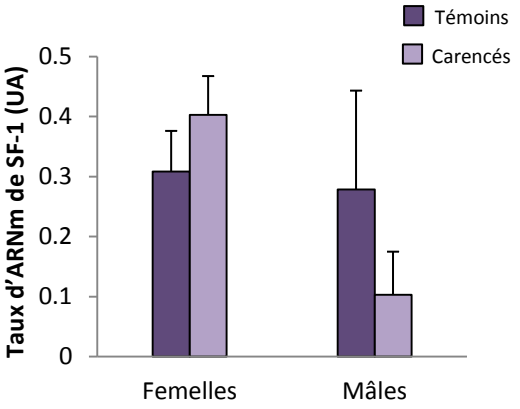


Figure 42: Analyse par RT-qPCR du taux d'ARNm de SF-1 dans l'hippocampe des rats J21. Les données ci-dessus représentent la moyenne (N = 5) du taux d'ARNm de SF-1 exprimée en unité arbitraire (UA) dans l'hippocampe des rats J21. Les valeurs sont normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour l'ARNm de la polymérase II. Les histogrammes représentent les moyennes et les écartypes. Chaque échantillon a été testé en duplicat et les moyennes ont été comparées par ANOVA. SF-1 : *steroidogenic factor-1*.

III.6. Conclusion

Dans l'hippocampe, la carence gestationnelle entraîne une accumulation d'HCY, une diminution du ratio SAM/SAH, tout comme dans les BO ou le cervelet. Cependant, concernant son impact sur la NSG, seul le taux de protéine StAR, TSPO et de l'aromatase était diminué, alors que le niveau d'expression des gènes mesuré par RT-qPCR ne varie pas. De plus, l'absence de variation de l'expression du facteur de transcription SF-1 et de LHR va dans le sens d'une régulation post-traductionnelle dans la réponse à la carence en donneurs de méthyles, spécifiquement dans l'hippocampe.

DISCUSSION

La période post-natale constitue une étape déterminante dans le développement cérébral, étant donné que la neurogenèse de l'hippocampe et du cervelet s'achève autour de la troisième semaine post-natale (Kim *et coll*., 2002), ce qui coïncide avec l'âge des ratons (21 jours) étudiés dans notre modèle animal.

L'interaction entre une carence en donneurs de groupements méthyles et la NSG est très peu documentée dans la littérature. Au laboratoire, la carence gestationnelle provoque chez les rats âgés de 21 jours une altération de la neurogenèse et de la plasticité synaptique (Daval *et coll*., 2009). Ces altérations sont associées aux troubles cognitifs et moteurs ainsi qu'à un retard de croissance. D'autres études font état d'une diminution de la neurogenèse dans le cerveau de fœtus de souris exposées à un régime alimentaire maternel déficient en folates (Craciunescu *et coll.*, 2004). Les neurostéroïdes synthétisés *de novo* dans le cerveau jouent un rôle critique dans la neurogenèse au cours du développement ainsi que dans la plasticité synaptique et la neuroprotection à l'âge adulte (Hojo *et coll.*, 2008). Durant la période post-natale, on assiste à une forte production de neurostéroïdes, indispensables à l'activité de neurogenèse intense dans les BO, l'hippocampe et le cervelet des rats (Kim *et coll.*, 2002 ; Fan *et coll.,* 2010).

Les résultats issus de ce travail constituent une première démonstration des effets délétères d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur la NSG en période post-natale, notamment chez les femelles âgées de 21 jours. Ceci s'est traduit par une altération de l'expression des protéines clés de la NSG (StAR, TSPO, aromatase), des récepteurs aux estrogènes et LHR, conduisant à une diminution de la concentration en estradiol dans les régions cérébrales étudiées. Dans le cervelet, nous avons pu montrer qu'elle était associée à un effondrement de la cascade de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMPc. Le facteur de transcription SF-1, jouant un rôle central dans la régulation de la synthèse des stéroïdes dans l'organisme, a été localisé pour une première fois dans des régions cérébrales autres que l'hypothalamus, son expression étant également affectée par la carence précoce en donneurs de méthyles.

Comme dans les études antérieures menées au laboratoire, la carence gestationnelle en donneurs de méthyles s'est traduite par une réduction des concentrations tissulaires en vitamines B9 et B12 s'ajoutant à l'hyperhomocystéinémie classiquement mesurée (Blaise *et coll.,* 2009). L'accumulation tissulaire d'HCY, révélée par son immunoréactivité intense dans les cellules granulaires des BO, les cellules de *Purkinje* du cervelet et la région CA1 de l'hippocampe, a spécifiquement été observée dans les cerveaux des femelles carencées.

En ce qui concerne les déterminants classiques du métabolisme de l'HCY précédemment déterminés dans des homogénats de cerveau total (Blaise *et coll.,* 2007a), l'augmentation de la concentration en SAH seule et la diminution consécutive de l'index de méthylation SAM/SAH ont été confirmées, mais uniquement dans les échantillons cérébraux prélevés chez les jeunes femelles. L'abaissement du ratio SAM/SAH affecte la régulation épigénétique. La diminution du taux de méthylation global de l'ADN qui en résulte et que nous avons quantifiée dans les BO, est en accord avec d'autres mesures réalisées par ailleurs au laboratoire dans le modèle animal de carence gestationnelle en folates, notamment au stade embryonnaire ou dans le cervelet, pour lequel nous avions effectué quelques essais préliminaires. Aussi, le taux de méthylation global de l'ADN de cellules hippocampales cultivées dans un milieu carencé en vit B9, est également abaissé (Kerek *et coll.,* 2013).
Dans le contexte de la synthèse des stéroïdes, plusieurs auteurs ont reporté que la régulation épigénétique des gènes de la stéroïdogenèse est principalement reliée au facteur de transcription SF-1, régulateur transcriptionnel majeur des gènes *StAR* et *aromatase* (Manna et coll., 2003). SF-1 est fortement impliqué dans le développement des fonctions endocrines mais aussi dans le comportement sexuel des femelles ainsi que la régulation de la balance énergétique de l'organisme (Parker *et coll.,* 2002 ; Kim *et coll.,* 2011). Dans le cerveau, il est habituellement décrit dans le VMH à l'exception d'une seule publication apparue au cours de la dernière décennie rapportant son expression dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Wehrenberg et coll., 2001). Ici, nous rapportons pour la première fois l'expression de SF-1 dans les BO et le cervelet, ce qui suggère que ce régulateur transcriptionnel exerce des fonctions autres que celles décrites précédemment, en intervenant localement dans la régulation de la NSG au cours du développement post-natal du cerveau. Enfin, les niveaux d'expression plus faibles mesurés dans ces régions cérébrales chez les animaux carencés pourraient expliquer la diminution consécutive de StAR et de l'aromatase, ce qui va dans le sens de l'altération de la stéroïdogenèse associée à une baisse de l'expression de SF-1, récemment décrite dans les cortico-surrénales de souris (Frigeri *et coll.,* 2000).

Dans le cervelet, l'expression diminuée de StAR, assurant l'étape clé de transfert de cholestérol à travers les membranes mitochondriales, est particulièrement déterminante pour la synthèse de PREG ainsi que le contrôle de leur expression *via* le LHR. Les concentrations tissulaires en PREG et le taux de LHR étaient fortement réduits dans le cervelet des femelles âgées de 21 jours chez lesquelles l'immunodétection de LHR était sensiblement réduite dans les cellules de *Purkinje*. La PREG-S, présente en concentration importante dans le cervelet en

développement, intervient dans la libération de glutamate au niveau des synapses entre les cellules de *Purkinje* et les fibres grimpantes (Zamudio-Bulcock et Valenzuela, 2011). L'expression de TSPO, co-localisée avec StAR dans les membranes mitochondriales, était également affectée. Selon Batarseh et Papadopoulos (2010), ce co-transporteur est réduit par une accumulation excessive de radicaux libres, connus pour leur effet perturbateur sur la membrane mitochondriale liée à un défaut de transfert du cholestérol. Or, ceci est en accord avec nos observations faites sur les cellules de *Purkinje* de nos animaux carencés, dans lesquelles nous avons décrit une forte accumulation d'HCY qui, rappelons-le, est un puissant neurotoxique par son effet pro-apoptotique mais aussi pro-oxydant.

Cette altération de l'étape limitante de la NSG est associée à une réduction du taux de cholestérol. Le cerveau possède ses propres mécanismes de régulation de l'homéostasie du cholestérol (Pfrieger et Ungerer, 2011). De plus, selon une étude récente, la régulation de l'expression de LHR semble étroitement corrélée à celle de la voie métabolique de biosynthèse du cholestérol, ce qui pourrait justifier les taux abaissés de cholestérol dans les extraits de tissus cérébelleux (Menon *et coll.,* 2010).

Concernant l'étape limitante de conversion des androgènes en estradiol, les contenus en aromatase et en estradiol étaient considérablement réduits dans les cellules de *Purkinje*, ce qui pourrait compromettre fortement la construction des circuits neuronaux ainsi que la maturation sexuelle des jeunes femelles carencées. Les taux de testostérone plus élevés dans les extraits de cervelet des mâles témoins sont en accord avec la littérature puisqu'elle est décrite comme étant dépendante du sexe (Pesaresi *et coll.,* 2010). Le taux de testostérone n'a pas été altéré chez les femelles carencées, suggérant que la carence en donneurs de méthyles affecte spécifiquement l'étape enzymatique catalysée par l'aromatase et non pas le substrat, avec pour conséquence une diminution de la synthèse de l'estradiol.

Au cours du développement, l'estradiol produit agit directement sur la densité et les connections synaptiques des épines dendritiques des cellules cérébelleuses, *via* les récepteurs ERα et ERβ pour lesquels nous avons également mesuré une diminution du taux de protéines. Les récepteurs aux estrogènes restent exprimés à l'âge adulte et interviennent dans les fonctions non-reproductives. Ils apparaissent en premier lieu dans l'appareil de Golgi des neurones de la couche granulaire du cervelet, puis dans les cellules de *Purkinje* vers la troisième semaine post-natale à l'issue de laquelle on les retrouve dans les cellules en corbeille de la couche moléculaire. Au cours du développement, ERα est exprimé en continu participant à la différenciation des cellules de *Purkinje*, la croissance dendritique ainsi que la formation des synapses (Guo *et coll.,* 2001).

Selon notre hypothèse, l'ensemble de ces altérations pourraient expliquer les performances locomotrices réduites chez les animaux carencés décrites précédemment, la neurogenèse dans le cervelet en cours de développement étant compromise (Blaise *et coll.,* 2007a).

L'étude de la voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMPc associée à l'activation du récepteur LHR, nous a permis de comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'altération de la NSG consécutive à une carence en donneurs de groupements méthyles. La diminution de l'expression du récepteur LHR ainsi que le niveau d'accroissement de l'AMPc plus faible par rapport aux mâles carencés montre que l'activation de la NSG est moins efficace chez les femelles carencées. La diminution de l'expression de la protéine phospho-PKC ainsi que l'augmentation de l'expression de la phosphatase PP2A dans le cervelet des femelles déficientes montre que l'activation de la NSG *via* le mécanisme de la phosphorylation peut être affectée. Aussi, nous avons mesuré une diminution de l'expression des facteurs de transcription SF-1, CREB et phopho-CREB qui régulent les principaux gènes de la stéroïdogenèse (Manna *et coll.,* 2003). Pour rappel, les modifications épigénétiques des gènes de la stéroïdogenèse sont principalement médiées par SF-1, d'où son intérêt dans cette étude.

Divers mécanismes de régulation de l'expression de SF-1 lui-même ont été décrits dans les gonades et les glandes surrénales, comme la méthylation, l'acétylation, les réactions de sumoylation et de phosphorylation. Nous avons entrepris des études menées parallèlement à ce travail portant sur les réactions de méthylation des îlots CpG du promoteur SF-1. En effet, comme évoqué plus haut, des mesures effectuées sur quelques extraits de cervelets issus de femelles carencées avaient suggéré une baisse du taux de méthylation de l'ADN global. Nous avons analysé l'état de méthylation de l'ADN de 26 dinucléotides CpG dans un fragment de 286 pb situé à – 61pb de l'ATG et de 26 dinucléotides CpG dans un autre fragment de 295 pb comprenant l'intron 1, l'exon 1 et le fragment de 61pb situé en amont de l'ATG dans le cervelet des rats de 21 jours témoins et carencés. Le séquençage après bisulfitation n'a révélé aucune différence de méthylation des dinucléotides CpG entre les animaux témoins et carencés, quelque soit le sexe. L'ensemble de ces observations vont dans le sens d'un effet de la carence plutôt sur les réactions de phosphorylation que celles de méthylation, ce qui est en accord avec certains auteurs ayant reporté un effet plutôt moindre de la méthylation sur la régulation de l'expression de SF1 (Lalli *et coll.,* 2013).

Dans l'hippocampe, les protéines StAR, TSPO et aromatase sont également affectées par la carence chez les femelles à J21, mais contrairement au cervelet et aux BO, cette altération ne concerne que les taux de protéines, les niveaux d'expression des ARNm n'étant pas modifiés. Ceci suggère des modifications au niveau post-traductionnel pour ces protéines. Dans le cas de StAR, les diminutions de taux de PKA associées à l'accroissement de la phosphatase PP2A vont dans ce sens, puisque StAR exerce son activité de transfert de cholestérol à travers les membranes mitochondriales sous forme phosphorylée, qui correspond à sa forme active.
La diminution de l'expression de ERα dans la région CA1 de l'hippocampe des femelles carencées pourrait affecter la neurogenèse et la plasticité synaptique se manifestant par les altérations des performances cognitives reportées précédemment pour ces animaux (Blaise *et coll.,* 2007a).
Enfin, les taux d'ARNm de SF-1 et de LHR de l'hippocampe ne semblent pas affectés par la carence, quelque soit le sexe. Ceci est en adéquation avec les observations concernant l'expression de StAR et de l'aromatase, suggérant une absence d'effet de la carence en donneurs de méthyles au niveau transcriptionnel, spécifiquement dans l'hippocampe. Quoi qu'il en soit, ces différences reflètent le caractère régio-sélectif dans la réponse à cette carence.

Les résultats obtenus pour les BO sont particulièrement significatifs puisqu'ils nous ont permis de montrer des altérations fonctionnelles, comportementales, reliées aux dommages tissulaires consécutifs à la carence chez les ratons de sexe femelle. De plus, ces observations vont dans le sens de notre hypothèse émise au départ selon laquelle l'altération de la NSG dans les BO pourrait contribuer au retard de croissance associé au poids corporel réduit des animaux carencés.
L'accumulation d'HCY dans les cellulaires granulaires des BO s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose et une diminution drastique de la prolifération cellulaire, comme décrit précédemment dans d'autres régions cérébrales de neurogenèse (Daval *et coll.,* 2009).
Comme dans le cervelet et l'hippocampe, la période post-natale se caractérise par une contribution essentielle des estrogènes dans la neurogenèse et, plus spécifiquement dans le cas des BO, dans le contrôle de la survie des neurones nouvellement formés (Brock *et coll*., 2010 ; Veyrac et Bakker, 2011). Ici, nous avons pu montrer que la carence affectait les étapes clés de la NSG dans les BO des femelles à J21, en diminuant les niveaux d'expression de StAR, TSPO, l'aromatase ainsi que des récepteurs aux estrogènes. La réduction du contenu en

estradiol des cellules de la couche glomérulaire des BO apparaît comme une conséquence de ces effets délétères. Aussi, l'expression du facteur de transcription SF-1, nouvellement décrit dans les BO, est également diminuée.

Grâce aux études comportementales, nous avons pu montrer que l'altération de la NSG est associée à une diminution des performances olfactives des femelles carencées. Le test de *Homing* évalue la reconnaissance de l'odeur de la litière provenant de la cage d'élevage en se basant à la fois sur les capacités locomotrices et la mémoire olfactive. Au cours de la troisième semaine post-natale, la reconnaissance olfactive était altérée quelque soit le sexe, celle-ci étant plus marquée chez les femelles déficientes. Ces observations sont en accord avec la réduction de la masse corporelle qui était significativement plus marquée chez les femelles, ce qui laisse supposer un impact sur le temps mis pour parcourir le labyrinthe. Le second test effectué a permis de mettre en évidence une diminution significative de la discrimination olfactive uniquement chez les femelles. Or, une perte de discrimination olfactive est spécifique de dommages atteignant les tissus olfactifs (Buron *et coll.,* 2009 ; Zou *et coll.,* 2012). L'apprentissage de l'odeur maternelle est essentiel en période post-natale mais aussi à l'âge adulte. En effet, des études cliniques ont montré une diminution de la sensibilité olfactive s'accompagnant d'une réduction du volume des BO chez les patients dépressifs (Negoias *et coll.,* 2010).

Quelque soit la région cérébrale, les effets délétères consécutifs à la carence gestationnelle en donneurs de méthyles concernaient principalement les femelles, ce qui suggère un dimorphisme sexuel. Cette différence de réponse en fonction du sexe apparaît non seulement dans les conséquences sur la voie de synthèse des neurostéroïdes, mais également dans le métabolisme de l'HCY avec une diminution du ratio SAM/SAH spécifiquement mesurée chez les femelles. Le métabolisme des folates est étroitement lié à celui de la choline : des études récentes ont montré que la carence en folates affecte le métabolisme de la choline d'une manière sexe-dépendante, se traduisant par une synthèse moindre de phosphatidylcholine et une accélération de sa dégradation chez les souris femelles adultes (Chew *et coll.,* 2011). Or, la phosphatidylcholine appartient au groupe des phospholipides, qui sont également impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de SF-1 en se fixant sur un domaine de liaison d'un ligand situé sur le promoteur du gène (Sablin *et coll.,* 2009). Ceci est en accord avec l'activité réduite de SF-1 mesurée chez les femelles déficientes. Aussi, le métabolisme de la phosphatidylcholine implique la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase

(PEMT) qui utilise la SAM comme donneur de méthyles. Par ailleurs, il a été démontré que l'expression de PEMT est induite par l'estrogène (Resseguie *et coll.,* 2007). L'abaissement du contenu en estradiol que nous avons observé dans les cellules de *Purkinje* des femelles déficientes de notre modèle animal pourrait donc contribuer le métabolisme de la phosphatidylcholine.

Selon la littérature, le dimorphisme sexuel ne concerne pas la concentration en neurostéroïdes et la présence de récepteurs dans le cervelet durant le développement, mais il se manifeste à l'issue d'une agression du tissu cérébral ou de mutations génétiques (Dean et McCarthy, 2008). De plus, l'exposition à des agents toxiques affecte le développement neuronal, la coordination motrice et le comportement, en relation avec des modifications sexe-dépendantes de l'expression des protéines du tissus cérébelleux (Nguon *et coll.*, 2005). Aussi, Ces variations dimorphiques pourraient expliquer la différence des risques liés au sexe pour certains désordres neuropsychologiques à l'âge adulte, comme la dépression, l'autisme ou encore la shizophrénie. En accord avec nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une carence précoce en donneurs de méthyles représente une agression du tissu cérébelleux ainsi que des autres régions cérébrales.

Aussi, l'effet de l'estradiol dépend de plusieurs facteurs, et plus particulièrement de l'espèce et du genre (Barker *et coll.,* 2008). Dans le cas particulier des BO, Wu *et coll* (2011) ont reporté un effet dimorphique des estrogènes sur le développement des épines dendritiques des cellules granulaires en culture primaire, issues de cerveaux de rats femelles (Wu *et coll.,* 2011). Quant aux fonctions olfactives, une étude antérieure a montré que la manipulation répétée des rats en période post-natale avait pour conséquence une perte de la préférence pour l'odeur maternelle spécifiquement chez les femelles (Raineki *et coll.,* 2009). Selon Bian et coll (2011), ces variations dimorphiques seraient reliées aux mécanismes moléculaires dépendants des stéroïdes et médiés par les récepteurs nucléaires et les co-activateurs, présents à des concentrations élevées dans les BO de manière sexe-dépendante, pour promouvoir la régulation des aptitudes comportementales et du développement cérébral.

Les résultats observés chez les ratons mâles en situation carence suggèrent une absence d'altération de la NSG dans les 3 régions cérébrales étudiées. De plus, dans le cervelet, nous avons mesuré une augmentation de taux de l'AMPc ainsi que de l'expression de phospho-PKC, de CREB et sa forme phosphorylée, par rapport aux témoins du même sexe. A l'inverse, les taux de PP2A étaient moins élevés. Ceci pourrait correspondre à une activation de la NSG

en réponse à une carence en donneurs de méthyles suggérant un effet protecteur. Ceci est conforté par d'autres expériences que nous avons réalisées en parallèle (non décrites dans ce travail), portant sur une protéine du stress du réticulum endoplasmique, la protéine HuR, dont le changement de localisation cellulaire a été mis en évidence au laboratoire dans une lignée de cellules dopaminergiques en culture, soumises à une carence en vit B12 (résultats non publiés). Par analyse western blot, nous avons mesuré une augmentation significative de son niveau d'expression dans les différentes régions cérébrales de ratons mâles issus de mères carencées, par rapport aux témoins. A l'inverse, dans le cas des femelles, les taux de protéine HuR étaient abaissés, notamment dans le cervelet et les BO. Ceci permet de confirmer l'apparition d'un stress cellulaire pouvant résulter de l'effet neurotoxique de l'HCY qui s'accumule dans le tissu cérébral des femelles carencées.

Enfin, un projet démarré récemment dans l'équipe porte sur les conséquences de la carence précoce en donneurs de méthyles sur la régulation de miARNs, connus pour réguler les hormones stéroïdiennes et les récepteurs aux estrogènes au cours du développement cérébral. Les premiers essais effectués montrent que l'expression de certains de ces miARNs tend à s'accroître dans le cerveau des mâles carencés par rapport aux témoins. De plus, la réponse semble varier en fonction de la région cérébrale étudiée.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Ce travail a permis de montrer qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles entraîne une altération de la NSG dans les différentes régions cérébrales qui se caractérisent par une neurogenèse particulièrement active au cours du développement post-natal. Cette réponse à la carence se fait selon un dimorphisme sexuel, puisque seules les femelles âgées de 21 jours étaient affectées. Ces effets délétères seraient associés aux troubles cognitifs et moteurs décrits précédemment dans ce modèle animal, auxquels s'ajoute une perte des fonctions olfactives, entraînant des troubles de l'alimentation, expliquant le retard de croissance et poids diminué des jeunes femelles.

L'impact de la carence en donneurs de méthyles sur la synthèse des stéroïdes cérébraux nouvellement décrite est en accord avec quelques études antérieures ayant rapporté une association entre le métabolisme des folates et la synthèse des stéroïdes dans les gonades. En effet, la carence gestationnelle en acide folique affecte la fertilité et la réponse folliculaire chez les femmes sous stimulation ovarienne, en association avec une diminution du taux d'estradiol circulant (Twigt *et coll.,* 2011). Selon les auteurs, elle serait la conséquence d'une altération de la méthylation de l'ADN du gène de l'aromatase, ce qui est en adéquation avec la dimlinution du taux de méthylation de l'ADN global que nous avons mesuée dans certaines régions cérébrales. Aussi, rappelons que le NADPH est le principal cofacteur de la ferredoxine réductase et de la cytochrome P450 oxydo-réductase, qui sont les donneurs d'électrons des formes mitochondriales et microsomales des cytochromes P450 de la voie de synthèse des stéroïdes (Miller, 2005). L'altération du métabolisme des folates pourrait résulter en une diminution du contenu en NADPH dans le tissu cérébral. Les niveaux faibles de NAD reportés par Henning et coll. (1997). Mis à part ces quelques données, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des interactions entre le métabolisme des folates et la NSG restent à étudier.

Le caractère régio-sélectif dans la réponse à la carence mérite d'être étudié. De ce fait, il serait intéressant de savoir si les effets délétères de la carence sont associés à des modifications transcriptionnelles ou post-transcriptionnelles.

Contrairement au cervelet et aux BO, la carence affecte seulement le taux des protéines dans l'hippocampe. Il a été montré très récemment au laboratoire, que la carence en donneurs de méthyles conduit des altérations post-traductionnelles de certaines protéines en montrant un déséquilibre de la balance méthylation/acétylation de PGC1α dans les cellules du myocarde (Garcia *et coll.,* 2011 ; Pooya *et coll.,* 2012). L'accumulation d'HCY consécutive à une carence en donneurs de méthyles, résulte en une diminution de synthèse de SAM. Or, celle-ci

est impliquée dans l'activation du co-activateur transcriptionnele PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ co-activator-1*), pour interagir avec les récepteurs PPARα (*peroxisome proliferator-activated receptor-α*) et PPARγ. Cette activation de PGC-1α s'effectue grâce aux réactions de méthylation *via* la protéine arginine méthyltransférase PRMT1, et de la déacétylation par Sirtuin-1 (SIRT1), déacétylase nécessitant NAD+ comme co-facteur. Or, SIRT1 est un important régulateur métabolique dont l'effet neuroprotecteur a également été décrit. Elle est retrouvée en abondance dans le VMH, où elle interagit avec le facteur de transcription SF-1 pour réguler la balance métabolique liée à l'alimentation. En effet, des souris surexprimant SIRT-1 dans les neurones à SF-1 sont plus résistantes à l'obésité et à l'insulinorésistance, en augmentant la consommation d'énergie et la sensibilité des muscles squelettiques à l'insuline (Ramadori *et coll.,* 2011). Ces observations ouvrent de nouvelles perspectives dans le cadre de notre travail, en relation avec la diminution de l'expression de SF-1 que nous avons démontrée chez les animaux carencés en donneurs de méthyles, celle-ci ayant été confirmée dans les extraits d'hypothalamus des jeunes ratons (résultats non décrits dans ce travail). En accord avec le rôle joué par SIRT1 dans les mécanismes de « *fetal programming* », ainsi que celui des estrogènes dans le contrôle de l'activité des neurones hypothalamiques (Roepke, 2009), il serait intéressant d'étudier l'impact de la carence précoce en donneurs de méthyles sur la régulation de SIRT1 et SF-1 ainsi que les conséquences métaboliques comme le diabète de type 2 ou l'insulinorésistance.

Un autre type de modification épigénétique affecté par la carence en folates concerne les microARNs (miARNs), qui sont de petits ARN non codants régulant de manière post-transcriptionnelle l'expression d'environ 50% de tous les gènes codant pour une protéine. De nombreuses données soulignent le rôle des miARNs au niveau du développement neuronal et de la maturation cérébrale. Des dérégulations de leur expression ont notamment été associées à une dégénérescence des cellules de *Pürkinje*, des altérations au niveau des fonctions de l'hippocampe ainsi qu'un risque accru de développer des pathologies neurodégénératives. Par exemple, miR-22 est un biomarqueur de la sclérose en plaques (Siegel *et coll.,* 2012) et régule plusieurs gènes candidats reliés aux troubles anxieux (Muiños-Gimeno *et coll.,* 2011). Une étude effectuée récemment au laboratoire a pu mettre en évidence une surexpression de miR-124 en réponse à une carence en folates dans une lignée de progéniteurs hippocampaux en culture (Kerek *et coll.,* 2013). D'autres miARNs comme miR-34a, sont impliqués dans la plasticité synaptique, le vieillissement cérébral et la neurodégénérescence (Liu *et coll.,* 2012), et ont ainsi été associés à plusieurs désordres affectifs et à la dépression (Serafini *et coll.,*

2012). Ces données récentes soulignent le rôle des miARNs au niveau du développement neuronal, de la maturation du cerveau et de la plasticité synaptique.

Les miARNs sont transcrits sous forme de longs précurseurs qui subissent plusieurs étapes de maturation dans le noyau et le cytoplasme pour arriver à la forme mature. Ils s'associent avec une complémentarité de séquences imparfaites avec un ARNm donné, conduisant à sa dégradation et/ou à l'inhibition de sa traduction (Fabian *et coll.,* 2010). Ainsi, de manière similaire aux gènes codant pour des protéines, il a été montré qu'une stimulation par les estrogènes pouvait moduler l'expression de plusieurs miARNs (Maillot *et coll.,* 2009). Une étude récente a également montré que ERα lié à l'estradiol interférait directement au niveau des étapes de maturation des miARNs (Yamagata *et coll.,* 2009). Enfin, une analyse de la région 3' non traduite de ERα montre la présence de sites de fixation de nombreux miARNs, suggérant que l'expression du récepteur est régulée par les miARNs, comme le montrent certaines données (Gupta *et coll.,* 2012).

L'objectif de ce projet, déjà démarré en parallèle dans l'équipe, vise à déterminer quels sont les miARNs affectés par la carence en folates dans l'hippocampe et le cervelet des ratons. Les miARNs reliés à la NSG seront sélectionnés et nous identifierons quels sont les mécanismes impliqués dans cette dérégulation et l'impact de l'altération de l'expression des miARNs sur leurs gènes cibles, en nous concentrant sur les gènes liés à la NSG intervenant dans le développement cérébral post-natal et la plasticité synaptique.

En accord avec l'hypothèse du « *fetal programming* » selon laquelle un stress *in utero* et en période post-natale est associé à des pathologies du SNC à l'âge adulte, nous vérifierons si cette altération de l'expression de miARNs évolue au cours de la vie des rats. Les effets au cours du vieillissement cérébral ou en réponse à des dommages cérébraux seront étudiés, notamment par rapport à l'induction de l'expression des gènes de la NSG en association avec les miRNAs affectés.

Rappelons que, dans les conditions physiologiques, les neurostéroïdes sont synthétisés dans le cerveau adulte pour assurer une production basale d'estrogènes dans le cerveau. Suite à une agression du tissu cérébral, qu'elle soit d'origine physique ou chimique (ischémie, agent toxique…), les astrocytes se transforment en cellules réactives dans lesquelles une activation de la NSG *via* une induction de l'expression de StAR et de l'aromatase permettant une augmentation de la production d'estrogènes afin qu'ils exercent leurs effets neuroprotecteurs (Garcia-Ovejero et coll., 2005). Certains auteurs ont pu montrer ces mécanismes sur des cellules en culture, dont Gatson et coll. (2010) qui décrivent une induction de l'expression de l'aromatase dans des cultures primaires d'astrocytes soumises à des pressions élevées.

L’ensemble de ces perspectives nécessitera des investigations complémentaires au modèle animal, plus particulièrement sur des modèles cellulaires. Les études sur astrocytes en culture primaire ou des lignées d’astrocytomes permettront une approche pharmacologique de l’étude des mécanismes impliqués dans les dérégulations des différentes protéines et facteurs de transcription de la NSG, en réponse à la carence en donneurs de méthyles. Quelques essais préliminaires effectués en parallèle, ont déjà permis de confirmer le caractère sexe-dépendant de la réponse d’astrocytes en culture primaire à une déficience en vitB9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agarwal AK, Auchus RJ. Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency. Endocrinology 2005; 146:2531-8.

Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Kerek R, Martin N, Pourié G, Koziel V, Helle D, Alberto JM, Ortiou S, Camadro JM, Léger T, Guéant JL, Daval JL. Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. FASEB. 2012; 26:3980-92

Algaidi SA, Christie LA, Jenkinson AM, Whalley L, Riedel G, Platt B. Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity. Exp Neurol. 2006; 197:8-21.

AL-Hader AA, Lei ZM, Rao CV. Neurons from fetal rat brains contain functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. Biol Reprod. 1997; 56:1071-6.

Alpert JE, Mischoulon D, Nierenberg AA, Fava M. Nutrition and depression: focus on folate. Nutrition. 2000; 16: 544-6.

Anello G, Gueant-Rodriguez RM, Bosco P, Gueant JL, Romano A, Namour B, Spada R, Caraci F, Pourié G, Daval JL, Ferri R. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease. Neuroreport. 2004; 15:859-61.

Apaja PM, Harju KT, Aatsinki JT, Petäjä-Repo UE, Rajaniemi HJ. Identification and structural characterization of the neuronal luteinizing hormone receptor associated with sensory systems. J Biol Chem. 2004; 279:1899-906.

Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF III. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. J Biol Chem. 1997; 272:32656-62.

Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. Endocr Rev. 2002; 23:141-74.

Baker BY, Epand RF, Epand RM, Miller WL. Cholesterol binding does not predict activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. J Biol Chem. 2007; 282:10223-32.

Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J. Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. Horm Behav. 2004; 46:1-10.

Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Ball GF. Calcium-dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. Eur J Neurosci. 2003; 17:1591-606.

Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA. Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. Neuron. 1994; 12:243-60.

Barker JM, Galea LA. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. Neuroscience. 2008; 152:888-902.

Batarseh A, Li J, Papadopoulos V. Protein kinase C epsilon regulation of translocator protein (18 kDa) Tspo gene expression is mediated through a MAPK pathway targeting STAT3 and c-Jun transcription factors. Biochemistry. 2010; 49:4766-78.

Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, Martinez-Fong D, Daval JL, Guéant JL. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:21930-5.

Behl C. Estrogen can protect neurons: modes of action. J Steroid Biochem Mol Biol. 2002; 83:195-7.

Belcher SM. Rapid signaling mechanisms of estrogens in the developing cerebellum. Brain Res Rev. 2008; 57:481-92.

Bezold G, Lange M, Peter RU. Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. N Engl J Med. 2001; 344:1172-3.

Bian C, Zhang D, Guo Q, Cai W, Zhang J. Localization and sex-difference of steroid receptor coactivator-1 immunoreactivities in the brain of adult female and male mice. Steroids. 2011; 76:269-79.

Blaise SA, Alberto JM, Audonnet-Blaise S, Guéant JL, Daval JL. Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007b; 293:E1492-E1502.

Blaise S, Alberto JM, Nédélec E, Ayav A, Pourié G, Bronowicki JP, Guéant JL, Daval JL. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. Pediatr Res. 2005; 57:777-82.

Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL. Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. Exp Neurol. 2009; 216:231-8.

Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. Am J Pathol. 2007a; 170:667-79.

Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G. Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. Clin Chem. 2001; 47:1102-04.

Bossenmeyer-Pourié C, Blaise S, Pourié G, Tomasetto C, Audonnet S, Ortiou S, Koziel V, Rio MC, Daval JL, Guéant JL, Beck B. Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. Am J Pathol. 2010; 176:270-7.

Botez MI, Young SN, Bachevalier J, Gauthier S. Effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindoleacetic acid in human cerebrospinal fluid. Ann Neurol. 1982; 12: 479-84.

Bottiglieri T, Laundy M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2000; 69:228-32.

Brock O, Keller M, Veyrac A, Douhard Q, Bakker J. Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. Neuroscience. 2010; 166:368-76.

Brouwer IA. Folic acid, folate and homocysteine: human intervention studies. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2000; 92:183-4.

Budefeld T, Tobet SA, Majdic G. Steroidogenic factor 1 and the central nervous system. J Neuroendocrinol. 2012; 24:225-35.

Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003; 86:219-24.

Buron G, Hacquemand R, Pourié G, Brand G. Carbon dioxide effects on olfactory functioning: behavioral, histological and immunohistochemical measurements. Toxicol Lett. 2009; 188:251-7.

Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD. Transient expression of neurofilament-like (RT97) immunoreactivity in cerebellar granule cells. Brain Res. 1986; 393:282-6.

Chang IY, Ohn T, Ko GS, Yoon Y, Kim JW, Yoon SP. Immunolocalization of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) domain-containing proteins in the developing cerebellum of normal and hypothyroid rats. J Chem Neuroanat. 2012; 43:28-33.

Chen SA, Besman MJ, Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Mohandas T, Hall PF, Shively JE. Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. DNA. 1988; 7:27-38.

Chen WY, Juan LJ, Chung BC. SF-1 (nuclear receptor 5A1) activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding. Mol Cell Biol. 2005; 25:10442-53.

Chen WY, Lee WC, Hsu NC, Huang F, Chung BC. SUMO modification of repression domains modulates function of nuclear receptor 5A1 (steroidogenic factor-1). J Biol Chem. 2004; 279:38730-5.

Chen Z, Schwahn BC, Wu Q, He X, Rozen R. Postnatal cerebellar defects in mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase. Int J Dev Neurosci. 2005; 23:465-74.

Chew TW, Jiang X, Yan J, Wang W, Lusa AL, Carrier BJ, West AA, Malysheva OV, Brenna JT, Gregory JF 3rd, Caudill MA. Folate intake, MTHFR genotype, and sex modulate choline metabolism in mice. J Nutr. 2011; 141:1475-81.

Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. Arch Neurol. 1998; 55:1449-55.

Colciago A, Celotti F, Pravettoni A, Mornati O, Martini L, Negri-Cesi P. Dimorphic expression of testosterone metabolizing enzymes in the hypothalamic area of developing rats. Brain Res Dev Brain Res. 2005; 155:107-16.

Corpéchot C, Robel P, Axelson M, Sjövall J, Baulieu EE. Characterization and measurement of diehydroepiandrosterone suflate in rat brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78:4704-7.

Cosenza-Nashat M, Zhao ML, Suh HS, Morgan J, Natividad R, Morgello S, Lee SC. Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. Neuropathol Appl Neurobiol. 2009; 35:306-28.

Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. J Nutr. 2004; 134:162-6.

Culty M, Li H, Boujrad N, Amri H, Vidic B, Bernassau JM, Reversat JL, Papadopoulos V. In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 1999; 69:123-30.

Daval JL, Blaise S, Guéant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:E1.

Dean SL, McCarthy MM. Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease. Cerebellum. 2008; 7:38-47.

De Jager CA, Oulhaj A, Jacoby R, Refsum H, Smith AD. Cognitive and clinical outcomes of homocysteine-lowering B-vitamin treatment in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. Int J Geriatr Psychiatry. 2012; 27:592-600.

De La Cruz JP, Pavía J, González-Correa JA, Ortiz P, Sánchez de la Cuesta F. Effects of chronic administration of S-adenosyl-L-methionine on brain oxidative stress in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000; 361:47-52.

Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell. 1999; 97:703-16.

Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Beaujean D, Leprince J, Tonon MC, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. J Neurochem. 2001; 76:128-38.

Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. J Neurochem. 2002; 80:101-10.

Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82:4258-65.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med. 1998; 4:1313-7.

Evans HE. The effect of inadequate vitamin B upon sexual physiology in the male. J Nutr. 1928; 1:1-21.

Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annu Rev Biochem. 2010; 79:351-79.

Fan X, Xu H, Warner M, Gustafsson JA. ERbeta in CNS: new roles in development and function. Prog Brain Res. 2010; 181:233-50.

Fekete K, Berti C, Trovato M, Lohner S, Dullemeijer C, Souverein OW, Cetin I, Decsi T. Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: a systematic review and meta-analysis on birth weight, placental weight and length of gestation. Nutr J. 2012; 11:75.

Flood JF, Morley JE, Roberts E. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:10806-10.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957; 226:497-509.

Forges T, Pellanda H, Diligent C, Monnier P, Guéant JL. [Do folates have an impact on fertility?]. Gynecol Obstet Fertil. 2008; 36:930-9.

Fowler B. The folate cycle and disease in humans. Kidney Int Suppl. 2001; 78:S221-9.

Frigeri C, Tsao J, Czerwinski W, Schimmer BP. Impaired steroidogenic factor 1 (NR5A1) activity in mutant Y1 mouse adrenocortical tumor cells. Mol Endocrinol. 2000; 14:535-44

Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, Ichikawa Y. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. J Neurochem. 1998; 71:2231-8.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000; 287:1433-8.

Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juillière Y, Malthiery Y, Guéant JL.

Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1α by PRMT1 and SIRT1. J Pathol. 2011; 225:324-35.

Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, Doncarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. Brain Res Brain Res Rev. 2005; 48:273-86.

Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. Prog Neurobiol. 2003; 71:31-41.

Gatson JW, Simpkins JW, Yi KD, Idris AH, Minei JP, Wigginton JG. Aromatase is increased in astrocytes in the presence of elevated pressure. Endocrinology. 2011; 152:207-13.

Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97:1823-8.

Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010; 118:197-202.

Giatzakis C, Papadopoulos V. Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus nonsteroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity. Endocrinology. 2004; 145:1113-23.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature. 1986; 320:134-9.

Griffin LD, Gong W, Verot L, Mellon SH. Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. Nat Med. 2004; 10:704-11.

Groenen PM, van Rooij IA, Peer PG, Gooskens RH, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Marginal maternal vitamin B12 status increases the risk of offspring with spina bifida. Am J Obstet Gynecol. 2004; 191:11-7.

Gubert F, Zaverucha-do-Valle C, Pimentel-Coelho PM, Mendez-Otero R, Santiago MF. Radial glia-like cells persist in the adult rat brain. Brain Res. 2009; 1258:43-52.

Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? Clin Chem Lab Med. 2003; 41:1473-7.

Guéant-Rodriguez RM, Juilliére Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E, Gueánt JL. 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. 2005; 94:510-5.

Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. BJOG. 2002; 109:784-91

Guo XZ, Su JD, Sun QW, Jiao BH. Expression of estrogen receptor (ER) -alpha and -beta transcripts in the neonatal and adult rat cerebral cortex, cerebellum, and olfactory bulb. Cell Res. 2001; 11:321-4

Gupta A, Caffrey E, Callagy G, Gupta S. Oestrogen-dependent regulation of miRNA biogenesis: many ways to skin the cat. Biochem Soc Trans. 2012; 40:752-8.

Hall CA. Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. Am J Hemat. 1990; 34:121-7.

Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Niemelä O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S, James SJ. Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99:10072-7.

Hammer F, Compagnone NA, Vigne JL, Bair SR, Mellon SH. Transcriptional regulation of P450scc gene expression in the embryonic rodent nervous system. Endocrinology. 2004; 145:901-12.

Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. Molecular Cell. 1999; 3:521-526.

Han Z, Slack RS, Li W, Papadopoulos V. Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression.J Recept Signal Transduct Res. 2003; 23:225-38.

Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T. Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease. J Neurosci Res. 2005; 80:869-76.

Haworth JC, Dilling LA, Surtees RA, Seargeant LE, Lue-Shing H, Cooper BA, Rosenblatt DS. Symptomatic and asymptomatic methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in two adult brothers. Am J Med Genet. 1993; 45:572-6.

Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT, Liao F. Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. Free Rad Biol Med. 1997; 23:936-42.

Higashi T, Yokoi H, Nagura Y, Nishio T, Shimada K. Studies on neurosteroids XXIV. Determination of neuroactive androgens, androsterone and 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol, in rat brain and serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr. 2008; 22:1434-41.

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; 14:32-42.

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P450 17α and P450 aromatase localized in neurons. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101:865-70.

Hojo Y, Murakami G, Mukai H, Higo S, Hatanaka Y, Ogiue-Ikeda M, Ishii H, Kimoto T, Kawato S. Estrogen synthesis in the brain - role in synaptic plasticity and memory. Mol cell endocrinol. 2008; 290:31-43.

Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. J Biol Chem. 1993; 268:7494-502.

Ikeda Y, Nagai A. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta during postnatal development of the rat cerebellum. Brain Res. 2006; 1083:39-49.

Iskandar BJ, Rizk E, Meier B, Hariharan N, Bottiglieri T, Finnell RH, Jarrard DF, Banerjee RV, Skene JH, Nelson A, Patel N, Gherasim C, Simon K, Cook TD, Hogan KJ. Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. J Clin Invest. 2010; 120:1603-16.

Jakab RL, Wong JK, Belcher SM. Estrogen receptor beta immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum. J Comp Neurol. 2001; 430:396-409.

Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. Clin Chem Lab Med. 2007; 45:1704-16.

James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrander JA. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. Am J Clin Nutr. 2004; 80:1611-7.

Jara-Prado A, Ortega-Vazquez A, Martinez-Ruano L, Rios C, Santamaria A. Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. Neurotox Res. 2003; 5:237-43.

Kato J, Yamada-Mouri N, Hirata S. Structure of aromatase mRNA in the rat brain. J Steroid Biochem Mol Biol. 1997; 61:381-5.

Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. Nat Neurosci. 2007; 10:355-62.

Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM. Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. Biol Reprod. 2005, 72:667-77.

Kerek R, Geoffroy A, Bison A, Martin N, Akchiche N, Pourié G, Helle D, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL. Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. Cell Death Dis. 2013; 4:e755.

Kim HJ, Park CH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. Changes of steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in postnatal rat development. Brain Res Dev Brain Res. 2002; 139:247-54.

Kim KW, Li S, Zhao H, Peng B, Tobet SA, Elmquist JK, Parker KL, Zhao L. CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. Mol Endocrinol. 2010; 24:1240-50.

Kim KW, Sohn JW, Kohno D, Xu Y, Williams K, Elmquist JK. SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis. Mol Cell Endocrinol. 2011; 336:219-23.

Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura H, Hojo Y, Takata N, Kawato S. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. Endocrinology. 2001; 142:3578-89.

King SR, Manna PR, Ishii T, Syapin PJ, Ginsberg SD, Wilson K, Walsh LP, Parker KL, Stocco DM, Smith RG, Lamb DJ. An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. J Neurosci. 2002; 22:10613-20.

Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. Q J Med. 1993; 86:703-8.

Kotomura N, Ninomiya Y, Umesono K, Niwa O. Transcriptional regulation by competition between ELP isoforms and nuclear receptors. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 230:407-12.

Kronenberg G, Colla M, Endres M. Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. Curr Mol Med. 2009; 9:315-23.

Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. J Neurosci. 2000; 20:6920-6.

Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP. 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. 2002; 22: 1752-62.

Kruman II, Mouton PR, Emokpae R Jr, Cutler RG, Mattson MP. Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. Neuroreport. 2005;16:1055-9.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93:5925-30.

Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. Mol Endocrinol. 1992; 6: 1249-58.

Lalli E, Doghman M, Latre de Late P, Wakil AE, Mus-Veteau I. Beyond steroidogenesis: novel target genes for SF-1 discovered by genomics. Mol Cell Endocrinol. 2013; 371:154-9.

Laraqui A, Allami A, Carrié A, Coiffard AS, Benkouka F, Benjouad A, Bendriss A, Kadiri N, Bennouar N, Benomar A, Guedira A, Raisonnier A, Fellati S, Srairi JE, Benomar M. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. Acta Cardiol. 2006; 61:51-61

Lavaque E, Mayen A, Azcoitia I, Tena-Sempere M, Garcia-Segura LM. Sex differences, developmental changes, response to injury and cAMP regulation of the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome p450scc, and aromatase in the olivocerebellar system. J Neurobiol. 2006a; 66:308-18.

Lavaque E, Sierra A, Azcoitia I, Garcia-Segura L. Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. Neuroscience 2006b; 138: 741-7

Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C. FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. Science. 1991; 252:848-51.

Lehmann M, Gottfries CG, Regland B. Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. Dement Geriatr Cogn Disord. 1999; 10:12-20.

Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. Endocrinology. 1993; 132:2262-70.

Leininger B, Ghersi-Egea JF, Siest G, Minn A. In vivo study of the elimination from rat brain of an intracerebrally formed xenobiotic metabolite, 1-naphthyl-beta-D-glucuronide. J Neurochem. 1991; 56:1163-8.

Leon M. Neuroethology of olfactory preference development. J Neurobiol. 1992; 23:1557-73.

Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate?. BMJ. 2005; 331:1053.

Li H, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/ interaction amino acid sequence and consensus pattern. Endocrinology. 1998; 139:4991-7.

Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004; 44:399-421.

Lin Y, Desbois A, Jiang S, Hou ST. Group B vitamins protect murine cerebellar granule cells from glutamate/NMDA toxicity. Neuroreport. 2004; 15:2241-4.

Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV, Arnelle DR, Stamler JS. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:5923-8.

Liu H, Huang GW, Zhang XM, Ren DL, X Wilson J. Folic Acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. J Clin Biochem Nutr. 2010; 47:174-80.

Liu J, Li XD, Vaheri A, Voutilainen R. DNA methylation affects cell proliferation, cortisol secretion and steroidogenic gene expression in human adrenocortical NCI-H295R cells. J Mol Endocrinol. 2004; 33:651-62.

Liu N, Landreh M, Cao K, Abe M, Hendriks GJ, Kennerdell JR, Zhu Y, Wang LS, Bonini NM. The microRNA miR-34 modulates ageing and neurodegeneration in Drosophila. Nature. 2012; 482:519-23.

Liu Q, Merkler KA, Zhang X, McLean MP. Prostaglandin F2alpha suppresses rat steroidogenic acute regulatory protein expression via induction of Yin Yang 1 protein and recruitment of histone deacetylase 1 protein. Endocrinology. 2007; 148:5209-19.

Liu T, Wimalasena J, Bowen RL, Atwood CS. Luteinizing hormone receptor mediates neuronal pregnenolone production via up-regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression. J Neurochem. 2007; 100:1329-39.

Liu XX, Wilson K, Charlton CG. Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. Life Sci. 2000; 66:2277-88.

Lledo PM, Saghatelyan A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. Trends Neurosci. 2005; 28:248-54.

Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. Neuron. 2002; 35:605-23.

Lövblad K, Ramelli G, Remonda L, Nirkko AC, Ozdoba C, Schroth G. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. Pediatr Radiol. 1997; 27:155-8.

Lowe TL, Cohen DJ, Miller S, Young G. Folic acid and B12 in autism and neuropsychiatric disturbances of childhood. J Am Acad Child Psychiatry. 1981; 20:104-11.

Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. Mol Genet Metab. 2000; 71:121-38.

Luo X, Ikeda Y, Schlosser DA, Parker KL. Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene. Mol Endocrinol. 1995; 9:1233-9.

MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD. Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. Mol Cell Neurosci. 1994; 5:691-8.

Maillot G, Lacroix-Triki M, Pierredon S, Gratadou L, Schmidt S, Bénès V, Roché H, Dalenc F, Auboeuf D, Millevoi S, Vagner S. Widespread estrogen-dependent repression of micrornas involved in breast tumor cell growth. Cancer Res. 2009; 69:8332-40.

Mameli M, Carta M, Partridge LD, Valenzuela CF. Neurosteroid-induced plasticity of immature synapses via retrograde modulation of presynaptic NMDA receptors. J Neurosci. 2005; 25:2285-94.

Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. Mol Hum Reprod. 2009;15:321-33.

Manna PR, Wang XJ, Stocco DM. Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. Steroids. 2003; 68:1125-34.

Marcoullis G, Gueant JL, Nicolas JP. Radioimmunoassay for assessing exocrine pancreatic insufficiency, based on the differential enzymatic degradation of cobalamin-binding proteins. Clin Chem. 1986; 32:453-60.

Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. Steroids. 2010; 75:467-76.

Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci. 2003; 26:137-46.

Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LA. Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. Neuroscience. 2006; 141:1793-800.

McClure RE, Barha CK, Galea LA. 17β-Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. Horm Behav. 2013; 63:144-57.

McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, and Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:3170-4.

McKay JA, Waltham KJ, Williams EA, Mathers JC. Folate depletion during pregnancy and lactation reduces genomic DNA methylation in murine adult offspring. Genes Nutr. 2011; 6:189-96.

Melse-Boonstra A. Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. Am J Clin Nutr. 2005; 81:1378-82.

Menon KM, Menon B, Wang L, Gulappa T, Harada M. Molecular regulation of gonadotropin receptor expression: relationship to sterol metabolism. Mol Cell Endocrinol. 2010; 329:26-32.

Midzak A, Rone M, Aghazadeh Y, Culty M, Papadopoulos V. Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. Mol Cell Endocrinol. 2011; 336:70-9

Miller WL. Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. Endocrinology. 2005; 146:2544-50.

Mizoguchi K, Kunishita T, Chui DH, Tabira T. Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. Neurosci Lett. 1992; 138:157-60.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron. 1994; 12:529-40.

Morris MS, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Epidemiol. 2000; 152:140-8.

Moyers S, Bailey LB. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. Nutr Rev. 2001; 59:215-24.

Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, Andria G, Boers GH, Bromberg IL, Cerone R, Fowler B, Grobe H, Schmidt H, Schweitzer L. The natural history of homocystinura due to cystathionine β -synthase deficiency. Am J Hum Genet. 1985; 37:1-31.

Muiños-Gimeno M, Espinosa-Parrilla Y, Guidi M, Kagerbauer B, Sipilä T, Maron E, Pettai K, Kananen L, Navinés R, Martín-Santos R, Gratacòs M, Metspalu A, Hovatta I, Estivill X. Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways. Biol Psychiatry. 2011; 69:526-33.

Negoias S, Croy I, Gerber J, Puschmann S, Petrowski K, Joraschky P, Hummel T. Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. Neuroscience. 2010; 169:415-21.

Nguon K, Ladd B, Baxter MG, Sajdel-Sulkowska EM. Sexual dimorphism in cerebellar structure, function, and response to environmental perturbations. Prog Brain Res. 2005; 148:341-51.

Nishio E, Watanabe Y. Homocysteine as a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: A possible role for hydrogen peroxide. Br J Pharmacol. 1997; 122:269-74.

Obeid R, Herrmann W. Homocysteine, folic acid and vitamin B12 in relation to pre- and postnatal health aspects. Clin Chem Lab Med. 2005; 43:1052-7.

Obeid R, Schlundt J, Umanskaya N, Herrmann W, Herrmann M. Folate is related to phosphorylated neurofilament-H and P-tau (Ser396) in rat brain. J Neurochem. 2011; 117:1047-54

Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. Endocrinology. 1991; 129:1481-8.

Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley NA, Stallings N, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. Recent Prog Horm Res. 2002; 57:19-36.

Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. Endocr Rev. 1997; 18:361-77.

Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, Williams AC. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. Neurotoxicology. 1998; 19:599-603.

Pesaresi M, Maschi O, Giatti S, Garcia-Segura LM, Donatella CarusoD, Melcangi RC. Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. Horm Behav. 2010; 57:46-55.

Pfrieger FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. Prog Lipid Res. 2011; 50: 357-71.

Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. Cancer Res. 1995; 55:1894-901.

Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Guéant JL. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1α hypomethylation and decreased ER-α, ERR-α, and HNF-4α in the rat liver. J Hepatol. 2012; 57:344-51.

Raineki C, De Souza MA, Szawka RE, Lutz ML, De Vasconcellos LF, Sanvitto GL, Izquierdo I, Bevilaqua LR, Cammarota M, Lucion AB. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. Neuroscience. 2009; 159:31-8.

Ramadori G, Fujikawa T, Anderson J, Berglund ED, Frazao R, Michán S, Vianna CR, Sinclair DA, Elias CF, Coppari R. SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. Cell Metab. 2011; 14:301-12.

Rao AM, Başkaya MK, Maley ME, Kindy MS, Dempsey RJ. Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on blood-brain barrier breakdown and neuronal survival after transient cerebral ischemia in gerbils. Brain Res Mol Brain Res. 1997; 44: 134-38.

Regland B, Johansson BV, Grenfeldt B, Hjelmgren LT, Medhus M. Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. J Neural Transm Gen Sect. 1995; 100:165-9.

Resseguie M, Song J, Niculescu MD, da Costa KA, Randall TA, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. FASEB J. 2007; 21:2622-32.

Reynolds EH, Preece JM, Bailey J, Coppen A. Folate deficiency in depressive illness. Br J Psychiatry. 1970; 117:287-92.

Riederer BM, Binder LI. Differential distribution of tau proteins in developing cat cerebellum. Brain Res Bull. 1994; 33:155-61.

Riederer BM, Moya F, Calvert R. Phosphorylated MAP1b, alias MAP5 and MAP1x, is involved in axonal growth and neuronal mitosis. Neuroreport. 1993; 4:771-4.

Rocca P, Beoni AM, Eva C, Ferrero P, Zanalda E, Ravizza L. Peripheral benzodiazepine receptor messenger RNA is decreased in lymphocytes of generalized anxiety disorder patients. Biol Psychiatry. 1998; 43:767-73.

Roepke TA. Oestrogen modulates hypothalamic control of energy homeostasis through multiple mechanisms. J Neuroendocrinol. 2009; 21:141-50.

Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. Biochim Biophys Acta. 2009; 1791: 646-58.

Rupprecht R, Rammes G, Eser D, Baghai TC, Schüle C, Nothdurfter C, Troxler T, Gentsch C, Kalkman HO, Chaperon F, Uzunov V, McAllister KH, Bertaina-Anglade V, La Rochelle CD, Tuerck D, Floesser A, Kiese B, Schumacher M, Landgraf R, Holsboer F, Kucher K. Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. Science. 2009; 325:490-3.

Sablin EP, Blind RD, Krylova IN, Ingraham JG, Cai F, Williams JD, Fletterick RJ, Ingraham HA. Structure of SF-1 bound by different phospholipids: evidence for regulatory ligands. Mol Endocrinol. 2009; 23:25-34.

Safi J, Joyeux L, Chalouhi GE. Periconceptional folate deficiency and implications in neural tube defects. J Pregnancy. 2012; 2012:295083.

Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H. Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein. J Biol Chem. 2002; 277:12915-20.

Sakamoto H, Ukena K, Takemori H, Okamoto M, Kawata M, Tsutsui K. Expression and localization of 25-Dx, a membrane-associated putative progesterone-binding protein, in the developing Purkinje cell. Neuroscience. 2004; 126:325-34.

Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. J Neurosci. 2001; 21:6221-32.

Sasahara K, Shikimi H, Haraguchi S, Sakamoto H, Honda S, Harada N, Tsutsui K. Mode of action and functional significance of estrogen-inducing dendritic growth, spinogenesis, and synaptogenesis in the developing Purkinje cell. J Neurosci. 2007; 27:7408-17.

Schade SG, Schilling RF. Effect of pepsin on the absorption of food vitamin B12 and iron. Am J Clin Nutr. 1967; 20:636-40.

Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tassone F, Hertz-Picciotto I. Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. Am J Clin Nutr. 2012; 96:80-9.

Scott JM. Folate-vitamin B_{12} interrelationships in the central nervous system. Proc Nutr Soc. 1992; 51:219-24.

Seetharam B, Bagur SS, Alpers DH. Isolation and characterization of proteolytically derived ileal receptor for intrinsic factor-cobalamin. J Biol Chem. 1982; 257:183-9.

Serafini G, Pompili M, Innamorati M, Giordano G, Montebovi F, Sher L, Dwivedi Y, Girardi P. The role of microRNAs in synaptic plasticity, major affective disorders and suicidal behavior. Neurosci Res. 2012; 73:179-90.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma Homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. N Engl J Med. 2002; 346:476-83.

Shibuya K, Takata N, Hojo Y, Furukawa A, Yasumatsu N, Kimoto T, Enami T, Suzuki K, Tanabe N, Ishii H, Mukai H, Takahashi T, Hattori TA, Kawato S. Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. Biochimica Biophysica Acta-General Subjects. 2003; 1619:301-16.

Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: an evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. Am J Hum Genet. 1999; 64,1045–55.

Shimozawa O, Sakaguchi M, Ogawa H, Harada N, Mihara K, Omura T. Core glycosylation of cytochrome P-450(arom). Evidence for localization of N terminus of microsomal cytochrome P-450 in the lumen. J Biol Chem. 1993; 268:21399-402.

Shivapurkar N, Poirier LA. Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks. Carcinogenesis. 1983; 4:1051-7.

Siegel SR, Mackenzie J, Chaplin G, Jablonski NG, Griffiths L. Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis. Mol Biol Rep. 2012; 39:6219-25.

Sierra A, Lavaque E, Perez-Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia- Segura LM. Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. Eur J Neurosci. 2003; 18:1458-67.

Sierra A. Neurosteroids: the StAR protein in the brain. J Neuroendocrinol. 2004; 16:787-93.

Smith MT, Pencea V, Wang Z, Luskin MB, Insel TR. Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. Horm Behav. 2001; 39:11-21.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985; 150:76-85.

Smith SS, Waterhouse BD, Woodward DJ. Locally applied estrogens potentiate glutamate-evoked excitation of cerebellar Purkinje cells. Brain Res. 1988; 475:272-82.

Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ. Vitamin dificiencies and neural tube defects. Arch Dis Child. 1976; 51:944-50.

Spencer-Segal JL, Tsuda MC, Mattei L, Waters EM, Romeo RD, Milner TA, McEwen BS, Ogawa S. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. Neuroscience. 2012; 202:131-46.

Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to coppercatalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. J Clin Invest. 1986; 77:1370-6.

Steegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK. Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? Metabolism. 1994; 43:1475-80.

Stella G, Spada RS, Calabrese S, Bosco P, Anello G, Guéant-Rodriguez RM, Romano A, Benamghar L, Proto C, Castellano A, Fajardo A, Lipari L, Sirna S, Guéant JL. Association of thyroid dysfunction with vitamin B12, folate and plasma homocysteine levels in the elderly: a population-based study in Sicily. Clin Chem Lab Med. 2007; 45:143-7

Stocco C. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. Steroids. 2008; 73:473-87.

Stover PJ. Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011; 4:293-305.

Strauss JF, Kishida T, Christenson LK, Fujimoto T, Hiroi H. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. Mol Cell Endocrinol. 2003; 202:59-65.

Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, Lie KK, Lipkin WI, Magnus P, Reichborn-Kjennerud T, Schjølberg S, Davey Smith G, Øyen AS, Susser E, Stoltenberg C. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. JAMA. 2013; 309:570-7.

Susser E, Brown AS, Klonowski E, Allen RH, Lindenbaum J. Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association. Biol Psychiatry. 1998; 44:141-3.

Swanson JM, Entringer S, Buss C, Wadhwa PD. Developmental origins of health and disease: environmental exposures. Semin Reprod Med. 2009; 27:391-402.

Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A. Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity. Ginekol Pol. 2003; 74:1392-6.

Tchantchou F. Homocysteine metabolism and various consequences of folate deficiency. J Alzheimers Dis. 2006; 9:421-7.

Thomas PK, Hoffbrand AV, Smith IS. Neurological involvement in hereditary transcobalamin II deficiency. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1982; 45:74-7.

Tsutsui K. Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the developing Purkinje cell. J Steroid Biochem Mol Biol. 2006; 102:187-94.

Tsutsui K. Progesterone biosynthesis and action in the developing neuron. Endocrinology. 2008a; 149:2757-61.

Tsutsui, K. Neurosteroids in the Purkinje cell: biosynthesis, mode of action and functional significance. Mol Neurobiol. 2008b; 37:116-25.

Tsutsui K, Ukena K, Sakamoto H, Okuyama S, Haraguchi S. Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the Purkinje cell. Front Endocrinol (Lausanne). 2011; 2: 61.

Tuerck D, Floesser A, Kiese B, Schumacher M, Landgraf R, Holsboer F, Kucher K. Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. Science. 2009; 325:490-3.

Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, Beckers NG, Visser JA, Lindemans J, de Jong FH, Laven JS, Steegers-Theunissen RP. Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96:E322-9.

Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. Endocrinology. 1999; 140:805-13.

Ullegaddi R, Powers HJ, Gariballa SE. B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. Clin Sci (Lond). 2004 ; 107:477-84.

Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, Freedman JE, Johnson JL, Keaney JF Jr, Loscalzo J. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. J Biol Chem. 1997; 272:17012-7.

Val P, Lefrançois-Martinez AM, Veyssière G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl Recept. 2003; 1:8.

Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. J Neurosci Res. 2005; 80:129-37.

Veyrac A, Bakker J. Postnatal and adult exposure to estradiol differentially influences adult neurogenesis in the main and accessory olfactory bulb of female mice. FASEB J. 2011; 25:1048-57.

Villalobos MA, De La Cruz JP, Cuerda MA, Ortiz P, Smith-Agreda JM, Sánchez De La Cuesta F. Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion. Brain Res. 2000; 883:31-40.

Wade CB, Dorsa DM. Estrogen activation of cyclic adenosine 5'-monophosphatase response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. Endocrinology. 2003; 144:832-8.

Waelsch H, Sperry WB, Stoyanoff VA. Lipid metabolism in brain during myelination. J Biol Chem. 1940; 135:297-302.

Wainfan E, Poirier LA. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression. Cancer Res. 1992; 52:2071-7.

Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM. Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. Arch Intern Med. 1998, 158:862-7.

Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. Thromb Res. 1980; 18:113-21.

Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, Conley AJ, Nguyen HP, Ames BN, Halsted CH. Chronic ethanol perturbs testicular folate metabolism and dietary folate deficiency reduces sex hormone levels in the Yucatan micropig. Biol Reprod. 2007; 76:455-65.

Wang LH, Zhang W, Gao QX, Wang F. Expression of the luteinizing hormone receptor (LHR) gene in ovine non-gonadal tissues during estrous cycle. Genet Mol Res. 2012; 11:3766-80.

Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. J Neurochem. 2001; 76:1879-86.

Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. J Comp Neurol. 1997; 388:603-12.

White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. J Neurochem. 2001, 76: 1509-20.

Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. Mol Cell Biol. 1993; 13:5794-804.

Wu Y, Moriya-Ito K, Iwakura T, Tsutiya A, Ichikawa M, Ohtani-Kaneko R. Sexually dimorphic effects of estrogen on spines in cultures of accessory olfactory bulb. Neurosci lett. 2011; 500:77-81.

Xue Q, Lin Z, Yin P, Milad MP, Cheng YH, Confino E, Reierstad S, Bulun SE. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. J Clin Endocrinol Metab. 2007; 92:3261-7.

Yague JG, Muñoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. Aromatase expression in the human temporal cortex. Neuroscience. 2006; 138:389-401.

Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, Takeyama K, Minami Y, O'Malley BW, Kato S. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. Mol Cell. 2009; 36:340-7.

Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. Neurology. 2000; 55:437-40.

Zamudio-Bulcock PA, Valenzuela CF. Pregnenolone sulfate increases glutamate release at neonatal climbing fiber-to-Purkinje cell synapses. Neuroscience. 2011; 175:24-36.

Zhang X, Huang G, Liu H, Chang H, Wilson JX. Folic acid enhances Notch signaling, hippocampal neurogenesis, and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia. Nutr Neurosci. 2012; 15:55-61.

Zhao L, Kim KW, Ikeda Y, Anderson KK, Beck L, Chase S, Tobet SA, Parker KL. Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. Mol Endocrinol. 2008; 22:1403-15.

Zhu BT. Medical hypothesis: hyperhomocysteinemia is a risk factor for estrogen-induced hormonal cancer. Int J Oncol. 2003; 22:499-508.

Zhuo JM, Praticò D. Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet. Exp Gerontol. 2010; 45:195–201.

Zou J, Pan YW, Wang Z, Chang SY, Wang W, Wang X, Tournier C, Storm DR, Xia Z. Targeted deletion of ERK5 MAP kinase in the developing nervous system impairs development of GABAergic interneurons in the main olfactory bulb and behavioral discrimination between structurally similar odorants. J Neurosci. 2012; 32:4118-32.

Zsarnovszky A, Belcher SM. Spatial, temporal, and cellular distribution of the activated extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in the developing and mature rat cerebellum. Brain Res Dev Brain Res. 2004; 150:199-209.

Zwain IH, Yen SS. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. Endocrinology. 1999; 140:3843-52.

FICHES TECHNIQUES

Fiche 1

Extraction cytosolique à partir de tissu cérébral

- Broyer dans l'azote liquide les différentes régions cérébrales (BO, cervelet et hippocampe) stockées à -80°C
- Mélanger les tissus broyés dans un tampon de PBS(1) 1X à raison de 100 mg de tissu pour 1 mL de tampon
- Soumettre les échantillons aux ultrasons pendant 15 min et vortexer
- Effectuer 3 cycles de congélation - décongélation (30 s azote liquide - 30 s bain marie à 37°C)
- Centrifuger à 20 000 *g* pendant 20 min à +4°C
- Prendre 100 µL du surnageant pour doser les molécules adénylées (SAM, SAH). Utiliser le reste pour doser les vitamines B12 et B9. Garder les échantillons à -20°C

---

(1) PBS : sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Pour du PBS 1X mélanger 10 mL de PBS 10X dans 90 mL d'eau distillée

Fiche 2

Dosage radio - immunologique des vitamines B9 et B12

Les dosages ont été effectués sur des extractions cytosoliques à partir de tissu cérébral à l'aide du kit SimulTRAC – SNB[(1)]. Grâce à cette technique, les taux de vit B9 et B12 sont déterminés simultanément dans un seul tube.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant :

- Extraire la fraction cytosolique à partir de tissu cérébral (fiche précedante)
- 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 de la fraction cytosolique dans un tube à hémolyse
- Ajouter 200 µL de solution active de marquage/DTT[(2)] (dithiothreitol), agiter les tubes au vortex
- Incuber à température ambiante (18-25°C) pendant 15 min
- Ajouter 100 µL de réactif d'extraction, agiter les tubes au vortex
- Incuber à température ambiante pendant 15 min
- Bien agiter le flacon de réactif de liaison et ajouter 1mL de ce réactif dans les tubes, agiter les tubes au vortex
- Incuber les tubes à température ambiante pendant 1 h, à l'abri de la lumière
- Centrifuger à 1 000 *g* pendant 10 min de préférence à +4°C
- Jeter le surnageant
- Compter la radioactivité dans les culots à l'aide d'un compteur gamma[(3)]

---

(1) Kit SimulTRAC – MP Biomedicals
(2) DTT : Solution de Dithiothreitol SimulTRAC-SNB
(3) Compteur gamma : Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France)
Compteur COBRA-IIrTM autogamma (Packard) à double canal

Fiche 3

Dosage des molécules adénylées (SAM / SAH) par *high performance liquid chromatography*

Les dosages ont été effectués sur des extractions cytosoliques à partir de tissu cérébral (fiche précedante).

Préparation de la gamme

- A partir de solutions stock de standard(1) (SAM ; SAH) à 25 mM, Préparer une solution ST1 SAM et ST1 SAH à 250 µM (dilution 1/100, 5 µL dans 495 µL PBS(2) 1X)
- Préparer une gamme de dilution à 5 µM de la façon suivante :
  A = 2 µL de ST1 SAM + 2 µL de ST1 SAH + 96 µL PBS 1X. Vortex
  B = 50 µL de A + 50 µL PBS 1X
  C = 50 µL de B + 50 µL PBS 1X
  D = 50 µL de C + 50 µL PBS 1X
  E = 50 µL de D + 50 µL PBS 1X. Jeter 50 µL de la solution E
  F = 50 µL PBS1X
- De ST1 préparer des solutions de standard ST2 SAM et ST2 SAH à 5 µM (dilution 1/50, 2 µL dans 98 µL PBS 1X)

Déprotéinisation des échantillons

- Pour les 100 µL des échantillons, des étalons et des standards (ST2 SAM, ST2 SAH), ajouter 5 µL d'$HClO_4$ à 60% et vortexer
- Centrifuger à 20.000 *g* pendant 20 min à +4°C
- Récupérer le surnageant et centrifuger(3) à 100 000 *g* pendant 30 min à +4°C
- Récupérer le surnageant pour doser les molécules adénylées

Procédure de séparation et d'analyse par HPLC

- Déposer 50 µL des échantillons déprotéinisés, des étalons et des standards dans les inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé AS100
- Le matériel utilisé au laboratoire est une pompe à haute pression P1000XR, 0.75mL / min (~135 bar), une four à colonne à 30°C, une colonne Lichrospher K5OD2 (250x4 mm, 5 µ), un détecteur ultraviolet UV 100 (Thermo Separation Product)
- Solution pour la phase mobile :
  Tampon A: NaH_2PO_4 50mM; pH 3,2; Acide heptanesulfonique 10mM; Acétonitrile 10%
  Tampon B: NaH_2PO_4 50mM; pH 3,2; Acide heptanesulfonique 10mM; Acétonitrile 50%

(1) Solution stock de standard SAM et SAH (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(2) PBS : sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Pour du PBS 1X mélanger 10 mL de PBS 10X dans 90 mL d'eau distillée
(3) Ultracentrifugeuse Optima™ TLX, Beckman, France

Fiche4

Dosage de l'homocystéine

La concentration plasmatique en HCY a été mesurée au Service de Biochimie du CHU de Nancy-Brabois par une technique de chromatographie liquide à ultra-haute performance (Acquity UPLC HSS T3 (1.8 µm ; 2.1 x 50 mm, Waters)) couplée à la détection par spectrométrie de masse (4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex).

Préparation des réactifs

- Préparation d'aliquots de solutions mères de standards non deutérés et deutérés à 1 mmol/L

	Homocystine[1]	**Homocystine d8**[2] **(98%)**
Poudre (mg) *	13,27	13,8
HCl 0,1 N *(T° amb, hormones*)	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 mL	1 mL
Dithiotréitol (DTT)	132,7 mg	132,7 mg
HCl 0,1 N	qsp 100 mL	
	Vortexer, Soniquer	
Concentration solution mère	1 mM d'HCY	1 mM d'HCY d4
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

Préparation de la gamme d'étalonnage

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

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

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 Ac. Méthylmalonique (**MMA) d3** à 2 mmol/L
- 4,5 mL de DTT 2200 mmol/L

Préparation des contrôles d'homocystéine

- Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilizé[3]
- Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 min et agiter jusqu'à dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C

Préparer une solution d'extraction de méthanol contenant 0,1% (v/v) d'acide formique[4]

Préparation des échantillons

- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 2300 *g* à 4°C)
- 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 et 2)**	**Plasma**
Echantillon	50 µL pool	50 µL Pool	50 µL	50 µL	50 µL
Standard interne	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante					
meOH 0,1% ac. formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

- Vortexer et incuber 30 min à 4°C
- Vortexer et centrifuger à 33000 *g* pendant 10 min à 4°C

- Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 mL (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMS/MS) par 400 µL d'eau 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 33000 *g* pendant 10 min à 4°C
- 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 préchauffage)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

Méthodes

- Lancement de la méthode LCMSMS *via* Analyst(5):

- Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method
- Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam
- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

---

(1) DL Homocystine, acide succinique, Dithiotréitol (DTT) en poudre (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(2) Standards internes (SI) d8 Homocystine (DLM 3619, Cambridge isotopes)
(3) Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyphylizé (Chromsystems)
(4) Acide Formique 98% : (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(5) 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 5

Inclusion des lames et coupe des demi-cerveaux au cryostat

Inclusion des lames en verre

- Préparer une solution de gélatine porcine(1) à 1%
- Mettre la solution de gélatine dans un bain marie et chauffer entre 40 et 45°C pour faciliter sa dissolution
- Laisser refroidir jusqu'à environ 35°C
- Mettre les lames(2) à bords rodés sur un portoir et faire 2 allers-retours dans la gélatine diluée
- Laisser sécher les lames pendant 24 heures à température ambiante ou dans une étuve à 37°C

Coupe des cerveaux au cryostat

- Régler la température à l'intérieur du cryostat à environ -20°C et du porte-objet à -24°C
- Inclure le demi-cerveau dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4%(3)
- Attendre que la carboxyméthylcellulose se soit solidifié avant de commencer à couper
- Faire des coupes dans l'axe sagittal du cerveau de 16 µm d'épaisseur
- Stocker les coupes sur lame à -80°C

---

(1) Solution de gélatine porcine à 1% : 10 g de gélatine porcine (Sigma, St Louis, USA) dans 1l d'eau distillée
(2) Lames (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany)
(3) Solution de carboxyméthylcellulose à 4% : 4g de carboxyméthylcellulose dans 100 mL d'eau distillée

Fiche 6

Marquage immunocytochimique

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2 à 3 min à température ambiante
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™(1)
- Fixer les coupes 15 min à température ambiante en ajoutant 200 µL de para-formaldéhyde(2) à 4%
- Perméabiliser les membranes 2 fois pendant 10 min à température ambiante avec une solution de Triton(3) 0,1%
- Rincer les lames dans un bain de PBS(4) 1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce
- Réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200 µL d'une solution de BSA(5) à 10% diluée dans du PBS 1X afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incube 1h à température ambiante
- Déposer environ 100 µL d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de BSA 10%-PBS 1X) et laisser incuber 72h dans une chambre humide à +4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 100 µL d'anticorps secondaire (dilution 1/2000° dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) et laisser incuber à température ambiante pendant 1h dans une chambre humide à l'abri de la lumière
- Après cette étape mettre les lames dans du papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière
- Laver les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min sous agitation douce
- Déposer environ 200 µL de DAPI(6) et laisser incuber 30 s à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min sous agitation douce
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de liquide de montage fluo(7)
- Conserver les lames à l'abri de la lumière dans du papier aluminium à +4°C
- Analyser les lames au microscope à fluorescence(8)

---

(1) DakoPen™ (Dako, Glostrup, Denmark)

(2) Para-formaldéhyde à 4% : 20 g de para-formaldéhyde (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) à dissoudre dans 450 mL d'eau distillée + 50 mL du PBS 10X

(3) Triton 0,1% : ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1mL de Triton X-100 (BDH, VWR international, France) dans 1l de PBS 1X

(4) PBS 10X : 12,1g de Na_2HPO_4, $7H_2O$; 2g de KH_2PO_4 ; 80 g de NaCl ; 2g de KCl ; qsp 1l d'eau distillée et ajuster à pH = 7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100 mL de PBS 10X dans 900 mL d'eau distillée

(5) BSA 10% : 10 g de BSA (Bovin Serum Albumin, Sigma, St Louis, USA) dans 100 mL de PBS 1X
(6) DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous Bois, France : dilution 1/200 dans l'eau distillée soit une concentration finale de 5 µg/mL
(7) Liquide de montage fluo (Fluoromount, Sigma, St Louis, USA)
(8) Microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France

Tableau VII: Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Nom	Fonction	Source	Fournisseur	Dilution
Aromatase	Enzyme de la synthèse des stéroïdes	Lapin	Biovision Research Products	1/200
Caspase-3 clivée	Enzyme intervenant dans l'apoptose	Lapin	Cell signaling	1/200
Estradiol	Hormone stéroïde	Lapin	USBiological	1/200
Estrogen receptor alpha (ERα)	Récepteur nucléaire	Souris	Santa Cruz	1/200
Estrogen receptor beta (ERß)	Récepteur nucléaire	Lapin	Abcam	1/200
Homocystéine	Acide aminé soufré	Lapin	Millipore	1/200
Ki67	Marqueur de prolifération	Lapin	Abcam	1/200
Luteinizing hormone receptor (LHR)	Récepteur transmembranaire	Chèvre	Santa Cruz	1/200
Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR)	Récepteur dans la membrane externe mitochondriale	Chèvre	Santa Cruz	1/100
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)	Enzyme de la synthèse des stéroïdes	Lapin	Fourni par le professeur Stocco, Texas, USA	1/200
Steroidogenic factor 1 (SF-1)	Facteur de transcription	Lapin	Abcam	1/200

Tableau VIII: Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte.

Nom	Origine	Cible	Fournisseur	Dilution
Alexa Fluor 488 âne anti IgG de chèvre	âne	chèvre	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 488 âne anti IgG de lapin	âne	lapin	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 488 âne anti IgG de souris	âne	souris	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 555 âne anti IgG de lapin	âne	lapin	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000

Fiche 7

Extraction des protéines à partir de tissu cérébral

Avant de commencer :

- Préparer une solution de phenylmethanesulfonylfluoride ou phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1) dissous à 10 mg/mL dans l'éthanol absolu
- Préparer une solution d'orthovanadate de sodium (Na3VO4)(1) à 18,39 mg/mL en suivant précisément les recommandations du fournisseur
- Préparer le tampon RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) selon le tableau suivant :

Tampon RIPA	Concentration
NaCl (sodium chloride) (1)	8 g/L
Na_2HPO_4 (sodium phosphate anhydrous dibasic) (1)	1,44 g/L
KH_2PO_4 (potassium dihydrogen phosphate) (1)	0,24 g/L
IgePal(1)	1%
DOC (Deoxycholate de sodium) (1)	0,5%
SDS (Lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate) (1)	0,1%
PMSF	10 µL/mL
Na_3VO_4	10 µL/mL
Cocktail d'inhibiteurs de protéases(2)	1,4 µL/mL

L'extraction des protéines se fait en maintenant les échantillons à +4°C :

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote liquide et la carboglace. Peser les échantillons.
- Introduire le volume correspondant de tampon RIPA à raison de 0,1g de tissu pour 500 µL de tampon
- Broyer les échantillons manuellement à l'aide d'un micropilon
- Incuber 10 minutes dans la glace
- Homogénéiser par 10 à 20 allers-retours avec une seringue de 1mL
- Effectuer 3 cycles de congélation - décongélation (30 s azote liquide - 30 s bain marie à 37°C)
- Centrifuger(3) pendant 30 min à 18 000 *g* à 4°C

- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (Uptima BCA assay kit, Interchim)

---

(1) Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich, St Louis, USA
(2) Cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, Meylan, France)
(3) centrifugeuse Allegra^{TM} X-22R, Beckman, France

Fiche 8

Préparation des fractions subcellulaires et extraction des protéines mitochondriales et microsomales à partir de tissu cérébral

Les fractions mitochondriales et microsomales des poumons, des gonades et des différentes régions cérébrales prélevées ont été préparées selon une technique d'ultracentrifugation différentielle décrite précédemment par Leininger *et coll.,* 1991 et que nous avons adaptée au laboratoire.

Avant de commencer :

- Préparer le tampon I pour l'extraction selon le tableau suivant :

Tampon I	**Concentration**
Saccharose	109,54 g/L
Tris-base	1.21 g/L
EDTA	186,12 mg/L
Ajuster à PH = 7,4	

- Préparer le tampon II de conservation selon le tableau suivant :

Tampon II	**Concentration**
K_2HPO_4	13,96 g/L
KH_2PO_4	2,64 g/L
EDTA	74,4 mg/L
Glycérol	20%
Ajuster à PH = 7,4	

- Préparer le tampon RIPA selon la procédure décrite précédemment (fiche précédante).

Préparation des fractions subcellulaires

Toutes les étapes de fractionnement sont réalisées à 4°C

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote liquide et la carboglace. Peser les échantillons.

- Introduire le volume correspondant de tampon I à raison de 1g de tissu pour 3mL de tampon
- Broyer les échantillons manuellement à l'aide d'un micropilon
- Centrifuger(1) pendant 3 min à 2 000 *g*
- Récupérer le surnageant et centrifuger à 12 500 *g* pendant 10 min
- Conserver le surnageant dans la glace pour isoler les microsomes. Reprendre le culot dans le tampon I pour extraire la fraction mitochondriale
- Centrifuger le culot repris dans le tampon I pendant 10 min à 11 000 *g*.
- Eliminer le surnageant et centrifuger le culot repris de nouveau dans le tampon I pendant 10 min à 10 000 *g* pour collecter le culot mitochondrial
- Centrifuger le surnageant issu de la centrifugation à 12 500 *g* pendant 20 min à 15 000 *g*
- Récupérer le surnageant et centrifuger(2) pendant 90 min à 105 000 *g* pour collecter le culot de microsomes

Extraction des protéines mitochondriales et microsomales

L'extraction des protéines se fait en maintenant les échantillons à 4°C.

- Reprendre le culot des mitochondries dans le tampon de lyse RIPA et le culot des microsomes dans le tampon de conservation (tampon II) à raison de 3 g de tissu pour 1 mL de tampon
- Doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

---

(1) Centrifugeuse Allegra™ X-22R, Beckman, France
(2) Ultracentrifugeuse Optima™ TLX, Beckman, France

Fiche 9

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

Les concentrations protéiques ont été mesurées par la méthode BCA[(1)], qui est un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu(I), qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique entre 540 et 590 nm. L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines

- Préparer une gamme étalon (2 ; 1,8 ; 1,4 ; 1,2 ; 0,8 ; 0,4 ; 0,2 ; et 0 mg/mL, en double) à partir d'une solution stock de BSA[(2)] (bovine serum albumin) à 2 mg/mL selon le tableau suivant :

[BSA] mg/mL	Volume de BSA (µL)	Volume de tampon RIPA[(3)] (µL)
2	100	0
1,8	90	10
1,4	70	30
1,2	60	40
0,8	40	60
0,4	20	80
0,2	10	90
0	0	100

- Préparer les échantillons à une dilution de 1/20 (3 µL d'échantillon dans 57 µL de tampon RIPA)
- Préparer le réactif de travail à partir d'un kit BCA[(4)] en mélangeant 50 volumes de réactif A avec 1 volume de réactif B.
- Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA, du blanc (tampon de lyse RIPA) et des échantillons à doser sur une plaque de 96 puits
- Ajouter 200 µL de réactif de travail
- Couvrir la plaque et l'incuber pendant 30 min à 37°C.
- Mesurer l'absorbance sur le lecteur de plaque[(5)] à 570 nm
- Tracer la droite de régression étalon et déduire la concentration protéique des échantillons
- Stocker les échantillons après dosage à -80°C

(1) D'après Smith *et coll*., 1985
(2) BSA : Ampoule contenant de la BSA à 2 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN3 à 0,05% (p/v)
(3) Tampon de lyse RIPA : Préparer selon la procédure décrite précédemment (fiche précédante)
(4) Kit BCA : Protein Assay® Reagent (Pierce, Rockford, USA)
(5) Lecteur de plaque Victor^3 Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche 10

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

Préparation des gels d'électrophorèse

- Passer les plaques de verre à l'alcool
- Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5 mm)
- Préparer le gel de séparation selon le tableau IX en adaptant la concentration en acrylamide(1) selon la taille de la protéine. Pour 1 gel prévoir 10 mL de solution
- Couler le gel entre les deux plaques de verre et recouvrir sa surface avec 500 µL de l'isopropanol(2). Laisser polymériser environ 20 min (le temps de polymérisation est en fonction de la température ambiante)
- Rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- Préparer le gel de concentration à 5% selon le tableau IX (pour 1 gel prévoir 4 mL) et couler le au-dessus du gel de séparation
- Positionner le peigne en Téflon® en évitant la formation de bulles et laisser polymériser pendant 20 min
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration(3)
- 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 jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

Préparation des échantillons et migration

- Ajouter 1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X(4) à 1 volume d'échantillon
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 min
- Charger les puits du gel avec les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire(5)
- Brancher la cuve d'électrophorèse(6) et laisser migrer à 80V les échantillons dans le gel de concentration environ 15 min
- Une fois dans le gel de séparation, laisser migrer à 110V les échantillons jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel

Tableau IX: Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation pour SDS-PAGE, (pour une solution d'acrylamide à 30%).

		10 mL	20 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6%	H_2O MQ	5,3	10,6	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10
	Tris 1,5 M pH 8,8[7]	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS[8] 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS[9] 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED[10]	0,008	0,016	0,024	0,032	0,04
8%	H_2O MQ	4,6	9,3	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	2,7	5,3	8	10,7	13,4
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,006	0,012	0,018	0,024	0,03
10%	H_2O MQ	4	7,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	3,3	6,7	10	13,3	16,6
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02
12%	H_2O MQ	3,3	6,6	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	4	8	12	14	20
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02
15%	H_2O MQ	2,3	4,6	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	5	10	15	20	25
	Tris 1,5 M pH 8,8	2,5	5	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02
		2 mL	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Stacking	H_2O MQ	1,4	2,7	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,33	0,67	1	1,3	1,7

	Tris 0,5 M pH 6,8[11]	0,25	0,5	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01

(1) Acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories)
(2) Isopropanol VWR Prolabo
(3) Tampon de migration 10X (pour 1l) : 30 g de Tris ; 144 g de glycine ; 10 g de SDS 1% ; pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à +4°C), A utiliser 1X concentré à température ambiante : mélanger 100 mL de la solution 10X dans 900 mL d'eau distillée
(4) Tampon Laemmli 2X (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(5) Marqueurs de poids moléculaires : *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(6) Cuve d'électrophorèse : Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(7) Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 : 18,165 g de Tris dans 100 mL d'eau distillée ; pH 8,8 ; conserver à +4°C, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(8) SDS (sodium dodécylsulfate) 10%: 10 g de SDS dans 100 mL d'eau distillée, conserver à température ambiante, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(9) APS (persulfate d'ammonium) 10%: 1 g d'APS dans 10 mL d'eau distillée, aliquoter par 400 µL, conserver à -20°C, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(10) TEMED (Tetramethylethylenediamine) : Euromedex
(11) Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 : 6,055 g de Tris dans 100 mL d'eau distillée ; pH 6,8 ; conserver à +4°C, (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)

Fiche 11

Transfert des protéines

Electro-transfert liquide

- Couper les papiers filtres[(1)], la membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) [(2)] ou de nitrocellulose[(3)] à la dimension du gel :(5 x 8 cm)
- Mettre la membrane (uniquement) PVDF dans du méthanol pendant 30 sec afin de la perméabiliser
- Immerger la membrane, les éponges et les papiers filtres dans le tampon de transfert 1X[(4)] pendant 15 min à +4°C
- Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et tremper le gel de séparation dans le tampon de transfert froid pendant 5 min maximum
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette dans l'ordre suivant :
  - une éponge
  - deux papiers filtre
  - la membrane PVDF ou nitrocellulose
  - le gel de polyacrylamide
  - deux papiers filtre
  - une éponge
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau et fermer la casette
- Placer la cassette dans le module de transfert[(5)] en mettant bien la face noire de la cassette contre la face noire du module
- Mettre le glaçon et remplir la cuve avec le tampon de transfert froid
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 350 mA pendant 45 min
- Démonter le sandwich et récupérer la membrane
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S[(6)] 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

Electro-transfert semi-sec

- Couper les papiers filtres Whatman® 3MM[(7)], la membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF) [(2)] ou de nitrocellulose[(3)] à la dimension du gel :(5 x 8cm)
- Mettre la membrane (uniquement) PVDF dans du méthanol pendant 30 sec afin de la perméabiliser, puis la tremper en même temps que les papiers filtre dans le tampon de transfert 1X[(4)] pendant 15 min à +4°C
- Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et tremper le gel de séparation dans le tampon de transfert froid pendant 5 min maximum

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
  - un papier filtre
  - la membrane de PVDF ou nitrocellulose
  - le gel de polyacrylamide
  - un papier filtre
- 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 de transfert(8) sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10V pendant 45 min
- Démonter le sandwich et récupérer la membrane
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S(6) 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) Papier filtre d'épaisseur 1 mm (blotting paper - Sigma, St Louis, USA)
(2) Membrane polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) : porosité 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(3) Membrane nitrocellulose : porosité 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(4) Tampon de transfert 10X (pour 1 L) : 58,1 g de Tris ; 29,3 g de glycine et 3,75 g de SDS ; pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à +4°C), A utiliser froid à 1X concentré : mélanger 100 mL de la solution 10X dans 200 mL d'éthanol (100%) et compléter à 1 L d'eau distillée
(5) Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(6) Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(7) Papier filtre Whatman® 3MM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(8) Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)

Fiche 12

Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxydase

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de PVDF ou nitrocellulose dans du tampon de blocage(1) pendant 1h à température ambiante sous agitation lente
- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dirigé contre une protéine donnée (Tableau X) dans du tampon de blocage pendant 1 nuit à +4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane avec le tampon de lavage(2) 4 fois pendant 10 min à température ambiante
- Incuber la membrane avec l'anticorps secondaires conjugués à la peroxidase (Tableau XI) dans du tampon de blocage pendant 1h, sous agitation rotative lente à température ambiante, dans de petits sacs scellés
- Laver la membrane avec du tampon de lavage 4 fois pendant 10 min à température ambiante
- L'activité peroxydase est révélée par chimiluminescence(3)
- Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, puis déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film Saran™(4)
- Appliquer le volume de mélange réactionnel indiqué par le fournisseur
- Laisser 1 min, puis sécher la membrane
- Disposer la membrane dans une cassette entre 2 films Saran™
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique(5) pendant 1 min dans un premier temps
- 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)
- Réajuster le temps d'exposition si nécessaire
- Vérifier que les bandes ainsi révélées se trouvent à la bonne taille en superposant le film sur la membrane et en reportant le marqueur de taille sur le film par transparence

Tableau X: Anticorps primaires utilisés en Western blot.

Nom	Source	Fournisseur	Dilution
Aromatase	Lapin	Biovision Research Products	1/1000
cAMP response element-binding protein (CREB)	Lapin	Cell signaling	1/1000
Estrogen receptor alpha (ERα)	Souris	Santa Cruz	1/200

Estrogen receptor beta (ERβ)	Lapin	Abcam	1/1000
Luteinizing hormone receptor (LHR)	Chèvre	Santa Cruz	1/100
Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR)	Chèvre	Santa Cruz	1/100
Phospho CREB (pCREB)	Lapin	Cell signaling	1/1000
Phospho protéine Kinase C (pPKC)	Lapin	Abcam	1/700
Protéine kinase A (PKA)	Lapin	Cell signaling	1/700
Protéine kinase C (PKC)	Lapin	Abcam	1/700
Protéine phosphatase 2A (PP2A)	Chèvre	Santa Cruz	1/700
Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)	Lapin	Fourni par le professeur Stocco, Texas, USA	1/1000
Steroidogenic factor 1 (SF-1)	Lapin	Abcam	1/250

Tableau XI: Anticorps secondaires utilisés en Western blot.

Anticorps secondaires	Source	Espèce reconnue	Fournisseur
Anti - souris IgG - HRP	Ane	Souris	Santa Cruz
Anti - lapin IgG - HRP	Ane	Lapin	Santa Cruz
Anti - chèvre IgG - HRP	Ane	Chèvre	Santa Cruz

(1) Tampon de blocage : diluer 100 mL de la solution TBS 10X (24,2 g de Tris ; 87,5 g de NaCl ; pH 7,4 ; qsp 1 L d'eau distillée) dans 900 mL d'eau distillée contenant de Tween® 20 à 0,1% (v/v) et 5% (p/v) de lait en poudre écrémé ou de BSA

(2) Tampon de lavage : diluer 100 mL de TBS 10X dans 900 mL d'eau distillée et ajouter de Tween® 20 à 0,1% (v/v)

(3) ECL (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) 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)

Fiche 13

Deshybridation de membrane Western blotting (stripping)

- Travailler sous la hotte aspirante
- Chauffer dans un bac le tampon de déshybridation(1) à 37°C
- Immerger les membranes dans le tampon chaud pendant 30 mn en agitant de temps en temps
- Laver la membrane avec le tampon de lavage TBST(2) 2 fois pendant 10 min à température ambiante
- Reprendre le protocole de western à partir du tampon de blocage(3)

---

(1) Tampon de déshybridation : 7 mL de β-mercaptoethanol ; 20 g de SDS ; 7,57 g de Tris-HCl ; pH 6,7 ; qsp 1 L d'eau distillée,

(2) Tampon de lavage TBST: diluer 100 mL de TBS 10X (24,2 g de Tris ; 87,5 g de NaCl ; pH 7,4 ; qsp 1 L d'eau distillée) dans 900 mL d'eau distillée et ajouter de Tween® 20 à 0,1% (v/v)

(3) Tampon de blocage : 5 g de lait en poudre écrémé ou de BSA dans 100 mL de la solution TBST 1X

Fiche 14

Extraction des ARN totaux à l'aide du *RNeasy® Lipid Tissue Mini kit*[1]

Ce kit est utilisé pour extraire les ARN totaux de 100 mg de tissu (au maximum) riche en lipide comme le cerveau ou le tissu adipeux,

Avant de commencer :

- Mettre la centrifugeuse à +4°C
- Préparer éthanol à 70%
- Ajouter 4 volumes d'éthanol 96-100% au tampon RPE comme indiqué sur la bouteille,

Procédure :

- Travailler sous la hotte, Ajouter 1 mL de Qiazol[2] dans le tube contenant le tissu
- Homogénéiser à la seringue en faisant 10 allers-retours et laisser à température ambiante pendant 5 min
- Ajouter 200 µL de chloroforme, secouer vigoureusement et laisser à température ambiante pendant 2 min
- Centrifuger les tubes à 12 000 *g* pendant 15 min à +4°C
- Transférer le surnageant qui correspond aux ARN totaux dans un tube propre
- Ajouter 600 µL d'éthanol à 70% et bien mélanger en pipetant
- Transférer 700 µL de l'échantillon sur une mini - colonne RNeasy munie d'un filtre et adaptée sur un tube collecteur de 2mL
- Centrifuger les tubes à 8 000 *g* pendant 15 s à température ambiante (20-25°C), Jeter l'éluât, Si le volume de l'échantillon excède 700 µL, charger les aliquots successivement sur la colonne et centrifuger comme ci-dessus, Jeter l'éluât après chaque étape de centrifugation,
- Déposer 700 µL de tampon RW1 sur la colonne et centrifuger à 8 000 *g* pendant 15 s à température ambiante, Jeter l'éluât,
- Ajouter 500 µL de tampon RPE et centrifuger à 8 000 *g* pendant 15 s à température ambiante, Jeter l'éluât,
- Ajouter une nouvelle fois 500 µL de tampon RPE et centrifuger à 8 000 *g* pendant 2 min à température ambiante,
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL et centrifuger à 12 000 *g* pendant 1 min à température ambiante
- Transférer la colonne sur un tube *eppendorf* de 1,5 mL
- Ajouter 30 µL d'eau RNase - free sur la membrane et centrifuger à 8 000 *g* pendant 1 min à température ambiante, Répéter cette étape une deuxième fois,
- Retirer la colonne du tube, l'ARN est au fond du tube

(1) *Rneasy® Lipid Tissue Mini kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France)
(2) Qiazol lepsis reagent™ (Qiagen, Courtaboeuf,France)

Fiche 15

Quantification de l'ARN ou de l'ADN par spectrophotomètre

- Les mesures des densités optiques (DO) se font sur un spectrophotomètre(1)
- Entrer la dilution 1/30 sur le spectrophotomètre
- Déposer 60 µL (volume minimum pour lire une DO) d'eau Milli - Q dans une cuve en quartz, Faire le blanc
- Diluer l'ARN ou l'ADN au 1/30ème ° (2 µL d'ARN ou d'ADN dans 58 µL d'eau Milli - Q) dans une autre cuve en quartz, Lire l'absorbance à 260 nm (acide nucléique) et 280 nm (protéine), Pour avoir une bonne estimation de la concentration d'ARN ou d'ADN, la DO à 260 nm doit être comprise entre 0,1 et 1 unité de DO, Si on se situe en dehors de cet intervalle, il faut diluer ou concentrer les échantillons
- Pour considérer l'échantillon de qualité pur, le rapport de DO 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour l'ARN et entre 1,7 et 1,8 pour l'ADN, Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines, Un ratio supérieur indique une dégradation de l'ARN ou de l'ADN
- Une concentration d'ARN de 40 µg/mL ou d'ADN de 50 µg/mL donne une absorbance d'environ une unité de DO, Pour mesurer la concentration d'ARN ou d'ADN (µg /mL) il faut multiplier par 40 ou par 50 la valeur de l'absorbance à 260 nm ainsi que par le facteur de dilution respectivement
- Faire des aliquots de 1 µg d'ARN pour les RT - qPCR et un aliquot de 500 ng d'ARN ou d'ADN pour le dépôt sur gel
- Stocker l'ARN à -80°C et l'ADN à -20°C

---

(1) Spectrophotomètre (Biophotometer, Eppendorf)

Fiche 16

Analyse qualitative de l'ARN ou de l'ADN sur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose[1]

- Préparer le gel d'agarose à 1% : 0,8 g d'agarose dans 80 mL de tampon TBE[2] (Tris – Borate – EDTA) 1X
- Chauffer le mélange dans un four microondes ~ 3min jusqu'à dissociation complète (attention à ne pas faire bouillir le mélange car il y a un risque de projection)
- Laisser refroidir (~ 50°C) sur la paillasse
- Ajouter une goutte de bromure d'éthidium (BET) [3] et homogénéiser
- Couler délicatement le mélange dans le support de la cuve d'électrophorèse[4] en évitant la formation de bulles
- Ajouter un peigne de 15 ou 20 puits selon le nombre d'échantillons à déposer et laisser polymériser pendant 20-30 min à température ambiante
- Retirer le peigne et placer le support dans la cuve d'électrophorèse horizontale
- Rincer les puits et remplir la cuve avec de tampon TBE 1X jusqu'à recouvrir le gel

Préparation et dépôt des échantillons d'ARN ou d'ADN

- Décongeler les aliquots de 500 ng d'ARN préparés au préalable (fiche précedante)
- ajouter de l'eau MilliQ qsp 10 µL et 2 µL de solution de dépôt[5], Vortexer et centrifuger
- Charger les puits du gel avec les échantillons (12 µL) et le marqueur de poids moléculaire[6] (5 µL)
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu
- Faire migrer sous une tension constante de 110V pendant 40 min
- Une fois la migration achevée, arrêter le générateur et sortir le support de la cuve puis visualiser l'ARN ou l'ADN contenu dans le gel sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS[7]

---

(1) Agarose (Euromedex)
(2) Tampon TBE 1X : diluer 100 mL de TBE 10X (Tris 890 mM ; acide borique 890 mM ; EDTA 20 mM ; pH 8,3 ; qsp 1 L d'eau distillée) dans 900 mL d'eau distillée
(3) Bromure d'éthidium (BET) (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(4) Cuve d'électrophorèse : Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
(5) Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)

(6) Marqueur de poids moléculaire : PUC18/MspI, 26-501 pb, 12 bandes (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)
(7) Image Master™ VDS (Pharmacia Biotech)

Fiche 17

Retrotranscription (RT) des ARN à l'aide du kit *QuantiTect Reverve Transcription*[1]

Etape d'élimination de l'ADN génomique

- Pour l'échantillon d'ARN (1 µg) et le témoin négatif sans enzyme, compléter le volume avec de l'eau RNase - free jusqu'à 12 µL
- Pour le témoin négatif sans l'ARN ajouter 12 µL d'eau RNase - free
- Ajouter dans chaque tube 2 µL de tampon gDNA Wipeout®
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Incuber 4 minutes à 42°C dans le thermocycleur[2]
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

Etape de reverse transcription

- Dans un microtube stérile, préparer le mélange suivant le tableau ci-dessous:

	Pour 1 échantillon
Tampon Quantiscript RT 5X	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
Quantiscript RT (enzyme)	1 µL

- Ajouter 6 µL de mélange dans chaque tube de l'échantillon et dans le tube témoin négatif sans ARN
- dans le tube témoin négatif sans enzyme ajouter 4 µL de Quantiscript RT Buffer, 1 µL de RT Primer Mix et 1 µL d'eau RNase - free
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Placer les tubes dans le thermocycleur
- Sélectionner le programme RT suivant : 15 minutes à 42°C, 3 minutes à 95°C
- Aliquoter et conserver les ADNc produit à -20°C

---

(1) Kit *Quantitect reverse transcription* (Qiagen, Courtaboeuf, France)

(2) Thermocycleur : Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf)

Fiche 18

PCR en temps réel à l'aide du kit *QuantiTect SYBR® Green PCR*[1]

- Préparer le mélange réactionnel selon le tableau suivant et transférer 18 µL par capillaire[2]

Gène	RNase - free water	QuantiTect SYBR Green PCR (2x)	Amorce Sens (10 µM)	Amorce Anti - Sens(10 µM)	$MgCl_2$ (50 mM)
Aromatase	4,4 µL	10 µL	1,8 µL	1,8 µL	0 µL
ERα	5,8 µL	10 µL	0,9 µL	0,9 µL	0,4 µL
Pol II	3,4 µL	10 µL	1,8 µL	1,8 µL	1 µL
SF-1	5 µL	10 µL	1,5 µL	1,5 µL	0 µL
StAR	6,8 µL	10 µL	0,6 µL	0,6 µL	1 µL
TSPO	4,4 µL	10 µL	1,8 µL	1,8 µL	0 µL

- Ajouter 2 µL d'ADNc dilué à moitié pour quantifier un échantillon
- Insérer les capillaires dans le LightCycler[3] et vérifier qu'il y a le même volume dans chaque capillaire
- Conditions d'amplification sur le LightCycler

Gène	Nombre de cycle	Etapes	Température	Durée
Aromatase et *Pol II*	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 min
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 56°C 72°C	10 s 15 s 10 s
ERα et Pol II	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 min
	43	Dénaturation Hybridation	95°C 56°C	10 s 15 s

		Elongation	72°C	10 s
SF-1 et Pol II	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 min
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 56°C 72°C	10 s 15 s 10 s
StAR et Pol II	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 min
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 53°C 72°C	10 s 15 s 10 s
TSPO et Pol II	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 min
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 54°C 72°C	10 s 15 s 10 s

- Analyser les résultats grâce au logiciel de quantification RelQuant[4] après avoir vérifié que le pic de la courbe de fusion correspond bien à la taille de l'amplicon sur gel (fiche 16).
- Les résultats seront exprimés en unité arbitraire en normalisant les données des gènes cibles (*aromatase, ERα, SF-1, StAR et TSPO*) à celles du gène de référence *Pol II*.
- Oligonucléotides utilisés :

Gène	**Amorce**	**Séquence amorce[5] (5' → 3')**	**Taille (pb)**
Aromatase	Sens	TTGATTTTCGCTGAGAGACG	103
	Anti - Sens	ACAGAGTGACGGACATGGTG	
ERα	Sens	ATGTGTCCAGCTACAAACCAA	110
	Anti - Sens	CGTATCCCGCCTTTCATC	
Pol II	Sens	GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC	90
	Anti - Sens	GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG	

SF-1	Sens	GTCCAGAACAACAAGCATTACAC	138
	Anti - Sens	ATCAGCACGCACAGCTTC	
StAR	Sens	AGGAAAGCCAGCAGGAGAAT	103
	Anti - Sens	CTGTCCATGGGCTGGTCTA	
TSPO	Sens	CTAGCTTGCAGAAACCCTCCT	100
	Anti - Sens	CAGATTATGTAGGAGCCATACCC	

(1) Kit Quantitect™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Courtaboeuf, France)
(2) Capillaires (Roche diagnostics, Meylan, France)
(3) Light cycler : appareil thermocycler à fluorescence (Roche diagnostics, Meylan, France)
(4) RelQuant (Roche Diagnostics, Meylan, France)
(5) Séquence amorce : 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**, Les oligonucléotides sont commandés chez Eurogentec (Angers, France).

Fiche 19

Dosage de cholestérol et des neurostéroïdes par *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*

Extraction des lipides faite au chloroforme / méthanol (2 :1) (selon Folch *et coll.,* 1957)

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder 80 mg de tissu au maximum puis conserver le reste à -80°C
- Utiliser les tubes en verre puis pour la dernière étape de séchage, utiliser les *tubes en polypropylène*
- Homogénéiser le tissu broyé dans un mélange de chloroforme(1) / méthanol(1) (2 :1) en présence de 50µl de standard interne(2), pour un volume final de 2 mL.
- Pour améliorer le rendement d'extraction, utiliser un broyeur manuel et mettre à l'ultrason pendant 30 min à température ambiante
- Ajouter 400 µL du mélange eau/méthanol (1:1)
- Centrifuger l'homogénat 1 min à 760 *g*
- Eliminer la phase aqueuse, garder l'interface et la phase inférieure chloroformée
- Ajouter 400 µL du mélange méthanol/eau/chlorofome (48/47/3)
- Mettre à l'ultrason durant 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger 1 min à 760 *g*
- De nouveau retirer la phase aqueuse et répéter ces 4 dernières étapes 3 fois
- Après les 3 lavages, récupérer la phase inférieure chloroformée dans un tube en poplypropylène
- Sécher sous atmosphère d'azote

Dosage des stéroïdes sur LC-MS/MS(3) selon Higashi, Yokoi *et coll.,* 2008

Ne pas utiliser de tubes en verre

Préparer la phase mobile : Attention pas d'Acide Formique (pour les composes sulfates)

A1 et STRONG : mélange Méthanol / Formate d'ammonium 2 mmol/L (60/40)

B1 : Formate d'ammonium 2 mmol/L (126.12 mg/1L)

La solution « Weak » sert pour la dilution de la gamme, des standards internes et pour la reprise de l'extrait sec

Préparation du standard interne :

- Préparer les solutions mères des standards internes deutérés dans du méthanol à 100 µg / mL pour Pregs-d4 (Sodium Pregnenolone 17α, 21, 21, 21 d4 sulfate) et CHOL-d6

(cholesterol 2, 2, 3, 4, 4, 6 d6) et à 10 µg / mL pour Te-d3 (testosterone 16, 16, 17, d3).

- Préparer les solutions de travail des standards internes deutérés dans un mélange méthanol / formate d'ammonium 2 mM (60 / 40) à une concentration de 10 ng / mL pour Te-d3, DHEA-d2 et E2-d3, à 500 ng / mL de Pregs-d4 et 4 µg / mL de CHOL-d6 :

  - 10 µL Te-d3
  - 50 µL Pregs-d4
  - 400 µL CHOL-d6

  qsp 10 mL mélange MeOH/Formate d'ammonium (60/40)

Préparation de la gamme (microtubes de 1.5 ml)

- Faire une dilution au 1/100^{e} de TESTO, DHEA, ESTRONE, PREG, AND, PROG, ESTRADIOL : 10 µL des différents standards(4) à **100 µg/mL,** qsp 1 mL du mélange Méthanol / Formate d'ammonium 2 mM (60/40)

- **Dans un microtube de 1.5 ml ajouter :**

  20 µL des dilutions au 1/100^{e} (TESTO, DHEA, ESTRONE, PREG, AND, PROG, ESTRADIOL)
  20 µL des différents standards à **100 µg/mL** DHEAs, PREGs
  500 µL des différents standards à **100 µg/mL** CHOLESTEROL
  qsp 1 mL mélange Méthanol / Formate d'ammonium 2 mM (60/40) (Weak)

  Puis diluer de ½ en ½ de S8 à S1 dans un mélange WEAK

Extraction sur colonne STRATA-X

- Reprendre l'extrait sec dans 1 mL de méthanol/acide acétique (99/1)
- Ajouter 1 mL d'eau
- Conditionner la colonne STRATA-X(4) : dès le dépôt d'un produit mettre en route le vide à environ 5 en vérifiant que toutes les colonnes coulent

Conditionnement : 2 mL Acétate éthyle
2 mL MEOH
2 mL H2O Ne pas sécher la colonne (manomètre < 5)

- Passer l'échantillon (2 mL) sur la colonne STRATA-X(5). Ne pas sécher la colonne (manomètre < 5)
- Laver la colonne STRATA-X avec :

  2 mL H2O
  2 mL MEOH 50 % Sécher la colonne (manomètre à 5)

- Mettre les tubes en polypropylène pour éluer l'échantillon avec 1 mL d'acétate d'éthyle(1). Sécher la colonne (manomètre à 5).
- Sécher sous atmosphère d'azote à température ambiante
- Reprendre l'extrait sec dans 100 µL de mélange méthanol/formate d'ammonium (60/40)
- Dans une plaque de 96 puits, déposer les échantillons repris par 100 µL de mélange méthanol/formate d'ammonium (60/40)
- Fermer la plaque avec un film et mettre sous agitation 5 min à 600 rpm
- Centrifuger la plaque 2 min à 1500 *g*
- Injection de 10 µL de l'échantillon dans la colonne HSST3 UPLC Acquity(6) (1,8 µm, 2,1x100 mm)
- La quantification a été faite en utilisant les courbes d'étalonnage avec correction contre la zone du pic de l'étalon interne.

Débit : 0.35 ml/mn

---

(1) Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich, France
(2) Standard interne : Accros Organics, Geel, Belgium
(3) LC-MS/MS : triple quadripole mass spectrometer 4000 QTRAP (ABSciex, Courtaboeuf, France) équipé d'une source d'ionisation APCI utilisé en mode positif
(4) Standard
(5) Colonne STRATA-X : (60 mg adsorbent; Phenomenex, Torrance, CA)
(6) colonne HSST3 UPLC Acquity : Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France

Fiche 20

Extraction de l'ADNg à l'aide du *QIAamp® DNA Mini kit*[1]

Ce kit est utilisé pour extraire l'ADNg de 25 mg de tissu au maximum, Toutes les étapes se font à température ambiante,

Avant de commencer :

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder 25 mg de tissu au maximum puis conserver le reste à -80°C
- Mettre le bain marie à 56°C (étape 2) puis à 70°C (étape 4)
- Ajouter de l'éthanol 96-100% au tampon AW1 et au tampon AW2 comme indiqué sur les deux bouteilles

Procédure :

- Ajouter 180 µL de tampon ATL dans le tube contenant le tissu
- Ajouter 20 µL de la protéinase K, vortexer et incuber à 56°C toute la nuit, Pendant l'incubation, vortexer 2 à 3 fois pour disperser l'échantillon
- Après incubation, centrifuger brièvement les tubes de 1,5 mL pour récupérer les gouttelettes sur la paroi
- Pour séparer l'ADNg de l'ARN, ajouter :
    - 4 µL de RNase A, vortexer 15 s et incuber 2 min à température ambiante,
    - Centrifuger brièvement les tubes de 1,5 mL pour récupérer les gouttelettes sur la paroi
    - Ajouter 200 µL tampon AL, vortexer 15 s et incuber 10 mn à 70°C
    - Centrifuger brièvement les tubes de 1,5 mL pour récupérer les gouttelettes sur la paroi
- Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100%), vortexer 15 s, Centrifuger brièvement les tubes pour récupérer les gouttelettes, Possibilité d'un précipité blanc,
- Appliquer le mélange de l'étape précédente (y compris le précipité) à la colonne QIAamp mini spin sans mouiller le bord, Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 *g* pendant 1 mn, Si le mélange n'est pas totalement passé à travers la membrane, centrifuger à nouveau à une vitesse supérieure jusqu'à ce que toute la solution soit passée, Placer la colonne QIAamp mini spin dans un nouveau tube collecteur de 2 mL, Jeter le tube contenant le filtrat,
- Ajouter 500 µL de tampon AW1 sans mouiller le bord, Fermer le capuchon et centrifuger 1 mn à 6000 *g*. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL et jeter le tube contenant le filtrat,
- Ajouter 500 µL de tampon AW2 sans mouiller le bord, Fermer le capuchon et centrifuger à 20 000 *g* pendant 3 mn,

- Placer la colonne QIAamp mini spin dans un nouveau tube de 2 mL (non fourni) et jeter le vieux tube contenant le filtrat, Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 mn
- Placer la colonne dans un nouveau tube de 1,5 mL (non fourni) et jeter le tube contenant le filtrat, Ajouter 100 µL de tampon AE ou d'eau distillée, Laisser 3-4 min à température ambiante puis centrifuger à 6000 *g* pendant 1 mn
- Pour stocker l'ADN à long terme, il faut l'éluer dans du tampon AE et placer à -20°C
- Doser l'ADNg selon la fiche 15

---

(1) *QIAamp® DNA Mini kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France)

Fiche 21

CpG Methylase

Avant la bisulfitation il faut préparer un échantillon « CpG methylase » utilisé comme témoin positif, La méthylase CpG est une enzyme qui permet de méthyler tous les résidus cytosine (C5) de l'ADN hémi ou non méthylé ayant la séquence de dinucléotide 5'… CpG … 3',

Avant de commencer :

- Mettre le bain marie à 30°C (étape 2 et 4) puis à 65°C (étape 4)

Procédure :

- Dans un tube eppendorf ajouter : 1 µg de l'ADNg extrait selon la fiche 20
  2 µL de 10X CpG Reaction Buffer
  1 µL de 20X SAM (S-adenosylmethionine)
  1 µL de CpG methylase
  qsp 20 µL avec de l'eau Nuclease Free
- Vortexer et incuber pendant 4 h à 30°C
- Après incubation, ajouter de nouveau : 1 µL de 20X SAM
  1 µL de CpG methylase
- Incuber pendant 4 h à 30°C puis 20 min à 65°C pour inactiver l'enzyme

---

(1) *CpG methylase* (Zymo Research)

Fiche 22

Purification de produit méthylé à l'aide du *MinElut Reaction Cleanup kit*(1)

- Dans le tube eppendorf contenant l'ADNg méthylé selon la fiche 21 ajouter 300 µL du tampon ERC
- Bien mélanger et vérifier si la couleur est jaune
- Placer la colonne *Min Elute* sur un tube eppendorf de 2 mL
- Appliquer l'échantillon sur la colonne pour lier l'ADNg
- Centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 min à température ambiante, Jeter l'éluât,
- Ajouter 750 µL de tampon de lavage PE et centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 min à température ambiante, Jeter l'éluât,
- Re-centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 min à température ambiante, Placer la colonne *Min Elute* dans un nouveau tube *eppendorf* de 1,5 mL
- Pour éluer l'ADNg méthylé, ajouter 10 µL de tampon EB, Incuber pendant 1 min à température ambiante,
- Centrifuger à 10 000 *g* pendant 1 min à température ambiante, Retirer la colonne du tube, l'ADNg méthylé est au fond du tube,

---

(1) *Min Elute Reacion Cleamp kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France)

Fiche 23

Bisulfitation de l'ADN à l'aide du *EZ DNA Methylation-gold*[1]

Cette technique consiste à traiter l'ADN avec du bisulfite, qui convertit les cytosines non méthylées en uracile, Les cytosines méthylées restent inchangées pendant le traitement, Une fois converti, le profil de méthylation de l'ADN peut être déterminé par amplification par PCR suivie de séquençage de l'ADN

Préparation des réactifs :

- CT conversion reagent : avant la première utilisation ajouter dans le tube CT conversion reagent : 900 µL d'eau nucléase free
  300 µL de M-dilution buffer
  50 µL de M-dissolving buffer
  Mélanger à température ambiante en vortexant régulièrement pendant 10 min, Chaque tube de CT conversion reagent est désigné pour 10 traitements, Conserver la solution à l'abri de la lumière à -20°C et passer à 37°C avant utilisation.
- M-wash buffer : Ajouter 24 mL d'éthanol 100% aux 6 mL de M-wash buffer concentré

Procédure :

- Calculer le volume à prélever pour avoir 1 µg d'ADNg qsp 20 µL d'eau Nuclease-Free
- Ajouter 130 µL de CT conversion reagent, Homogénéiser par refoulement à la pipette
- Placer l'échantillon dans le thermocycler : 98°C - 10 min
  64°C - 2 h 30 min
  +4°C - stocké jusqu'à 20h
- Placer la colonne Zymo-spin IC dans un tube collecteur, Ajouter 600 µL de M-binding buffer et le produit du thermocycler, Remuer par retournement
- Centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s, Eliminer l'éluât
- Ajouter 100 µL de M-wash buffer, Centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s, Eliminer l'éluât
- Ajouter 200 µL de M-desulphonation buffer, Laisser 15 - 20 min à température ambiante, Centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s, Eliminer l'éluât
- Ajouter 200 µL de M-wash buffer, Centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s, Eliminer l'éluât (2X)
- Placer la colonne dans un tube de 1,5 mL, Ajouter 10 µL de M-Elution buffer directement sur la colonne et centrifuger à 10 000 *g* pendant 30 s pour éluer l'ADN
- L'ADNg bisulfité est directement utilisé ou conservé à -20°C.

(1) *EZ DNA Methylation-gold* (Zymo Research)

Fiche 24

Amplification par PCR

Description des composants :

- Platinum® Taq DNA polymerase(1)
- Tampon de PCR, sans $MgCl_2$ 10X(1)
- Chlorure de magnésium 50 mM(1)
- dNTP(1)
- Oligonucléotides utilisés(2) : P1 sens : 5'-ATTATTTTAGTTGTGTGTTTTATTT-3'
  P1 antisens : 5'-AAAATTACCCTAATCTATATACACC-3'
  P2 sens : 5'-ATATAGATTAGGGTAATTTTAGGTTAGT-3'
  P2 antisens : 5'-AAAAAACCCTACTCCAAAAAAAA-3'

Procédure :

- Décongeler les échantillons d'ADNg bisulfité, les amorces sens et anti-sens ainsi que les réactifs de PCR : le tampon de PCR, le $MgCl_2$ et les dNTP
- Préparer un mix de PCR contenant pour un tube 0,2 µM d'amorces sens, 0,2 µM d'amorce antisens, 1 unité de Platinum® Taq DNA polymerase, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP et le tampon de PCR 1X concentré pour un volume final de 50 µL qsp eau ultrapure,
- Distribuer 48 µL de mix dans les tubes de PCR et ajouter 2 µL de l'ADNg bisulfité pour chacun des échantillons
- Programmer le bloc thermostaté(3) pour 30 cycles avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 94°C pendant 30 s, l'hybridation à 55°C pendant 30 s, l'élongation à 72°C pendant 30 s, Au début de chaque cycle, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 15 min et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min,
- Conserver les produits de PCR à -20°C pour la visualisation des ADNg bisulfité sur gel d'agarose (voir la fiche 16)

---

(1) Tous les produits sont fournis par Invitrogen ,Cergy-Pontoise, France

(2) 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**, Les oligonucléotides sont commandés chez Eurogentec (Angers, France),

(3) Thermocycleur : Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf)

Fiche 25

Purification des produits de PCR avec le kit QIAquick PCR Purification kit[(1)]

Toutes les étapes se font à température ambiante, Toutes les centrifugations doivent être effectuées entre 20 et 25°C à 17 900 *g*

Avant de commencer :

- Ajouter de l'éthanol 96-100% au tampon PE comme indiqué sur la bouteille
- Ajouter le pH indicator I au tampon PB comme indiqué sur la bouteille, La couleur jaune du tampon PBI indique un pH ≤ 7,5

Procédure :

- Ajouter 200 µL de tampon PBI pour 40 µL des produits de PCR et mélanger
- Vérifier que la couleur est jaune ce qui témoigne d'un pH optimal pour la purification (si la couleur est orange ou violette, ajouter 10 µL d'acétate de sodium 3 M à pH 5 et mélanger)
- Ajouter l'échantillon dans la colonne QIAquick et centrifuger 1 min
- Eliminer l'éluât et replacer la colonne sur le tube
- Ajouter 750 µL de tampon PE dans la colonne et centrifuger 1 min
- Eliminer l'éluât et centrifuger 1 min supplémentaire pour éliminer toute trace d'éthanol contenu dans le tampon PE
- Placer la colonne sur un nouveau tube de 1,5 mL
- Pour l'élution, ajouter 30 µL de tampon EB directement sur la membrane et laisser agir 1 min avant la centrifugation,
- Centrifuger 1 min et conserver l'ADN à -20°C
- La quantité de l'ADN peut éventuellement être vérifiée sur gel d'agarose (voir la fiche 16), en utilisant le marqueur de taille Low DNA Mass Ladder

---

(1) *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France)

Fiche 26

Réaction de séquençage des produits de PCR avec le kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing kit[1]

Description des composants :

- Ready Reaction Mix 2,5X
- BigDye Terminator v1,1/3,1 Sequencing Buffer (5X)

Procédure :

- Décongeler les échantillons d'ADNg bisulfité à séquencer après purification
- Préparer le mélange réactionnel suivant dans des microtubes:

Réactifs	Pour 1 tube	Concentration finale
Ready Reaction Mix 2,5 X	2 µL	0,5 X
Big Dye Sequencing Buffer 5X	1 µL	2 X
Amorce Sens **ou** Antisens 3,2 µM	1 µL	0,32 µM
Template	1 à 6 µL	
H_2O nuclease free	qsp 10 µL	

- Vortexer doucement les microtubes et centrifuger brièvement
- Programmer le bloc thermostaté[2] pour 25 cycles avec 3 étapes par cycle : la dénaturation à 96°C pendant 10 s, l'hybridation à 50°C pendant 5 s, l'élongation à 60°C pendant 3 min, Avant les 25 cycles, ajouter une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant 1 min,
- Mettre les tubes à +4°C, et démarrer immédiatement la purification sur plaque des produits de séquençage

(1) Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems
(2) Thermocycler T3000, Biometra

Fiche 27

Purification des produits de séquençage sur plaque

Cette étape a pour but de purifier par gel-filtration les produits de la réaction de séquençage, La résine Sephadex® G50(1) utilisée permet de dessaler les échantillons, d'éliminer les nucléotides non incorporés (les ddNTP marqués par un fluorochrome) et l'amorce utilisée pour la PCR de séquence présente en excès, La limite d'exclusion de la résine G50 correspond à un oligonucléotide d'environ 20 bases,

Préparation de la plaque G50 :

- Retourner la plaque MultiScreen HV(2), Coller un film alu autocollant(3) en dessous de la plaque Multiscreen HV de façon à bien protéger la membrane de chaque puits,
- Déposer de la résine Sephadex® G50 dans chaque puits du chargeur de colonne(4)
- Retirer l'excès de résine sur le chargeur de colonne avec la raclette et récupérer l'excès de résine dans le pot stock
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble
- Taper légèrement sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque
- Ajouter 300 µL d'eau MilliQ dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque MultiScreen HV avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à +4°C, Les plaques MultiScreen HV contenant de la résine Sephadex® G50 imbibée d'eau peuvent être stockées à +4°C pendant 2 semaines,

Tassement de la colonne avant la première utilisation de la plaque de G50 :

- Masquer avec un film aluminium les puits qui ne vont pas être utilisés,
- Sans retourner la plaque Multiscreen HV, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés,
- Placer la plaque de filtration Multiscreen HV sur la plaque de récupération de 350 µL,
- Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération
- Centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min,
- Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques,

Tassement de la colonne : utilisations suivantes de la plaque de G50 :

- Enlever le film aluminium au-dessus des puits qui vont être utilisés,
- Sans retourner la plaque Multiscreen HV, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés,
- Réhydrater les puits en ajoutant de l'eau MilliQ jusqu'à la surface du puits,
- Placer la plaque de filtration Multiscreen HV sur la plaque de récupération de 350 µL,
- Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération

- Centrifuger le montage à 910 *g* pendant 5 min,
- Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques,

Purification :

- Ajuster le volume de la réaction de séquençage à 20 µL à l'aide d'eau MilliQ,
- Déposer la plaque de filtration Multiscreen HV sur une plaque neuve de 96 puits transparente à fond conique(5) de 250 µL,
- Déposer les 20 µL de produits de séquençage au centre de chaque puits de la plaque de filtration, sans toucher les bords et la résine,
- Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération,
- Centrifuger à 910 *g* pendant 4 min,
- Couvrir la plaque neuve 96 puits transparente à fond conique de 250 µL par un film adhésif transparent, l'emballer dans du papier aluminium et la conserver à +4°C,

---

(1) Sephadex™ G-50 Superfine, GE HEALTHCARE
(2) Plaque de filtration MultiScreen-HV, Millipore
(3) Film adhesif pré-découpé pour microplaques
(4) Chargeur de colonnes Multiscreen en Sephadex™, Millipore
(5) Plaque 96 puits fond conique stérile Greiner Bio-one, Dutscher

Fiche 28

Séquençage des produits purifiés

Préparation des échantillons :

- Prélever 10 µL de chaque produit purifié à partir de la plaque (fiche 27)
- Ajouter 10 µL de formamide Hi-Di(1)
- Déposer chaque échantillon dans un puits sur une autre plaque 96 puits(2)
- Recouvrir la plaque à l'aide de son bouchon souple(2) et placer la plaque sur son support(2)
- Recouvrir le « sandwich » ainsi formé par le couvercle en plastique(2) en faisant coïncider les trous du couvercle avec ceux du bouchon
- Déposer le tout dans le séquenceur(3) contenant des capillaires(4) de 36 cm remplis du polymère POP4(5)
- Faire migrer à l'aide du tampon EDTA 1X(6) en ouvrant le logiciel de run « 3100-avant data collection software v 2,0 »

Analyse des séquences :

Cette analyse est réalisée grâce au logiciel Sequencing Analysis v 5,1,1

- Ouvrir le logiciel et importer les séquences en cliquant sur l'icône correspondant
- Ouvrir le disque E ; « Applied Biosystems ; UDC ; Data collection ; Data » ; puis le « result group » désiré et sélectionner les fichiers de séquences à importer
- Cliquer sur « Add selected sample » puis sur « OK »

Chaque pic correspond à 1 base :

pic vert → base A
pic rouge → base T
pic bleu → base C
pic noir → base G

Ces pics sont utilisés pour déterminer la séquence en bases de l'échantillon de départ.
Un "pic"* correspond *donc à la détection d'un nucléotide donné dans la séquence.
2 pics de différentes couleurs se superposent lorsque 2 nucléotides sont situés à la même position

---

Le séquençage est effectué à la plateforme de Biologie Moléculaire au CHU de Brabois, Nancy,

(1) Formamide Hi-Di, référence 4311320, Applied Biosystems
(2) Montage support + plaque 96 puits + bouchon + couvercle, Applied Biosystems
(3) 3100-Avant Genetic Analyser, Applied Biosystems
(4) Capillaires, référence 4333464, Applied Biosystems
(5) Polymère POP4, référence 4316355, Applied Biosystems
(6) Tampon EDTA 10X, référence 402824, Applied Biosystems

Fiche 29

Analyse de la méthylation de l'ADN par *Methylamp^{TM} Global DNA Methylation Quantification Kit*

- Extraire et doser l'ADNg selon la fiche 20,
- Vérifier que le tampon de lavage GU1 ne contient pas de précipité de sel, si c'est le cas le laisser à température ambiante jusqu'à dissociation des cristaux
- Déterminer le nombre de puits nécessaire (laisser le reste dans le sac hermétique à +4°C)
- Diluer GU1 (10X) dans l'eau distillée (1 mL GU1 + 9 mL d'H_2O distillée)
- Préparer la gamme de la manière suivante (GU3 est dilué de 0,2 à 10 ng/µL avec GU2) :

[ADN] ng/µL	Nom de la dilution	Volume à pipeter	Volume GU2
10	D10	2 µL de la solution mère (GU3)	18 µL
5	D5	5 µL de la dilution D10	5 µL
2,5	D2,5	5 µL de la dilution D5	5 µL
1	D1	4 µL de la dilution D2,5	6 µL
0,5	D0,5	5 µL de la dilution D1	5 µL
0,2	D0,2	4 µL de la dilution D0,5	6 µL

- Déposer 28 µL de GU2 dans chaque puits, puis ajouter 2 µL de chaque point de la gamme, 2 µL de control négatif ou 2 µL (100 à 200 ng) de l'ADNg, Travailler en duplicate,
- Agiter la plaque pour que la solution recouvre le fond du puits
- Incuber la plaque à 37°C (sans humidité) pendant 40 min puis à 60°C (sans humidité) pendant 40 min pour évaporer la solution, S'assurer que les puits sont bien secs
- Si la solution n'est pas entièrement évaporée, prolonger l'incubation à 60°C pendant 5 à 10 min
- Ajouter 150 µL de GU4 (solution de blocage) dans chaque puits, Incuber à 37°C pendant 30 min
- Aspirer le liquide et laver trois fois chaque puits avec 150 µL de GU1 1X
- Diluer GU5 (*capture antibody* ; 1000 µg/mL) au 1/1000 avec GU1 1X, Ajouter 50 µL de GU5 dilué dans chaque puits et incuber 1h à température ambiante
- Aspirer le liquide et laver trois fois chaque puits avec 150 µL de GU1 1X

- Diluer GU6 (*detecting antibody* ; 400 µg/mL) entre 1/5000 et 1/10 000 avec GU1 1X, Ajouter 50 µL de GU6 dilué dans chaque puits et incuber 30 min à température ambiante
- Aspirer le liquide et laver trois fois chaque puits avec 150 µL de GU1 1X
- Diluer GU7 (*enhancer solution*) entre 1/5000 et 1/10 000 avec GU1 1X, Ajouter 50 µL de GU7 dilué dans chaque puits et incuber 30 min à température ambiante
- Aspirer le liquide et laver cinq fois chaque puits avec 150 µL de GU1 1X
- Ajouter 100 µL de GU8 (*developing solution*) dans chaque puits et incuber de 1 à 5 min à température ambiante à l'abri de la lumière, Suivre la coloration dans les puits des échantillons et de la gamme pour avoir une coloration bleu moyenne
- Ajouter 50 µL de GU9 (*stop solution*) dans chaque puits pour stopper la réaction enzymatique, Après ajout, la couleur vire au jaune
- Lire l'absorbance à 450 nm dans les 2 à 15 min
- Calculer le pourcentage de méthylation selon les formules suivantes :

$$\text{Quantité d'ADN méthylé (ng)} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO control négatif}}{\text{pente}} \times 100$$

$$\text{\% de méthylation} = \frac{\text{Quantité d'ADN méthylé} / X^{*}}{\text{Quantité de l'ADNg ajouté}} \times 100$$

*X est la teneur en GC dans l'ADN génomique (exemple la teneur en GC est de 41% dans l'ADN génomique humain, 42% dans celui des rats et des souris)

---

(1) *Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit* (Epigentek, Euromedex, France)

Fiche 30

Dosage de l'AMPc par *Direct cAMP ELISA kit*[(1)]

Préparation des échantillons

- Broyer le tissu à l'aide d'un mortier et d'un pilon dans l'azote et la carboglace et garder 20 mg de tissu au maximum puis conserver le reste à -80°C
- Homogénéiser dans 10 volumes de HCl 0,1 M (par exemple 0,1 g de tissu dans 1 mL de HCl)
- Centrifuger à 600 *g* pendant 10 min.
- Récupérer le surnageant pour une analyse directe ou le congeler pour une analyse ultérieure.

Préparation des réactifs

- Préparer le tampon de lavage en diluant 5 mL avec 95 mL d'eau distillée
- Préparer le réactif d'acétylation en ajoutant 0,5 mL d'anhydride acétique à 1 mL de Triéthylamine.
- Préparer le standard AMPc acétylé :
    - Numéroter 5 tubes de 12 mm x 75 mm. Pipeter 990 µL de 0,1 M de HCl dans le tube n°1 et 750 µL dans les autres tubes.
    - Ajouter 10 µL de standard AMPc non acétylé stock à 2 pmol/mL dans le tube n°1. Vortexer.
    - Ajouter 250 µL de tube n°1 dans le tube n°2 et vortexer. Continuer de la même manière jusqu'au tube n°5.
- Acétyler tous les standards et les échantillons en ajoutant 10 µL de réactif d'acétylation pour chaque 200 µL et vortexer.
- Numéroter un tube de 12 mm x 75 mm comme un tube de Bo/NSB. ajouter 1 mL de HCl 0,1 M et 50 µL de réactif d'acétylation dans ce tube. Utiliser ce tube pendant l'étape 2 et 3 de la procédure.

Procédure

- Ajouter 50 µL de réactif de neutralisation dans chaque puits à l'exception les puits qui correspondent au blanc et à l'activité totale (TA)
- Ajouter 100 µL de HCl 0,1 M dans les puits de NSB (liaison non spécifique) et Bo (0 pmol / mL standard)
- Ajouter 50 µL de HCl 0,1 M dans les puits NSB
- Ajouter 100 µL de chaque standard dans les puits qui correspondent à la gamme.
- Ajouter 100 µL de chaque échantillon dans les puits qui correspondent aux échantillons.

- Ajouter 50 µL de l'AMPc conjugué à la phosphatase alcaline (solution bleu) dans chaque puits sauf le puits TA et le blanc.
- Ajouter 50 µL de l'anticorps polyclonal anti-AMPc (solution jaune) dans chaque puits sauf les puits de blanc, TA, et NSB.
  Chaque puits utilisé doit être de couleur verte, à l'exception les puits le puits de NSB devrait être bleu. Le blanc et le puits TA sont vides à ce point et n'ont pas de couleur
- Fermer la plaque. Incuber pendant 2 h sous agitation lente à température ambiante
- Vider le contenu des puits et laver en ajoutant 400 µL de tampon de lavage à chaque puits. Répéter 2 fois le lavage. Après le dernier lavage, vider les puits et taper la plaque sur un papier pour enlever toute solution de lavage restante.
- Ajouter 5 µL du conjugué bleu aux puits TA.
- Ajouter 200 µL de substrat pNpp dans chaque puits
- Incuber pendant 1 h à température ambiante sans agitation.
- Ajouter 50 µL de solution stop dans chaque puits.
- Lire l'absorbance à 405 nm.

---

(1) *Direct cAMP ELISA kit* (Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York)

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

I. Communications affichées

1. El hajj chehadeh S., Dreumont-Schuller N., Alberto JM., Daval JL., Guéant JL., Leininger-Muller B. Effets délétères et sexe-dépendants d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur la neurostéroïdogenèse dans le cervelet des ratons nouveaux-nés. **30e congrès de la société française d'endocrinologie 2013** - Paris - France.

2. El hajj chehadeh S., Martin N., Pourié G., Daval JL., Guéant JL., Leininger-Muller B. Early methyl donor deficiency impairs key proteins of neurosteroidogenesis in hippocampus and cerebellum of rat pups in a sex-dependent manner. 8ème **journée Claude Huriet de la recherche biomédicale 2013** - Nancy - France

3. El hajj chehadeh S., Guéant JL., Daval JL., Leininger-Muller B. Methyl donor deficiency during gestation and lactation impairs key proteins of neurosteroidogenesis in cerebellum and hippocampus of rat pups. **Vitamin B12 symposium 2012** - Nancy - France.

4. El hajj chehadeh S., Martin N., Pourié G., Bossenmeyer-Pourié C., Daval JL., Guéant JL., Leininger-Muller B. Early methyl donor deficiency impairs key proteins of neurosteroidogenesis in hippocampus and cerebellum of rat pups in a sex-dependent manner. **Clinical epigenetics international meeting 2012** - Homburg - Germany.

5. El hajj chehadeh S., Martin N., Pourié G., Daval JL., Guéant JL., Leininger-Muller B. Une carence gestationnelle en donneurs de groupements méthyles altère les étapes clés de la neurostéroïdogénèse dans le cervelet et l'hippocampe des ratons femelles. **7ème journée Claude Huriet de la recherche biomédicale 2012** - Nancy - France

6. El hajj chehadeh S., Martin N., Guéant J.L., Daval J.L., Leininger-Muller B. Consequence of diet lacking methyl donors on the expression of protein StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) in the brain of rat. **10ème Colloque de la Société des Neurosciences 2011** - Marseille - France:

7. El hajj chehadeh S., Martin N., Guéant J.L., Daval J.L., Leininger-Muller B. Conséquence d'une carence en donneurs de groupements méthyles sur l'expression de la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) dans le cerveau de rat. **6ème journée Claude Huriet de la recherche biomédicale 2010** - Nancy - France

II. Publication

Sarah El Hajj Chehadeh, Grégory Pourié, Nicolas Martin, Jean-Marc Alberto, Jean-Luc Daval†, Jean-Louis Guéant*† and Brigitte Leininger-Muller*. Gestational methyl donor deficiency alters key proteins involved in neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs of newborn female rats and is associated with impaired olfactory performance. British Journal of Nutrition. Submitted 13 May 2013 – Final revision received 25 September 2013 – Accepted 25 September 2013). (Sous Presse).

ANNEXES

British Journal of Nutrition, page 1 of 11
doi:10.1017/S0007114513003553
© The Authors 2013

Gestational methyl donor deficiency alters key proteins involved in neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs of newborn female rats and is associated with impaired olfactory performance

Sarah El Hajj Chehadeh, Grégory Pourié, Nicolas Martin, Jean-Marc Alberto, Jean-Luc Daval†, Jean-Louis Guéant*† and Brigitte Leininger-Muller*

Inserm U954, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54500, France

(Submitted 13 May 2013 – Final revision received 25 September 2013 – Accepted 25 September 2013)

Abstract

Gestational methyl donor deficiency (MDD) leads to growth retardation as well as to cognitive and motor disorders in 21-d-old rat pups. These disorders are related to impaired neurogenesis in the cerebral neurogenic areas. Olfactory bulbs (OB), the main target of neuronal progenitors originating from the subventricular zone, play a critical role during the postnatal period by allowing the pups to identify maternal odour. We hypothesised that growth retardation could result from impaired suckling due to impaired olfactory discrimination through imbalanced apoptosis/neurogenesis in the OB. Since neurosteroidogenesis modulates neurogenesis in OB, in the present study, we investigated whether altered neurosteroidogenesis could explain some these effects. Pups born to dams fed a normal diet (*n* 24) and a MDD diet (*n* 27) were subjected to olfactory tests during the lactation and weaning periods (*n* 24 and 20, respectively). We studied the markers of apoptosis/neurogenesis and the expression levels of the key neurosteroidogenic enzyme aromatase, the cholesterol-transfer protein StAR (steroidogenic acute regulatory protein) and the ERα oestrogen receptor and the content of oestradiol in OB. The 21-d-old MDD female pups displayed lower body weight and impaired olfactory discrimination when compared with the control pups. MDD led to greater homocysteine accumulation and more pronounced apoptosis, along with impaired cell proliferation in the OB of female pups. The expression levels of aromatase, StAR and ERα as well as the content of oestradiol were lower in the OB of the MDD female pups than in those of the control female pups. In conclusion, gestational MDD may alter olfactory discrimination performances by affecting neurogenesis, apoptosis and neurosteroidogenesis in OB in a sex-dependent manner. It may be involved in growth retardation through impaired suckling.

Key words: Methyl donor deficiency: Neurosteroids: Olfactory bulbs: Olfactory discrimination

Methyl donor deficiency (MDD) leads to the accumulation of the toxic amino acid homocysteine (Hcy), which is associated with neural tube defects, intra-uterine growth retardation in the progeny[1] and neurodegenerative diseases in adulthood[2]. The accumulation of Hcy can affect neurogenesis and synaptic plasticity during brain development[3]. Reduced neuroprogenitor proliferation and increased apoptosis occur in the fetal brain of folate-deficient rodents during late gestation[4]. Indeed, Hcy is a metabolite of the essential amino acid methionine and can either be remethylated to methionine by enzymes requiring folate or vitamin B_{12} or be catabolised by cystathionine β-synthase to generate cysteine. In an animal model based on rats born to dams fed a MDD diet during gestation and lactation[5–8], hallmarks of increased apoptosis were observed in selective brain structures of the 21-d-old progeny including the cerebellum and the pyramidal neurons of Cornu Ammonis (CA1) region as well as the main areas of persisting brain neurogenesis, i.e. the dentate gyrus in the hippocampus and the subventricular zone. The 21-d-old animals exhibited locomotor coordination impairment and cognitive defects, which mostly persisted in adulthood despite the restoration of normal diet feeding after weaning. Deficient pups also displayed growth retardation with dramatically reduced body weight[5,6] and visceral manifestations of fetal programming[9,10]. We had also reported that some of these deleterious effects on growth could be linked to the MDD

Abbreviations: ER, oestrogen receptor; Hcy, homocysteine; MDD, methyl donor deficiency; OB, olfactory bulbs; SAH, *S*-adenosylhomocysteine; SAM, *S*-adenosylmethionine; StAR, steroidogenic acute regulatory protein.

* **Corresponding authors:** J.-L. Guéant, fax +33 3 83 68 32 79, email jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr; B. Leininger-Muller, email brigitte.leininger@univ-lorraine.fr

† These authors contributed equally.

British Journal of Nutrition

British Journal of Nutrition

consecutive remodelling of gastric cellular organisation leading to ghrelin dysfunction[11]. This hormone plays a significant role in growth through its dual role as a growth hormone-releasing factor and as an orexigenic peptide[12].

Apoptosis in selective brain structures could also be involved in abnormal feeding behaviour and explain the dramatic growth retardation of MDD pups during the suckling period. Indeed, feeding disorders could be related to impaired olfactory discrimination, which plays a central role during the breast-feeding period. Early olfactory experience is critical for survival, and olfactory bulbs (OB) play a critical role during the postnatal period by allowing the pups to identify maternal odour[13,14]. Newborn rats rapidly learn to identify maternal odours following the binding of noradrenaline to β-adrenoreceptors in the OB resulting from tactile stimulation[15]. OB are defined as postnatal neurogenesis areas because subventricular zone neuronal progenitors migrate to these areas via the rostral migratory stream where they differentiate into bulbar interneurons. In rodents, the increased neurogenesis occurring in OB during pregnancy and the lactation period is essential for maternal care and offspring recognition[16].

Neurogenesis is closely related to neurosteroidogenesis. Besides their classical association with the neuroendocrine regulation of reproduction and sexual behaviour, most of the so-called neurosteroids originating from local brain synthesis are involved in developmental and adult cerebral plasticity[17]. The synthesis of neurosteroids involves the recruitment of the rate-limiting step StAR protein (steroidogenic acute regulatory protein), which transfers cholesterol into the mitochondrial inner membrane to reach the cholesterol side-chain cleavage enzyme (CYP11A1) to transform it into pregnenolone[18,19]. StAR is widely distributed in the adult brain, especially in the neurogenic areas including OB[20,21]. The androgen-to-oestrogen-converting enzyme cytochrome P450 aromatase (CYP19) represents the key enzyme of neurosteroidogenesis[22]. The resulting oestradiol can modulate neurogenesis in the subventricular zone[23] by allowing the recruitment of newborn cells in OB. This bears out the influence of oestradiol in olfactory discrimination.

In this context, in the present study, we investigated whether gestational MDD could affect olfactory performance through increased apoptosis and lower rates of neurogenesis in OB. For this purpose, 21-d-old rats born to dams fed a MDD diet and those born to dams fed a normal diet during the gestation and lactation periods were subjected to behavioural tests evaluating olfaction. Later, for the first time, in association with the classical determinants of Hcy metabolism, the expression levels of aromatase and the cholesterol-transfer protein StAR as well as oestrogen receptor (ER)α and the consecutive oestradiol content were monitored in the OB of the MDD pups and compared with those of the control pups.

Materials and methods

Animals

Experiments were carried out in Wistar rats (Janvier) in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Adult female rats were maintained under standard laboratory conditions, under a 12 h light–12 h dark cycle, with access to food and water ad libitum. The rats were fed either a standard diet (Maintenance diet M20; Scientific Animal Food and Engineering) or a folate and choline-deficient diet 1 month before pregnancy, as described previously[6,7] (Special Diet Service). The assigned diets were fed until weaning of the offspring at postnatal day 21.

Behavioural evaluation of olfaction

To monitor the acquisition of olfactory recognition in pups of dams fed the MDD diet (n 27) or the normal diet (n 24), their ability to return to their home cage successfully by means of environmentally sensitive information was recorded in a T-maze between postnatal days 5 and 19[24]. The animal model of gestational MDD is standardised and is widely used in different research projects. The differences between the number of weighed animals and that finally included in the behavioural tests are explained by the fact that a few of the animals were used for other protocols in the laboratory.

At each time point of postnatal development (see the Results section), each pup was subjected to a one-trial test consisting in behaving freely in a T-maze area (two arms of 30 cm length, walls of 10 cm height and a corridor of 5 cm width). The home cage (without the mother rat) of each pup was positioned at the end of one arm and a clean cage of the same size was positioned at the end of the other arm. These two cages were randomly placed between the right and left sides of the maze, and the corridors were carefully washed after each experiment. The test was considered successful when a pup returned directly to its home cage without visiting the arm containing the clean cage or without returning to the starting arm. The maximum time allowed for a pup to return to its home cage was 2 min. The time taken by the pups to reach the home cage was recorded. If a pup did not find its home cage within the allocated time, the maximum time (2 min) was affected.

Discrimination abilities at the time of weaning were tested through a place-preference test carried out in 21-d-old MDD (n 20) and control (n 24) pups. In accordance with previous studies[25,26], avoidance response to the irritant odour of toluene was evaluated in a corridor maze (80 cm in length, 8 cm in breadth and 15 cm in height). Both ends of the corridor contained a watch glass with a filter paper soaked in 15 μl of either pure toluene or distilled water (used as control). Toluene odour and water were randomly distributed in the right and left sides of the maze during each test. The odorant compartments were closed with a grid to avoid contact and covered to avoid the dispersion of odour. Each pup was placed in the middle of the corridor, facing a wall, and then allowed to move freely for 5 min. The movements of the pups were video-recorded and analysed with a video tracking system for automation of the behavioural experiments (View Point). Data on the total duration spent by each pup in each part of the corridor divided into three equal zones, defined as the

repulsive toluene zone, the neutral central zone and the control water zone, were collected.

Tissue collection

Rat pups were weighed and killed at postnatal day 21 with an overdose of isoflurane. Whole brains were rapidly harvested. For immunohistochemical analyses, brains were immediately frozen in methylbutane previously chilled to −30°C and stored at −80°C. For biochemical analysis, brains were rapidly collected. The OB were dissected before freezing in liquid N_2 and stored at −80°C.

Isolation of mitochondrial and microsomal fractions

The mitochondrial and microsomal fractions of OB were isolated according to the following protocol. The samples were homogenised (1 g of tissue/3 ml buffer) in the isolation medium (0·32 M-sucrose, 10 mM-Tris–HCl and 1 mM-EDTA, pH 7·4). The homogenates were centrifuged at 2000 ***g*** for 3 min at 4°C (TLX ultracentrifuge OptimaTM, Beckman), and the pellet containing nuclei and cell debris was discarded. Centrifugation of the supernatant at 12 500 ***g*** for 10 min at 4°C resulted in a new supernatant, which was retained for the isolation of microsomes. The pellet was resuspended in the isolation medium and centrifuged at 11 000 ***g*** at 4°C for 10 min. The mitochondrial fraction was pelleted by additional centrifugation at 10 000 ***g*** for 10 min and suspended in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (136 mM-NaCl, 1·7 mM-KH_2PO_4, 10 mM-Na_2HPO_4, 1 % Tergitol (v/v), 0·5 % deoxycholate (w/v), 0·1 % SDS (w/v), 100 mM-Na_3VO_4, 57 mM-phenylmethylsulfonyl fluoride and 0·14 % protease inhibitor) such that the mitochondrial fraction extracted from 0·1 g of brain tissue was suspended in 0·5 ml of RIPA buffer.

For the isolation of microsomal fractions, the supernatant collected previously was centrifuged at 15 000 ***g*** for 20 min at 4°C; the pellet was discarded and the supernatant was centrifuged again at 105 000 ***g*** for 90 min at 4°C. The microsomal pellet was resuspended in the storage buffer (80 mM-K_2HPO_4, 19 mM-KH_2PO_4, 0·2 mM-EDTA and 20 % glycerol (v/v), pH 7·4) such that 1 ml of suspension contained a microsomal fraction extracted from 3 g of tissue. The protein concentration of the subcellular fractions was assessed using a bicinchoninic acid protein determination kit (Interchim) with bovine serum albumin as a standard.

Measurement of vitamin B_{12}, folate, S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine concentrations

The concentrations of vitamin B_{12} and folate were measured using a radioisotope dilution assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals) as described previously[27]. The concentrations of the classical determinants of Hcy metabolism in tissue homogenates were measured using HPLC adapted from Luippold *et al.*[28]. *S*-Adenosylmethionine (SAM) is demethylated to form *S*-adenosylhomocysteine (SAH) and Hcy is generated from the hydrolysis of SAH. Proteins were precipitated with 0·2 M-$HClO_4$ before injection into the column (Lichrospher, 100 RP-C18, 5 μm, 250 × 4 mm inner diameter; Interchim). The mobile phase, consisting of 50 mM-sodium phosphate (pH 3·2), 10 mM-heptane sulfonate and acetonitrile (10–20 % from 0 to 20 min), was applied at a flow rate of 0·75 ml/min. The concentrations of SAM and SAH were quantified using a UV detector set at 254 nm.

DNA methylation

Global DNA methylation was quantified in the tissular extracts of OB obtained from male (n 5) and female (n 5) pups of the MDD diet-fed dams and pups of the normal diet-fed dams (n 5, respectively) using the Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit (Epigentek, Euromedex), as described previously[29]. Briefly, the methylated fraction of DNA is recognised by a 5-methylcytosine antibody and quantified through an ELISA-like reaction. The amount of methylated DNA is proportional to the intensity of absorbance.

Immunohistochemical analyses

Immunohistochemical analyses were carried out on cryostat-generated 20 μm sagittal brain sections mounted onto glass slides. For immunostaining, tissue sections previously fixed in 4 % paraformaldehyde (Sigma) were kept for 15 min at room temperature and were incubated for 10 min in PBS solution containing 0·1 % of Triton X-100. After washing the tissue sections three times with PBS for 5 min, non-specific binding was blocked with bovine serum albumin (10 %, w/v) dissolved in PBS and incubation was carried out for 1 h. The tissue sections were incubated for 72 h at 4°C with polyclonal rabbit antibodies against Hcy (1:200 dilution; Millipore), StAR (1:200 dilution; kindly provided by Professor D. Stocco, Texas Tech University), aromatase (1:200 dilution; Bio-Vision Research Products) and oestradiol (1:200 dilution; US Biological) or a polyclonal mouse antibody against ERα (1:200 dilution; Santa Cruz Biotechnology). We used the monoclonal rabbit cleaved anti-caspase 3 antibody (1:200 dilution; Cell Signaling Technology) for the specific detection of apoptosis. The expression of the Ki-67 protein specifically associated with cell proliferation was analysed in OB sections using a polyclonal rabbit antibody against Ki67 (1:200 dilution; Abcam).

The tissue sections were then incubated for 1 h at room temperature in the presence of a secondary antibody (donkey anti-rabbit or donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor, 1:2000; Molecular Probes).

Cell nuclei were stained with the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (5 μg/ml in distilled water). The tissue sections were then washed three times with PBS, coverslipped using Fluoromount mounting medium (Sigma) and kept in the dark until fluorescence analysis. The tissue sections were observed with a fluorescence microscope (Olympus) at ×20 magnification. The pictures were digitised with a monochromatic camera and analysed using the cellF software (Olympus).

British Journal of Nutrition

Table 1. Body weight (g) at weaning of 21-d-old rat pups born to dams fed a methyl donor-deficient (MDD) or a normal diet (Mean values and standard deviations, *n* 20 pups per group)

	Females		Males	
	Mean	SD	Mean	SD
Control	39·72	3·08	39·25	4·10
MDD	17·32***	4·39	21·86***	4·85

***Mean values were significantly different from the control rat pups for each sex ($P<0·0001$, ANOVA).

Western blot analyses

The dissected cerebral regions were solubilised 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), lysed by three cycles of freezing/thawing and finally centrifuged at 4°C for 30 min at 15 000 ***g***. The concentrations of proteins in the supernatant were determined using the BCA Protein Assay Kit (Interchim). Samples were mixed with an equal volume of 2× Laemmli buffer and denatured by heating for 5 min at 100°C.

Mitochondrial fractions (30 μg of protein) for StAR detection, microsomal fractions (30 μg of protein) for aromatase detection and tissular extracts (50 μg of protein) for ERα detection were run on SDS–PAGE (10–12 %; Bio-Rad Mini Protean 3; Bio-Rad Laboratories, Inc.)[30] and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-PS2, Millipore Corporation) in Tris–glycine transfer buffer with 20 % ethanol in a miniblotter (Bio-Rad Laboratories, Inc.). After being blocked in 5 % non-fat dry milk in Tris-buffered saline solution (200 mM-Tris and 1·5 M-NaCl, pH 7·4) and 0·1 % Tween 20 for 1 h under shaking, the membranes were incubated with various antibodies at 4°C overnight. The antibodies against StAR (1:1000 dilution), aromatase (1:1000 dilution) and ERα (1:200 dilution) were used for immunoblotting.

A horseradish peroxidase-labelled donkey anti-rabbit IgG against StAR and aromatase or anti-mouse IgG against ERα (1:2000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) were used as secondary antibodies (incubation for 1 h at room temperature). Immunoreactivity was detected using a chemiluminescence kit (ECL Plus, Amersham Biosciences) and a chemiluminescence detector (Fusion FX7, Thermo Fisher Scientific). To normalise the total amount of protein per lane, the membranes were stripped and incubated with a monoclonal goat antibody against β-actin for StAR (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) or a monoclonal chicken antibody against GAPDH for aromatase and ERα (1:1000 dilution; Millipore). Peroxidase-labelled donkey anti-goat IgG (1:2000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) or peroxide-labelled donkey anti-chicken IgG (1:2000 dilution; Santa Cruz Biotechnology) were used as secondary antibodies. Densitometric analysis of the intensity of the Western blot bands was carried out using the Image J1.44p software (Freeware; nih.gov).

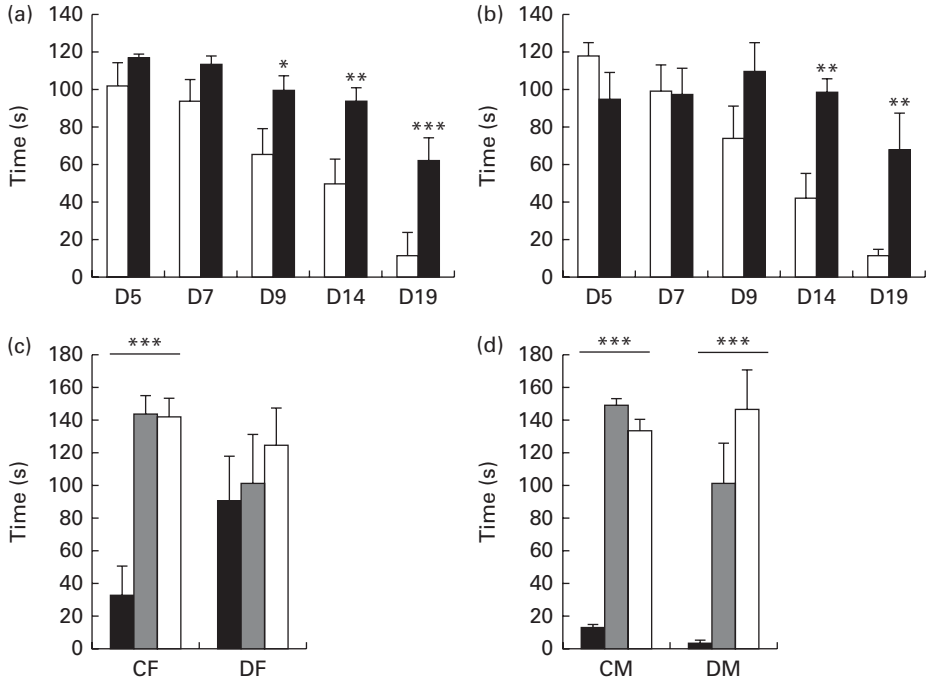


Fig. 1. Behavioural evaluation of olfaction between postnatal days 5 and 19. Time required for (a) female pups and (b) male pups to reach the home cage at postnatal days 5 (D5), 7 (D7), 9 (D9), 14 (D14) and 19 (D19). CM (□), control males (*n* 12); DM (■), deficient males (*n* 10); CF (□), control females (*n* 12); DF (■), deficient females (*n* 17). Values are means, with standard deviations represented by vertical bars. Mean values were significantly different from the control pups: * $P<0·05$, ** $P<0·01$, *** $P<0·001$ (ANOVA). Time spent in each zone of the corridor by (c) female pups and (d) male pups. ■, Toluene zone (tol); ▩, water zone (water); □, central zone (central). ANOVA summary: for CF, *n* 12, $F(2,24) = 21·2$, and ***$P<0·0001$ for tol *v.* central and tol *v.* water; for DF, *n* 8, $F(2,21) = 0·199$, and $P>0·5438$ for tol *v.* central and tol *v.* water; for CM, *n* 12, $F(2,45) = 104·0$, and ***$P<0·0001$ for tol *v.* central and tol *v.* water; for DM, *n* 12, $F(2,24) = 22·4$, and ***$P<0·0001$ for tol *v.* central and tol *v.* water.

British Journal of Nutrition

Quantitative real-time RT-PCR analysis

After grinding rat brain tissues in liquid N_2, total RNA was isolated using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. RNA content was quantified by spectrophotometry at 260 nm (Microdrop, multiskan GO, X7, Thermo Fisher Scientific) and analysed by 2 % agarose gel electrophoresis. The first complementary DNA strand was reverse-transcribed from total RNA (1 μg) using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

Real-time PCR was carried out on the Lightcycler 2.0 Instrument (Roche Diagnostics) using the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Specific amplification of mRNA coding for StAR, P450 aromatase and ERα was carried out with specific pairs of primers. For *StAR* mRNA, 5′-AGGAAAGCCAGCAGGAGAAT-3′ and 5′-CTGTCCATGGGCTGGTCTA-3′ were used as the forward and reverse primers, respectively. For aromatase mRNA, 5′-TTGATTTTCGCTGAGAGACG-3′ and 5′-ACAGAGTGACGGACATGGTG-3′ were used as the forward and reverse primers, respectively. For *ERα* mRNA, 5′-ATGTGTCCAGCTACAAACCAA-3′ and 5′-CGTATCCCGCCTTTCATC-3′ were used as the forward and reverse primers, respectively. The internal control, a 90 bp product of polymerase II, was amplified using the forward primer 5′-GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC-3′ and the reverse primer 5′-GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG-3′. Temperature cycling consisted of one cycle to activate Taq DNA polymerase (95°C; 15 min), followed by forty-three cycles, each consisting of denaturation (95°C; 10 s), annealing (53°C for StAR and 56°C for both P450 aromatase and ERα; 15 s), and extension (72°C; 10 s) steps. Melting curve analyses were carried out by raising the temperature from 65 to 95°C. Cycle threshold (C_t) was determined for each sample, and real-time PCR amplification efficiencies were obtained by calculating the ratio of crossing points of amplification curves, using the RelQuant software (Roche Diagnostics).

Statistical analysis

Data were prospectively collected and analysed using the SAS software (SAS Institute, Inc.). Raw data reported as means and standard deviations were compared using one-way ANOVA with Fisher's test. A P value $< 0{\cdot}05$ was considered to indicate statistical significance.

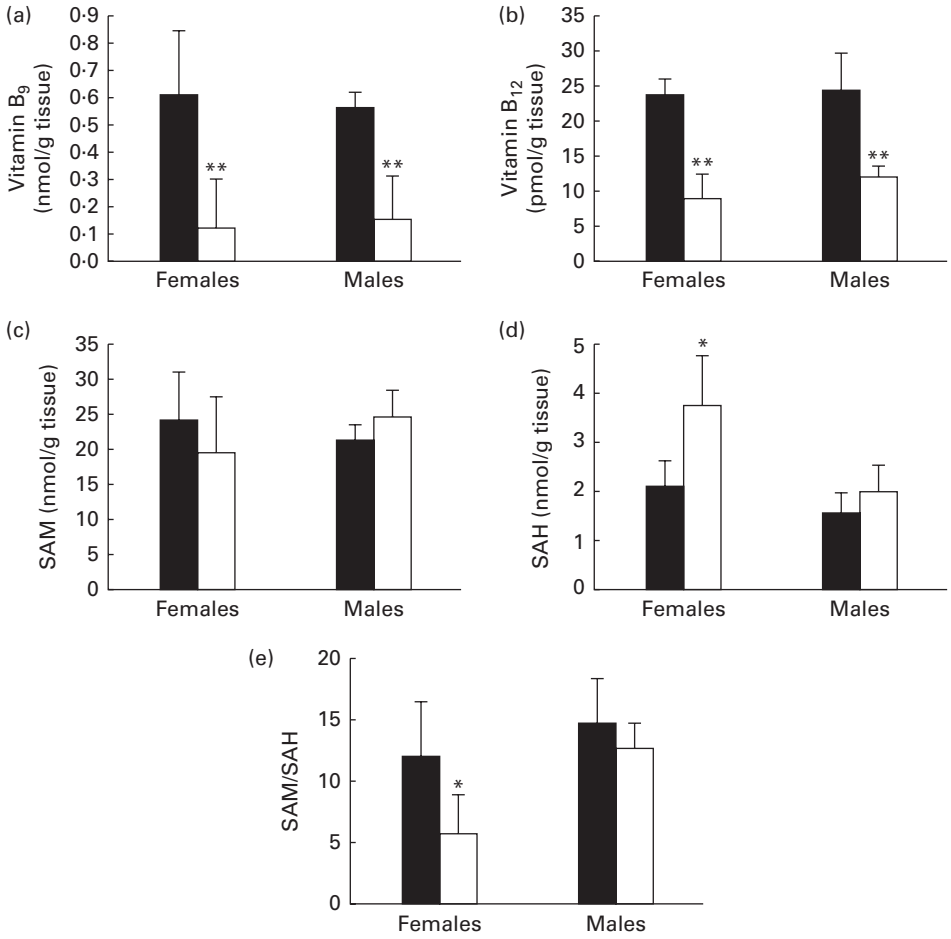


Fig. 2. Concentrations of (a) vitamin B_9, (b) vitamin B_{12}, (c) *S*-adenosylmethionine (SAM), and (d) *S*-adenosylhomocysteine (SAH) and (e) SAM:SAH ratio in olfactory bulbs of 21-d-old rat pups. Values are means, with standard deviations represented by vertical bars, n 5 per group. Mean values were significantly different from the control pups: * $P<0{\cdot}05$, ** $P<0{\cdot}01$ (ANOVA). ■, Control; □, methyl donor-deficient.

Results

Effect of the methyl-donor-deficient diet on the body weight of newborn rats

During weaning, the body weight of female and male pups born to the MDD diet-fed dams was lower than that of pups born to the normal diet-fed dams (Table 1). The difference in weight between pups of the normal diet fed-dams and those of the MDD diet-fed dams was significantly higher ($P<0{\cdot}01$) in the females (56·4 %) than in the males (44·3 %). A smaller size of the MDD pups was also recorded, as reported previously[5].

Olfactory discrimination behavioural tests

The newborn rats were subjected to olfactory discrimination tests. Fig. 1(a) and (b) shows that the olfactory nest recognition ability of the deficient pups was affected irrespective of the sex. The acquisition of olfactory cues to return to their own nest was revealed by the shorter time taken to complete the test by both the control male and female pups between postnatal days 5 and 19 (from up to 100 s to less than 20 s). Despite a drop being achieved only by the end of the suckling period (postnatal day 19) in the deficient pups, the time necessary to complete the test remained higher than that in the control pups, starting at postnatal day 9 for the females and postnatal day 14 for the males.

Fig. 1(c) and (d) also shows that the discrimination ability for a repulsive odorant, i.e. toluene, was significantly affected in the deficient female pups than in the control pups. Such a difference was not recorded in the male pups. The control female pups spent only 10 % of their time near the toluene source compared with the 90 % that they spent away from it ($F(2,24) = 21{\cdot}2$; $P<0{\cdot}0001$). By contrast, female pups born to the MDD diet-fed dams spent up to 28 % of their time, evenly distributed among the three zones of the corridor, in the toluene zone ($F(2,21) = 0{\cdot}199$; $P>0{\cdot}5438$). By contrast, no sizeable differences were recorded in the male pups, since both the control and deficient pups succeeded in the discrimination test by spending only 5 and 2 % of their time in the toluene zone, respectively ($F(2,45) = 104{\cdot}0$; $P<0{\cdot}0001$ and $F(2,24) = 22{\cdot}4$; $P<0{\cdot}0001$, respectively).

S-Adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio and vitamin concentrations in olfactory bulbs

The male and female pups born to the MDD diet-fed dams exhibited significantly lower concentrations of folate (Fig. 2(a)) and vitamin B_{12} (Fig. 2(b)) in the OB. The measurements of the determinants of Hcy metabolism indicated that, irrespective of the sex, there was no substantial variation in the concentrations of SAM (Fig. 2(c)). Yet, the concentrations of SAH were significantly higher in the OB of the

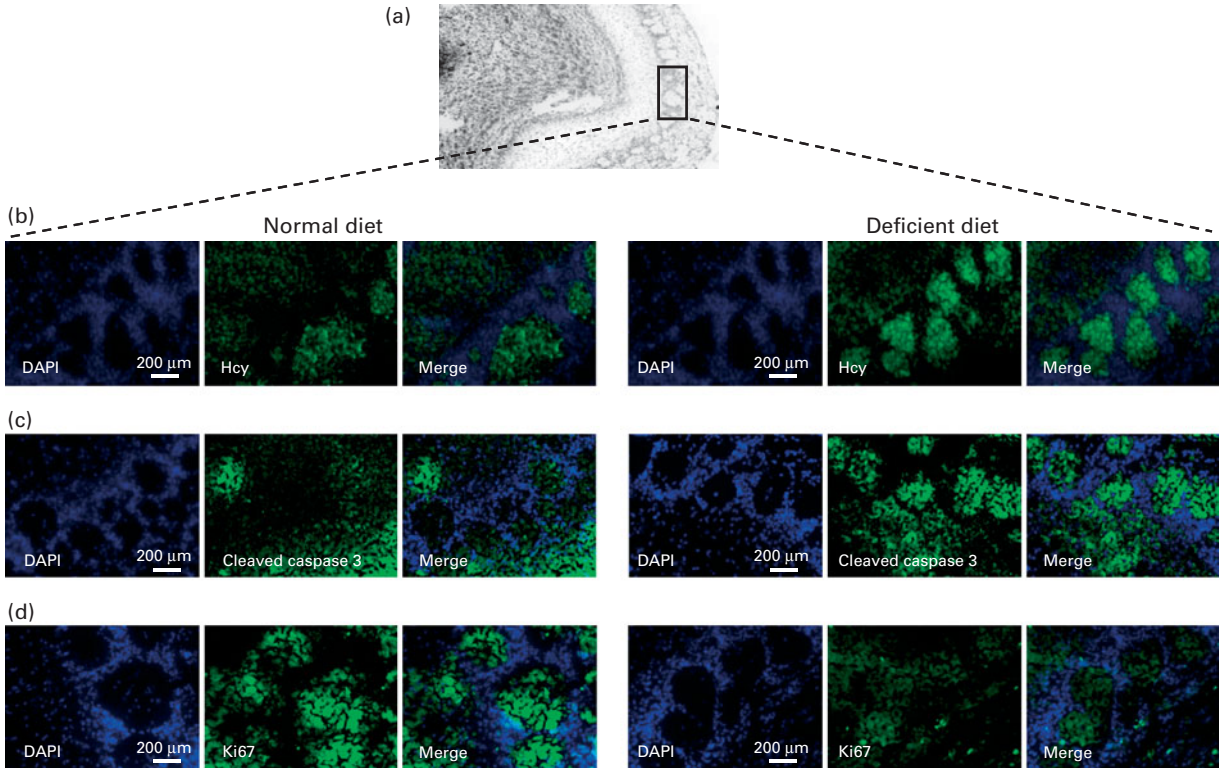


Fig. 3. Immunostaining of homocysteine (Hcy), cleaved caspase 3 and Ki67 in the olfactory bulbs (OB) of 21-d-old female pups. (a) Image of the whole OB representing the glomerular cell layer. (b) Immunostaining of Hcy (green), (c) cleaved caspase 3 (green) and (d) Ki67 in the sagittal sections of OB. The cell nuclei of glomerular cells were stained with the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue). While the immunostaining of cleaved caspase 3 was more elevated, reflecting increased apoptosis in the OB of the methyl-donor-deficient female pups than in those of the control pups, labelling of Ki67 was almost undetectable, suggesting decreased cell proliferation. *n* 5 per group. Calibration bars = 200 µm. Original magnification ×20.

British Journal of Nutrition

MDD female pups than in those of the control female pups (Fig. 2(d)). The SAM:SAH ratio was consequently lower in the OB of the MDD female pups (Fig. 2(e)). Furthermore, global DNA methylation was reduced by 19·34 % in the OB of the deficient pups compared with the levels in the control female pups. No variation was observed between the control and MDD male pups.

Homocysteine accumulation, apoptosis and cell proliferation in the olfactory bulbs of young rats

Hcy was detected in the glomerular cell layer of OB (Fig. 3(a)) and more specifically in the basal and apical dendrites. A strong accumulation of Hcy was observed in the OB of female pups born to the MDD diet-fed dams than in those of pups born to the normal diet-fed dams (Fig. 3(b)). This was not observed in the brain sections of the male pups (data not shown). The labelling of OB cells with a specific indicator of apoptosis, the antibody against cleaved caspase 3, revealed a low immunoreactivity in the glomerular cells of 21-d-old control female pups. It was dramatically higher in the OB sections of the deficient female pups (Fig. 3(c)). Cell proliferation was evaluated using the anti-Ki-67 antibody. As expected, the immunoreactivity of Ki-67 was nearly undetectable in the glomerular cell layer of OB of female pups born to the MDD diet-fed dams when compared with that in the pups born to the normal diet-fed dams (Fig. 3(d)).

Expression of steroidogenic acute regulatory protein, aromatase, and oestrogen receptor α and immunostaining of oestradiol

Immunohistochemical staining with anti-StAR (Fig. 4(a)), anti-aromatase (Fig. 4(b)) and anti-ERα (Fig. 4(c)) antibodies revealed the most intense immunoreactivity in the basal and apical dendrites of the glomerular cell layer of OB in 21-d-old pups. The immunoreactivity of the three proteins was weaker in the OB of the deficient female pups. As a consequence, the immunoreactivity of oestradiol was lower in the glomerular cells of 21-d-old female pups of the MDD diet-fed dams (Fig. 4(d)).

Changes in the expression levels of StAR, aromatase and ERα were confirmed by Western blot analyses. A single band was observed for StAR in the mitochondrial fractions isolated from the OB, as illustrated in Fig. 5(a). Densitometric analysis indicated a substantial decrease in the levels of both mitochondrial StAR protein (Fig. 5(a)) and ERα (Fig. 5(c)) in female pups of the MDD diet-fed dams, which reached 60 % in the case of StAR, when compared the levels in pups of the normal diet-fed dams. A slighter but non-significant decline was observed in the control and deficient male pups. The expression of aromatase protein measured in the microsomal fractions of OB of the deficient female pups was also significantly lower. No difference was found between the MDD and control male pups (Fig. 5(b)).

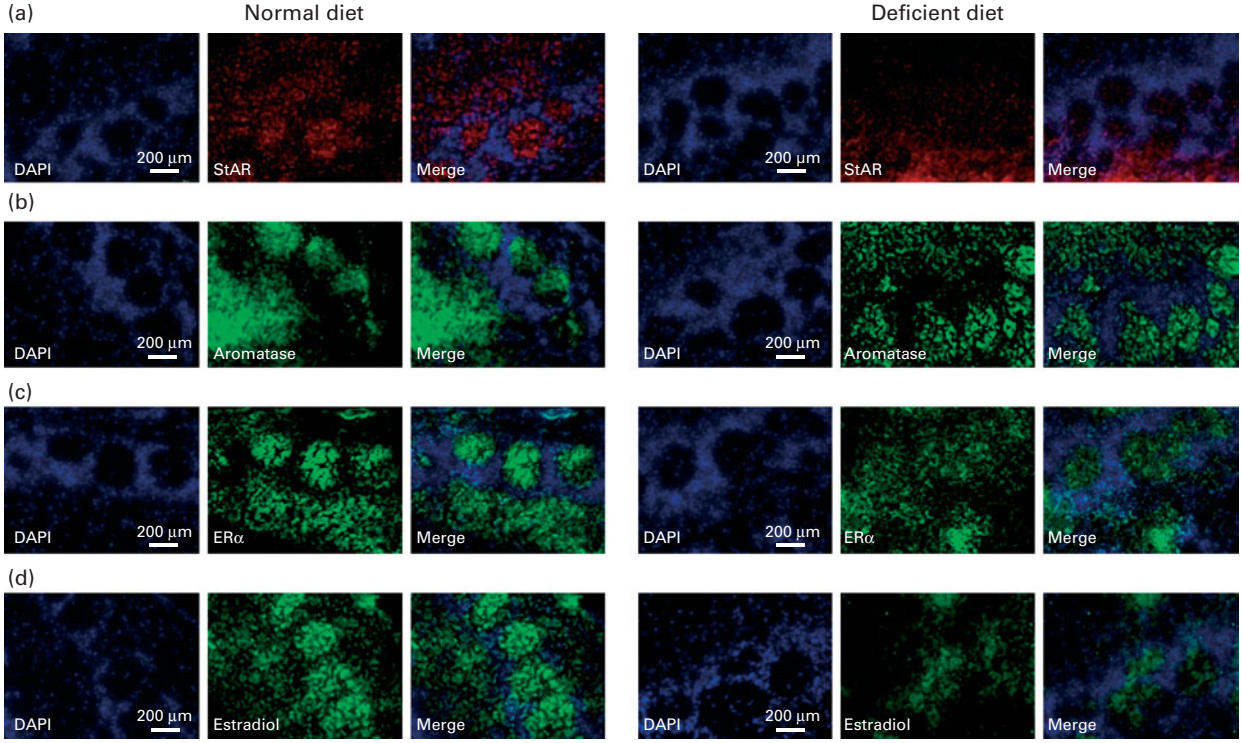


Fig. 4. Immunostaining of steroidogenic acute regulatory protein (StAR), aromatase, oestrogen receptor α (ERα and oestradiol in the olfactory bulbs (OB) of 21-d-old female pups. (a) Immunostaining of StAR (red), (b) aromatase (green), (c) ERα (green) and (d) oestradiol (green) in the sagittal sections of OB. The cell nuclei of glomerular cells were stained with the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue). Immunoreactivity of the three proteins and oestradiol was lower in the OB of the methyl-donor-deficient female pups than in those of the control pups. *n* 5 per group. Calibration bars = 200 µm. Original magnification ×20.

British Journal of Nutrition

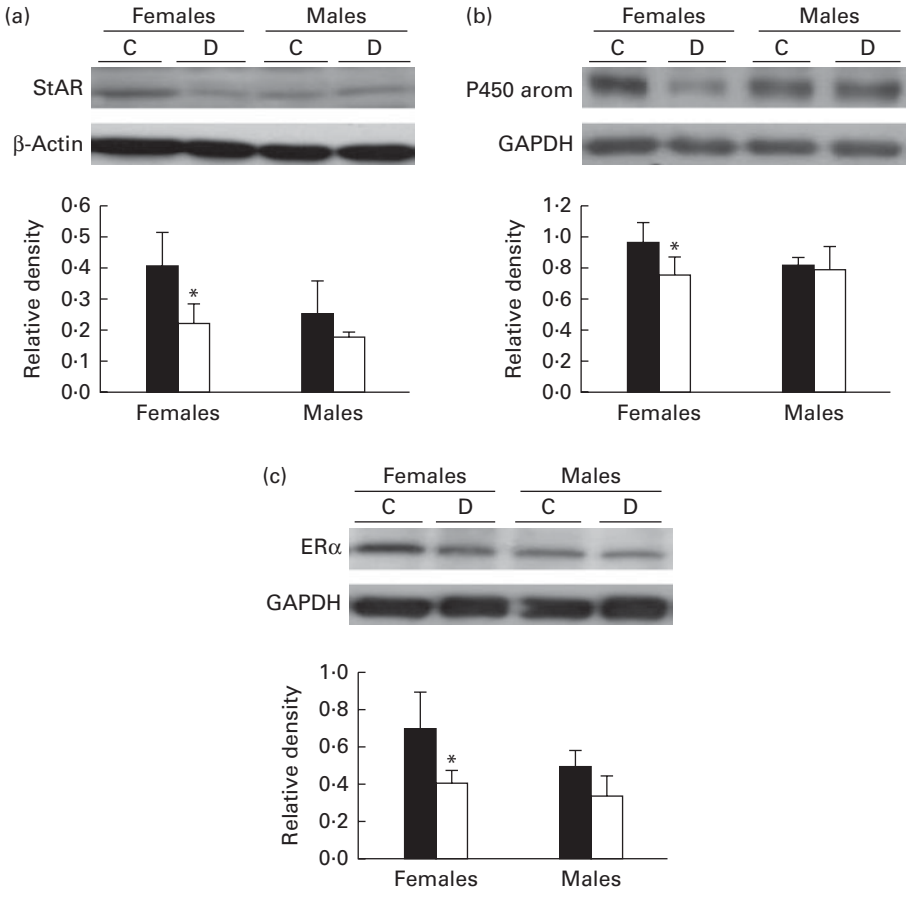


Fig. 5. Effect of the methyl donor-deficient diet on the expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR), aromatase and oestrogen receptor α (ERα proteins in the olfactory bulbs (OB) of 21-d-old pups. (a) Representative set of Western blot showing immunodetectable StAR protein. From left to right, the lanes contain mitochondria from the OB (30 μg protein) of the 21-d-old control (C, ■) and deficient (D, □) female and male pups. Expression of StAR (30 kDa) was quantified and normalised against that of β-actin (43 kDa). (b) Representative set of Western blot showing immunodetectable P450 aromatase protein. The lanes contain microsomes isolated from the OB (30 μg protein) of the 21-d-old C and D pups. Expression of P450 aromatase (55 kDa) was quantified and normalised against that of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (38 kDa). (c) Representative set of Western blot showing immunodetectable ERα protein. The lanes contain proteins from the OB (50 μg protein) of the 21-d-old C and D pups. Expression of ERα (66 kDa) was quantified and normalised against that of GAPDH. Densitometric data were obtained from five separate experiments (*n* 5 per group). Values are means, with standard deviations represented by vertical bars. * Mean values were significantly different from the control pups ($P<0·05$; ANOVA).

To examine the consequences of MDD on gene expression, the mRNA levels of *StAR*, aromatase and *ERα* were quantified in the OB of 21-d-old rat pups by quantitative RT-PCR analysis. There was no significant difference in the levels of the three proteins in the deficient male pups when compared with the levels in the control pups (Fig. 6). The mRNA level of *StAR* varied in the same manner as protein contents, and the mRNA expression of *StAR* measured in 21-d-old female pups born to the MDD diet-fed dams was significantly lower than that in female pups born to the normal diet-fed dams (Fig. 6(a)). Similarly, the mRNA expression of aromatase (Fig. 6(b)) and *ERα* (Fig. 6(c)) in the OB of the deficient female pups was lower.

Discussion

Pups born to the MDD diet-fed dams exhibited lower body weight and impaired olfactory discrimination when compared with those born to the normal diet-fed dams. The exposure to the MDD diet during gestation and lactation was associated with significantly lower concentrations of vitamins B_9 and B_{12} in the OB of 21-d-old pups. Vitamin B_{12} acts as a cofactor of the methionine synthase enzyme, which is involved in the synthesis of methionine, the precursor of SAM, which is the universal methyl donor. SAM is transmethylated into SAH and Hcy originates from SAH hydrolysis. Thus, it is easily understandable that a lack of nutritional intake of B vitamins will affect Hcy metabolism[5]. The concentrations of the classical determinants of Hcy metabolism have been reported previously for whole-brain homogenates, and enhanced concentration of total SAH associated with unchanged SAM concentrations have been measured[6]. In the present study, we demonstrated for the first time that the concentrations of SAH were significantly higher in the OB of only female rats, with a consecutively reduced index of methylation capacity represented by the SAM:SAH ratio. This is in accordance with the lower amounts of methylated DNA quantified in the OB of the MDD female pups.

Hcy is a potent neurotoxic and pro-apoptotic compound, and its accumulation in neuronal cells has been reported

to be associated with neurodegenerative diseases and with cognitive defects in the elderly[2]. An association of cerebral accumulation of Hcy with functional defects as well as the hallmarks of apoptosis in hippocampal neurogenic areas has been reported previously[6,7]. Sustained Hcy immunoreactivity, concomitantly with both an increasing number of cells undergoing apoptosis and an impairment of cell proliferation in the glomerular cell layer of OB of the deficient pups, suggests that MDD also affects the OB of newborn rats.

We have recently hypothesised that MDD occurring in early life could be associated with altered synaptic plasticity and neurogenesis[3]. The postnatal period is crucial as neurogenesis is achieved around the third postnatal week in rats[31], which corresponds to the age of the pups assessed in the present study. During this period, high concentrations of ER are present in OB, whereas *ERα* transcripts are undetectable in adulthood[32]. Moreover, the early postnatal period is characterised by a strong effect of oestrogens on neurogenesis and survival of OB neurons, whereas in adulthood oestrogens control both the survival of neurons and their functional integration[33]. In the present study, we demonstrated that MDD impaired the critical steps of the neurosteroidogenic pathway, specifically only in female rats, by decreasing both the protein and transcription levels of StAR, aromatase and ERα in the OB. The reduced detection of oestradiol in the glomerular cell layer of OB appears to be a consequence of these changes and strengthens the hypothesis that the decrease in the expression levels of StAR, aromatase and ERα leads to poor neurosteroidogenesis in the OB of the deficient pups. These harmful effects of MDD on the synthesis of cerebral steroids are not surprising, since previous studies have reported an association between folate and steroid metabolism. In this respect, preconception folate deficiency affects fertility and follicular response to ovarian stimulation in association with depleted levels of oestradiol. According to the authors, this could result from the impaired methylation of aromatase DNA[34].

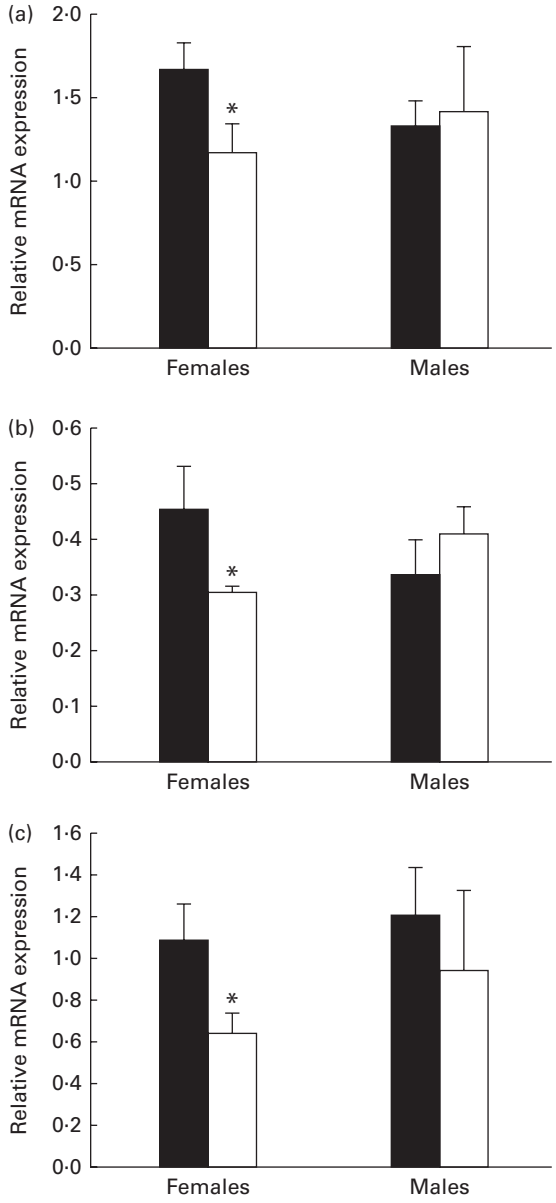


Fig. 6. Results of the quantitative RT-PCR analysis of the effect of the methyl donor-deficient diet on the expression of (a) steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*), (b) aromatase and (c) oestrogen receptor α (*ERα* mRNA in the olfactory bulbs of 21-d-old female rats. Arbitrary unit refers to an internal standard in the olfactory bulbs of the control (■) and deficient (□) pups (*n* 5 per group, run in duplicate). Values are means, with standard deviations represented by vertical bars. *Mean values were significantly different from the control pups ($P<0·05$; ANOVA).

The behavioural evaluation of olfactory performance strongly suggests that the impaired neurosteroidogenesis in OB consecutively to gestational MDD could have functional consequences. If olfactory nest recognition ability is affected irrespective of the sex during the third week after birth, the 21-d-old deficient female pups would specifically exhibit a dramatically reduced odour discrimination performance. The T-maze test evaluates home-odour recognition and is based on both the olfactory and locomotor abilities of pups. Considering that both the male and female deficient pups displayed body-weight loss, it can be hypothesised that the mean time to complete the test would be lower in the MDD pups than in the control pups. Thus, we carried out the place-preference test, which is specifically based on olfactory functions. Indeed, a lack of clear discrimination is specific in pathophysiological damage affecting the neuro-olfactory tissues[35,36]. The learning of odour identification is essential not only during the postnatal period but also in adulthood, since clinical studies have reported less olfactory sensitivity[37] and fewer OB volumes in depressive patients[38].

In addition to the greater weight difference between the MDD and control pups recorded in females than in the males, the patent functional and tissular consequences of MDD appeared to be sex dependent. The effects of oestradiol depend on various factors, especially strain and sex[39,40]. A sexual dimorphic effect of oestrogens on the development of dendritic spines in cultured OB with significant effects of oestradiol treatment on primary cultures derived from brains of female rats has been reported[41]. Interestingly, a previous study has revealed that neonatal repeated handling results in a loss of maternal odour preference, specifically in female rat pups than in control pups[42]. These dimorphic variations

seem to be associated with steroid-dependent molecular mechanisms that occur via the nuclear receptors and co-activators of steroids, and most of them are present at high levels in the OB of rats according to a sex-specific localisation, so as to regulate brain development and behaviour[43].

In conclusion, the present results provide the first evidence of the sex-dependent deleterious effects of perinatal MDD on olfactory discrimination performance associated with impaired neurosteroidogenesis, since the decreased expression levels of key proteins result in an apparent reduced content of oestradiol in the OB of 21-d-old female rat pups. This may contribute to their growth retardation and body-weight loss through impaired suckling. It has been shown that an early folate privation has not only developmental effects, but also life-long effects[44]. Whether it is associated with neuropsychological disorders in adulthood requires further investigation.

Acknowledgements

The authors thank Professor D. Stocco (Texas Tech University, USA) for providing antibodies against StAR protein.

The present study received institutional grants from the French National Agency for Research (ANR Nutrivigene project) and the Region of Lorraine (France). ANR Nutrivigene and the Region of Lorraine had no role in the design and analysis of the study or in the writing of this article.

The authors' contributions are as follows: S. E. H. C, G. P., J.-L. D., J.-L. G. and B. L.-M. conceived and designed the experiments; S. E. H. C., G. P., N. M. and J.-M. A. carried out the experiments; S. E. H. C., G. P., J.-L. D., J.-L. G. and B. L.-M. analysed the data; S. E. H. C., G. P., J.-L. D., J.-L. G. and B. L.-M. wrote the article.

None of the authors has any conflicts of interest.

References

1. Obeid R & Herrmann W (2005) Homocysteine, folic acid and vitamin B-12 in relation to pre- and postnatal health aspects. *Clin Chem Lab Med* **43**, 1052–1057.
2. Tchantchou F (2006) Homocysteine metabolism and various consequences of folate deficiency. *J Alzheimers Dis* **9**, 421–427.
3. Daval JL, Blaise S & Guéant JL (2009) Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, E1.
4. Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, *et al.* (2004) Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* **134**, 162–166.
5. Blaise S, Alberto JM, Nédélec E, *et al.* (2005) Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* **57**, 777–782.
6. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, *et al.* (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* **170**, 667–679.
7. Blaise SA, Alberto JM, Audonnet-Blaise S, *et al.* (2007) Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1492–E1502.
8. Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, *et al.* (2009) Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol* **216**, 231–238.
9. Garcia MM, Guéant-Rodriguez RM, Pooya S, *et al.* (2011) Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1α by PRMT1 and SIRT1. *J Pathol* **225**, 324–335.
10. Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, *et al.* (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1α hypomethylation and decreased ER-α, ERR-α, and HNF-4α in the rat liver. *J Hepatol* **57**, 344–351.
11. Bossenmeyer-Pourié C, Blaise S, Pourié G, *et al.* (2010) Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. *Am J Pathol* **176**, 270–227.
12. Kojima M & Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* **85**, 495–522.
13. Leon M (1992) Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol* **23**, 1557–1573.
14. Lledo PM & Saghatelyan A (2005) Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci* **28**, 248–254.
15. Sullivan RM & Wilson DA (2003) Molecular biology of early olfactory memory. *Learn Mem* **10**, 1–4.
16. Shingo T, Gregg C, Enwere E, *et al.* (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* **299**, 117–120.
17. Mellon SH (2007) Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther* **116**, 107–124.
18. Stocco D (2000) The role of the StAR protein in steroidogenesis; challenges for the future. *J Endocrinol* **164**, 247–253.
19. Midzak A, Rone M, Aghazadeh Y, *et al.* (2011) Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* **336**, 70–79.
20. Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T, *et al.* (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome *P*-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* **71**, 2231–2238.
21. Lavaque E, Sierra A, Azcoitia I, *et al.* (2006) Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience* **138**, 741–747.
22. Garcia-Segura LM (2008) Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* **20**, 705–712.
23. Brock O, Keller M, Veyrac A, *et al.* (2010) Short term treatment with oestradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience* **166**, 368–376.
24. Heth G, Nevo E & Todrank J (1996) Seasonal changes in urinary odors and in responses to them by blind subterranean mole rats. *Physiol Behav* **60**, 963–968.
25. Jacquot L, Pourié G, Buron G, *et al.* (2006) Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicol Lett* **165**, 57–65.
26. Buron G, Hacquemand R, Pourié G, *et al.* (2007) Comparative behavioral effects between synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice. *Behav Neurosci* **121**, 1063–1072.
27. Chéry C, Barbé F, Lequere C, *et al.* (2002) Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B_{12} in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* **40**, 1105–1108.

British Journal of Nutrition

28. Luippold G, Delabar U, Kloor D, *et al.* (1999) Simultaneous determination of adenosine, *S*-adenosylhomocysteine and *S*-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J chromatogr B Biomed Sci Appl* **724**, 231–238.
29. Kerek R, Geoffroy A, Bison A, *et al.* (2013) Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis* **4**, e755.
30. Laemmli K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
31. Kim HJ, Park CH, Roh GS, *et al.* (2002) Changes of steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in post-natal rat development. *Dev Brain Res* **139**, 247–254.
32. Guo XZ, Su JD, Sun QW, *et al.* (2001) Expression of estrogen receptor (ER)-α and -β transcripts in the neonatal and rat cerebral cortex, cerebellum and olfactory bulb. *Cell Res* **11**, 321–324.
33. Veyrac A & Bakker J (2011) Postnatal and adult exposure to oestradiol differentially influences adult neurogenesis in the main and accessory olfactory bulb of female mice. *FASEB J* **25**, 1048–1057.
34. Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, *et al.* (2011) Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, E322–E329.
35. Buron G, Hacquemand R, Pourié G, *et al.* (2009) Carbon dioxide effects on olfactory functioning: behavioral, histological and immunohistochemical measurements. *Toxicol Lett* **188**, 251–257.
36. Zou J, Pan YW, Wang Z, *et al.* (2012) Targeted deletion of ERK5 MAP kinase in the developing nervous system impairs development of GABAergic interneurons in the main olfactory bulb and behavioral discrimination between structurally similar odorants. *J Neurosci* **32**, 4118–4132.
37. Atanasova B, Graux J, El Hage W, *et al.* (2008) Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* **32**, 1315–1325.
38. Negoias S, Croy I, Gerber J, *et al.* (2010) Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience* **169**, 415–421.
39. Bakker J, Honda S, Harada N, *et al.* (2002) The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *J Neurosci* **22**, 9104–9112.
40. Barker JM & Galea LA (2008) Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* **152**, 888–902.
41. Wu Y, Moriya-Ito K, Iwakura T, *et al.* (2011) Sexually dimorphic effects of estrogen on spines in cultures of accessory olfactory bulb. *Neurosci Lett* **500**, 77–81.
42. Raineki C, De Souza M, Szawka R, *et al.* (2009) Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience* **159**, 31–38.
43. Bian C, Zhang D, Guo Q, *et al.* (2011) Localization and sex-difference of steroid receptor coactivator-1 immunoreactivities in the brain of adult female and male mice. *Steroids* **76**, 269–279.
44. Hussain N (2012) Epigenetic influences that modulate infant growth, development, and disease. *Antioxid Redox Signal* **17**, 224–236.

British Journal of Nutrition

Résumé

La carence précoce en donneurs de méthyles (folates et vitamine B12) entraîne une hyperhomocystéinémie ainsi que des troubles cognitifs et de la coordination motrice chez les ratons de 21 jours. Ces troubles ont été reliés à une altération de la neurogenèse dans l'hippocampe et le cervelet, mécanisme étroitement relié à la neurostéroïdogenèse (NSG), définie par la synthèse locale de stéroïdes dans le cerveau. L'objectif principal de ce travail a été de déterminer si ces troubles étaient associés à une altération de la NSG.
Ce travail a conduit à plusieurs résultats marquants, montrant notamment l'effet délétère de la carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur la voie stéroïdogénique dans le cervelet, région cérébrale particulièrement vulnérable en période post-natale. Ceci s'est traduit par un effondrement du contenu en estradiol et autres neurostéroïdes, consécutivement à la diminution de l'expression de StAR, TSPO et de l'aromatase, ainsi que des récepteurs aux estrogènes.
Ces effets délétères sont associés à une atteinte de la voie de signalisation dépendante de l'AMPc associée à l'activation du récepteur LHR, et la diminution de facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de la NSG, notamment SF-1, dont la présence dans les cellules de *Purkinje* du cervelet n'avait jamais été décrite auparavant.
Cette réponse à la carence se ferait selon un dimorphisme sexuel, puisque seules les jeunes femelles nées de mères carencées étaient affectées.
Enfin, ces études ont permis la mise en évidence d'altérations fonctionnelles associées aux dommages cellulaires et moléculaires observés dans les bulbes olfactifs (BO), se traduisant par une diminution des fonctions de la discrimination olfactive. Ceci pourrait contribuer au retard de croissance associé au poids corporel réduit mesuré chez les animaux carencés.

Mots Clés : Carence en donneurs de méthyles, neurostéroïdogenèse, développement post-natal.

Abstract

Early methyl-donor deficiency (MDD, folate and vitamin B12) produces hyperhomocysteinemia, cognitive and motor disorders in 21 days-old rat pups. These disorders are linked to an alteration of neurogenesis in the cerebellum and the hippocampus, which is closely linked to neurosteroidogenesis, defined as the local synthesis of steroids in brain. The aim of this work was to verify if these troubles are associated with an altered neurosteroidogenesis.
This work led to several striking results, showing in particular the deleterious effects of the methyl donor deficiency on the steroidogenic pathway in the cerebellum, particularly vulnerable during postnatal development. This was confirmed by the reduced contents of estradiol and other neurosteroids, as a result of the decrease of the expression of StAR, TSPO and aromatase, as well as the estrogen receptors.
These deleterious effects are associated to the impairment of AMPc dependent signaling pathway and the decrease of transcription factors, notably SF-1, which the presence in the cerebellar Purkinje cells had never been described previously. This response to the deficiency would be made according to a sexual dimorphism, since only the young deficient females were affected.
Finally, these studies allowed us to show functional changes associated with the cellular and molecular damage observed in the olfactory bulbs, being traduced by a decrease of the olfactory discrimination. This could contribute to the growth retardation associated with the reduced body weight of the deficient animals.

Key words: methyl-donor deficiency, neurosteroidogenesis, postnatal development.