



HAL
open science

Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation neuronale et la plasticité: influence d'une supplémentation périnatale sur le développement cérébral

Andrea Geoffroy

► To cite this version:

Andrea Geoffroy. Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la différenciation neuronale et la plasticité: influence d'une supplémentation périnatale sur le développement cérébral. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0088 . tel-01751783

HAL Id: tel-01751783

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751783>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



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

Andréa GEOFFROY

**Conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sur la
différenciation neuronale et la plasticité : influence d'une
supplémentation périnatale sur le développement cérébral.**

Le 08 Septembre 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :

Pr. Marie-Laure Kottler	PU-PH, U1075 INSERM, Caen, France
Dr. Patrick Anglard	DR, U7364 CNRS, Strasbourg, France

Examineurs :

Dr. Hervé Moine	DR, CNRS 7104 / INSERM U964, Strasbourg, France
Pr. Jean-Louis Guéant	PU-PH, U954 INSERM, Nancy, France
Dr. Jean-Luc Daval Directeur de thèse	DR, U954 INSERM, Nancy, France
Dr. Carine Bossenmeyer-Pourié Co-directeur de thèse	MCU, U954 INSERM, Nancy, France,

Membres invités:

Pr. Bruno Charpentier	PR, U7365 CNRS, Nancy, France
------------------------------	--------------------------------------

REMERCIEMENTS

Je transmets mes sincères remerciements :

A Madame le Professeur **Marie-Laure Kottler** et à Monsieur le Docteur **Patrick Anglard** pour avoir accepté d'être rapporteurs pour ma soutenance de thèse. Merci pour le temps et l'intérêt que vous avez porté à l'évaluation de ce travail.

A Monsieur le Docteur **Hervé Moine**, d'avoir accepté d'être examinateur. Une page se tourne et de nouveaux horizons s'ouvrent au sein de votre équipe. J'espère que le post-doctorat sera riche en contribution dans le domaine du X-Fragile.

A Monsieur le Professeur **Bruno Charpentier** pour avoir participé à l'évaluation et au suivi de ce travail, en tant que membre du comité de suivi de thèse.

A Monsieur le Professeur **Jean-Louis Guéant**, directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli au laboratoire INSERM U954 NGERE pour ces quelques années de recherche, dans le cadre du Master et de la Thèse. Pour m'avoir permis d'intégrer un établissement où la chaleur humaine est grande et où les compétences sont nombreuses ; me permettant la mise en œuvre de ce projet. C'est d'abord grâce à vous que j'ai pu être formée à la recherche.

A Monsieur le Docteur **Jean-Luc Daval**, co-directeur du laboratoire et directeur de thèse, de m'avoir accepté comme doctorante sur ce projet, de m'avoir accordé votre confiance et votre soutien. De nous avoir permis à tous d'atteindre nos objectifs au cours de ces années. Merci pour votre sérénité qui m'a aidé à concrétiser ce manuscrit dans les meilleures conditions ! Merci de m'avoir soutenu et permis de développer ma passion pour la recherche.

A Madame le Docteur **Carine Bossenmeyer-Pourié**, co-directrice de thèse, de m'avoir accepté en premier lieu pour un stage d'initiation de Licence 3 puis de Master 1 et de Master 2, pour finalement aboutir à cette thèse. Vous m'avez soutenu en 1^{ère} ligne, permis de m'affirmer et de confirmer mes objectifs professionnels. C'est vous qui m'avez permis de tomber dans cette potion magique qui vous transforme, sur un plan professionnel et personnel.

A Mademoiselle **Racha Kerek**, Docteur de l'université de Lorraine, première amie au sein du laboratoire et coéquipière en 1^{ère} ligne au cours de ma première année de thèse. A toi qui m'a formé à la paillasse, avec qui on a tant rit et parfois tant désespéré quand les manip se décidaient à ne plus fonctionner !

A Mademoiselle **Déborah Helle**, technicienne, pour avoir contribué à ces travaux, pour m'avoir formé dans ses domaines de spécialité et pour avoir eu la patience de répondre à toutes mes questions. Merci aussi d'avoir le sang chaud, comme moi, ce qui nous a permis parfois, dans une bonne dispute de faire retomber la pression pour repartir de plus belle !

A Monsieur le Docteur **Grégory Pourié**, pour avoir pris le temps de m'enseigner et de m'épauler pour toutes les manip de comportement et surtout ... pour les statistiques !

A Madame **Maryvonne Merlet** ainsi que Monsieur **Arnaud Billon** d'avoir supporté mes plaintes, mes angoisses, mes récits ; sur l'avancement de ma thèse, de ma rédaction et encore de ma rédaction ! Ca y est c'est fini ! Merci pour la relecture, une petite couche en plus au cas où vous n'en ayez pas assez entendu parler !

A Madame le Docteur **Natacha Dreumont**, merci ! D'avoir été là pour m'écouter, me rassurer et me conseiller pour la suite. Prochaines étapes : post-doc, publiés et qualifs ! Pleins d'autres questions en perspectives ...

A Mademoiselle **Justine Flayac**, technicienne, pour transmettre tous les jours sa bonne humeur au laboratoire (oui oui, tu sais, tes farces ? ... auxquelles j'ai réussi à échapper !). Merci tout particulier de m'avoir permis d'acquérir deux petits monstres félicés qui m'ont souvent obligé à souffler ... en m'empêchant de travailler !

A Mademoiselle **Aurélié Robert**, technicienne, merci pour la seconde couche de bonne humeur ! Je t'avais promis de commémorer ta magnifique danse des canards du couloir pour nous rassembler au déjeuner. Voici chose faite et juste revanche pour m'avoir fait endosser un costume de lutin pour le Noël de l'unité !

A Mesdames **Catherine Tavera** et **Dominique Guillaume**, secrétaires, toujours les dernières au courant des potins ? Je ne dirais pas ça ... Merci pour ces midis en votre compagnie, ces rires et sympathiques souvenirs en compagnie de Mademoiselle **Justine Paoli**.

Merci à tous les doctorants de l'unité : **Eva Feirgova**, **Rose Ghemrawi**, **Hassan Mehem**, **Anaïs Bison**, **Nicolas Martin**, **Sarah El Chakkour**, **Jérémy Willekens** et tous les autres ... pour tous ces bons moments ...

Merci à tous les membres de l'unité : **Rémy Umoret**, **Sophie Lorentz**, **Aurélié Robert**, **Jean-Marc Alberto**, **Céline Chery**, **Pierre Rouyer**, **Fereshteh Amogli**, **Sebastien Hergalant**, **Philippe Gérard**, **Elise Jeannesson**, **Catherine Masson** ... pour la transmission de vos compétences... De même que **Florence Coste**.

Merci à tous les Professeurs et Docteurs de l'unité : **Rosa-Maria Rodriguez-Guéant**, **Shu-Fang Battaglia**, **Brigitte Leninger**, **Bernard Namour**, **Franck Hansmannel**, **Carole Arnold**, **David Coelho**, **Rémi Houlgatte** ... pour la transmission de votre savoir ...

Remerciements particuliers, pour toute l'équipe pédagogique avec qui j'ai effectué mon monitorat, Mesdames et Monsieur les Professeurs et Docteurs **Dominique Chardard**, **Sandra Kuntz**, **Sabine Mazerbourg**, **Noémie Thomas**, **Marielle Thomas** et **Nadège Touche**. Vous m'avez permis de sortir la tête de mon travail de thèse, pour participer aux enseignements que j'apprécie tout autant.

Merci à mes parents, Albine et Claude Geoffroy, pour m'avoir inspiré, motivé et accompagné. Pour me soutenir dans mes projets ...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES SCHEMAS DE SYNTHESE	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FICHES TECHNIQUES	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XIII

AVANT PROPOS	1
- De l'observation à la compréhension : pathologies et nutrition	1
- L'émergence de l'embryologie et de la tératologie	2
- Rôle des instances en charge de la santé publique	3
- Les limites liées au contexte socio-économique	3
- Etat de la recherche et problématiques	4
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Développement du système nerveux	7
1. Embryogenèse et croissance fœtale	7
2. Neurulation et mise en place anatomique du système nerveux	8
3. Expansion du système nerveux	13
4. Période fœtale : croissance cérébrale et mises en place fonctionnelle	15
5. Architecture cérébrale et fonctionnalités	20
II. Déterminants du neuro-développement	25
1. Voies de régulation épigénomique et épigénétique de l'expression des gènes	28
a. Modification de l'ADN et des histones	28
b. Modification des histones	33
2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des protéines par les miRs ...	36
a. Biogenèse des ARN non-codants de type miRs	36
b. Mode d'action du complexe miRISC	39

c.	Interventions des miRs dans le système nerveux central	39
3.	Régulation des voies de signalisation par les miRs	43
a.	Prolifération, différenciation et survie	43
b.	Maturation, plasticité synaptique et mémorisation	55
c.	Altération de l'expression des miRs et anomalies du SNC	60
4.	Voies de régulation mises en jeu	63
a.	STAT3	63
b.	Dll1/Notch	66
c.	Récepteurs AMPA/NMDA	67
III.	Vitamines B9 et B12	72
1.	La vitamine B9, ou folates	72
a.	Structure, sources et besoins	72
b.	Absorption des folates	73
c.	Cycle des folates	75
d.	Carences en vitamines B9	78
2.	La vitamine B12, ou cobalamine	79
a.	Structure, sources et besoins	79
b.	Absorption de la cobalamine	81
c.	Métabolisme de la cobalamine	83
d.	Carences en vitamines B12	85
3.	La vitamine B6, ou pyridoxine	86
a.	Structure, sources et besoins	86
b.	Absorption et métabolisme de la pyridoxine	88
c.	Carences en vitamines B6	88
IV.	Cycle l'homocystéine	89
1.	Cycle de l'homocystéine (ou cycle de la méthionine)	89
2.	L'homocystéine	91
3.	Voies d'élimination de l'homocystéine	94
a.	La voie de reméthylation (MTR-dépendante)	94
b.	La voie de transsulfuration (CBS-dépendante)	95
4.	Régulation des voies d'élimination de l'homocystéine	97

5.	Hyperhomocystéinémie et facteurs influençant cycle de monocarbone	99
a.	Facteurs nutritionnels	99
b.	Facteurs génétiques	99
c.	Facteurs externes	102
V.	Pathologies et carence en donneurs de groupements méthyles	103
1.	Notion de fœtal programming	103
2.	Pathologies du développement	104
a.	Altération de la fertilité et défauts des processus pré-implantatoire	104
b.	Défauts de fermeture du tube neural	106
c.	Supplémentation	107
3.	Pathologies de l'adulte	109
a.	Risques cardio-vasculaires	109
b.	Diabète	110
c.	Atteintes hépatiques	110
d.	Atteintes osseuses	111
e.	Risques cancéreux	111
f.	Troubles neuropsychiatriques et neurologiques	112
4.	Pathologies neurodégénératives	113
a.	Paralyse supranucléaire progressive et sclérose en plaque	114
b.	Maladie de Parkinson	115
c.	Maladie d'Alzheimer	116
	OBJECTIFS	119
	MATERIELS ET METHODES	123
I.	Modèle animal	125
1.	Entretien et alimentation	125
2.	Alimentation	125
3.	Reproduction	126
4.	Supplémentation	127
5.	Prélèvements sanguins et tissulaires	127
6.	Analyses morphométriques et histopathologiques	128
II.	Modèle cellulaire	129
1.	Souche et entretien	129

2. Milieux de culture	130
3. Viabilité cellulaire	131
4. Traitement par siARN	132
5. Récupération des échantillons	132
III. Dosages métaboliques	133
IV. Etudes de l'expression génique et ARNs	134
1. Méthylation globale de l'ADN	134
2. RT ² Profiler PCR array	134
3. qRT-PCR SYBR-Green	135
4. qRT-PCR Taqman	136
5. Hybridation in situ des miRNAs	137
V. Etudes de l'expression protéique	137
1. Western Blot	137
2. Immunochimie	138
3. Duolink	139
VI. Etudes comportementales	139
1. Negative geotaxis	139
2. Righting reflex	140
3. Homing	140
4. Labyrinthe multi-T	141
VII. Etude statistique	141
RESULTATS	143
- <u>1^{ère}</u> partie : La carence gestationnelle en donneurs de groupements méthyles peut induire des défauts cérébraux persistants en réduisant la signalisation STAT3 ciblée par miR-124	145
- <u>2^{ème}</u> partie : Une supplémentation tardive en folates améliore les atteintes cérébrales associées à une carence en donneurs de méthyles, en restaurant les voies de signalisation Let-7a et miR-34a	149
- <u>3^{ème}</u> partie : La carence précoce en donneurs de méthyles engendre des altérations de la plasticité synaptique par dérégulation de l'activité des miRs sur les récepteurs ionotropiques au glutamate. Effets bénéfiques d'une supplémentation périnatale en folates	153

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	161
I. Facteurs environnementaux et développement	163
II. Conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement cérébral	164
III. Carence précoce et altération du programme neurogénique	166
IV. La carence en donneurs de méthyle altère l'expression de Trim71 et Dll1/Notch, deux acteurs de la fermeture du tube neural antérieur et postérieur	168
1. La régulation de miR-34a/Notch contribue à la fermeture et à l'organisation de la colonne vertébrale, au niveau du tube neural postérieur	168
2. La dérégulation de Let-7a/Trim71 contribuerait aux anomalies de fermeture de la suture du cervelet, au niveau du tube neural antérieur	171
V. La carence en donneurs de méthyle provoque une atrophie des structures cérébrales via une altération de la voieSTAT3	172
VI. La régulation de miR-124a/CREB contribue à la plasticité synaptique chez l'adulte	174
VII. Conclusions et Perspectives	177
 BIBLIOGRAPHIE	 181
<hr/>	
FICHES TECHNIQUES	245
ANNEXES	283
VALORISATION SCIENTIFIQUE	287
I. Publications	289
II. Communications orales	290
III. Communications affichées	291
IV. Travaux présentés en communication par un tiers	291

LISTE DES FIGURES

Développement du système nerveux central

Figure 1 : Schéma de la fermeture du tube neural	11
Figure 2 : Les 12 paires de nerfs crâniens	12
Figure 3 : Différenciation des différentes vésicules cérébrales	14
Figure 4 : Organisation des méninges, coupe coronale	17
Figure 5 : Sortie des nerfs spinaux par leur vertèbre respective	19
Figure 6 : Architecture intra-cérébrale, coupe sagittale	21
Figure 7 : Représentation du système limbique et des noyaux gris centraux	23

Déterminants du neurodéveloppement

Figure 8 : Mise en place des différentes lignées cellulaires constituant le système nerveux	26
Figure 9 : Principaux acteurs de la méthylation de l'ADN en fonction du temps	30
Figure 10 : Mécanismes de déméthylation	32
Figure 11 : Les différentes marques du code histone contribuent à l'expression ou à la répression des gènes	35
Figure 12 : L'emplacement des marques contribue également à l'expression ou à la répression des gènes	36
Figure 13 : Voie de biogenèse des miRs	38
Figure 14 : Intervention des miRs dans les différentes étapes impliquées dans la mise en place du système nerveux central	42
Figure 15 : Régionalisation dorso-ventrale et antéro-postérieure de la moelle épinière par l'expression délimitée des gènes Hox et basic helix-loop-helix (bHLH)	44
Figure 16 : Cibles principales de miR-9 et phénomène de feedback négatif	47
Figure 17 : Maintien de l'identité neuronale par miR-124	49
Figure 18 : Exemple de boucle de rétrocontrôle impliquant miR9/miR-9*, miR-124 et REST/SCP1	51
Figure 19 : Voies de régulation par miR-34	54
Figure 20 : Voies de régulation impliquant miR-132 au sein du système nerveux central	57
Figure 21 : Voies de régulation du système nerveux par miR-137	59

Figure 22 : Représentation de voies majeures de la régulation du développement du système nerveux central	62
Figure 23 : Voie de signalisation STAT3	65
Figure 24 : Voie de signalisation Dll1/Notch	67
Figure 25 : Voies de signalisation des récepteurs AMPA/NMDA	70

Vitamines B9 et B12 : déterminants du cycle des monocarbones

Figure 26 : Structure de l'acide folique	72
Figure 27 : Absorption intestinale des folates	74
Figure 28 : Cycle des folates	76
Figure 29 : Structures des formes tétrahydrofolates (THF) dérivées de l'acide folique	76
Figure 30 : Synthèse de la distribution hépatique et périphérique des folates et de leurs modifications.....	77
Figure 31 : Structure de la cobalamine	80
Figure 32 : Absorption intestinale et distribution de la cobalamine	82
Figure 33 : Synthèse de la distribution hépatique et périphérique de la cobalamine et de son utilisation	84
Figure 34 : Structures des formes de vitamine B6 et de leurs dérivés phosphorylés	87

Cycles des folates et de l'homocystéine : métabolisme des monocarbones

Figure 35 : Cycle de la méthionine	90
Figure 36 : Structures des dérivées de l'homocystéine	92
Figure 37 : Cycle des monocarbones et régulation de l'homocystéinémie	96
Figure 38 : Régulation de l'homocystéine	98

Matériels et méthodes

Figure 39 : Protocole animal élaboré au laboratoire pour l'étude des conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles	126
Figure 40 : Protocole cellulaire utilisé au laboratoire pour l'étude des conséquences d'une carence en donneurs de méthyles	131

LISTE DES SCHEMAS DE SYNTHESE

Développement du système nerveux central

Schéma de synthèse 1 : Pathologies associées à un défaut de développement du système nerveux central..... 24

Déterminants du neurodéveloppement

Schéma de synthèse 2 : Voies de signalisation impliquées dans la mise en place du système nerveux et sa fonctionnalité 71

Discussion, conclusions et perspectives

Schéma de synthèse 3 : La carence en donneurs de groupement méthyle aboutit à différentes pathologies, par la dérégulation de voies de signalisation dont l'expression peut être partiellement restaurée par une supplémentation périnatale en acide folique 179

LISTE DES TABLEAUX

Vitamines B9 et B12 : déterminants du cycle des monocarbones

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates	73
Tableau 2 : Synthèse non exhaustive des causes de déficience en vitamine B9	79
Tableau 3 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B12	80
Tableau 4 : Synthèse non exhaustive des causes de déficience en vitamine B12	85
Tableau 5 : Table des profils de carence en vitamine B12	86
Tableau 6 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B6	88

Cycles des folates et de l'homocystéine : métabolisme des monocarbones

Tableau 7 : Table des profils physiologiques et pathologiques de l'homocystéine	93
Tableau 8 : Tableau des principaux déterminants d'une hyperhomocystéinémie	103

Fiches techniques

Tableau 9 : Préparation du milieu DMEM carencé en folates	254
Tableau 10 : Composition du milieu de culture en condition de prolifération	254
Tableau 11 : Composition du milieu de culture en condition de différenciation	255
Tableau 12 : Préparation des solutions de siRNAs et de lipofectamine RNAiMax pour la transfection	257
Tableau 13 : Composition des gels de concentration et de séparation de polyacrylamide	275

LISTE DES FICHES TECHNIQUES

Rats Wistar

Fiche 1 : Entretien	247
Fiche 2 : Supplémentation	248
Fiche 3 : Prélèvements des échantillons	249
Fiche 4 : Analyses histopathologiques	250
Fiche 5 : Analyses histopathologiques bis	251

H19-7/IGF-IR

Fiche 6 : Décongélation et congélation	252
Fiche 7 : Passages des cellules et récupération des échantillons	253
Fiche 8 : Conditions de culture	254
Fiche 9 : Viabilité cellulaire	256
Fiche 10 : Traitement par siARN	257
Fiche 11 : Récupération des échantillons	258

Dosages métaboliques

Fiche 12 : Extraction des protéines cytosoliques	259
Fiche 13 : Vitamines B9 et B12	260
Fiche 14 : HCY, MMA, acide succinique, méthionine, SAM et SAH	261

Expression génique

Fiche 15 : Quantification et test qualité des ADN et ARN	263
Fiche 16 : Extraction ADN	264
Fiche 17 : Méthylation globale de l'ADN	265
Fiche 18 : Extraction ARN	267

Fiche 19 : RT ² PCR Profiler Array	268
Fiche 20 : qRT-PCR SYBR Green	269
Fiche 21 : Extraction des miRNAs	270
Fiche 22 : qRT-PCR TaqMAN	271
Fiche 23 : Localisation des miRNAs	272

Expression protéique

Fiche 24 : Extraction des protéines cytosoliques	273
Fiche 25 : Western Blotting	274
Fiche 26 : Marquage immunochimique	277
Fiche 27 : Duolink	278

Etude comportemental

Fiche28 : Righting reflex	279
Fiche29 : Negativegeotaxis	280
Fiche 30 : Homing	281
Fiche 31 : Labyrinthe multi-T	282

Annexes

<u>Annexe I</u> : Anticorps	283
<u>Annexe II</u> : Composition des solutions	284

ABREVIATIONS

5,10-MTHF	5,10-méthylène tétrahydrofolate
5,10-MTHFR	5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase
5-me-THF	5-méthyltétrahydrofolate
AdoCbl	Adénosylcobalamine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
Akt	Protéine kinase B
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARN	Acideribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Ascl1/Mash1	<i>Achaete-scutecomplexhomolog 1</i>
Bcl	Cobalamine ou vitamine B12
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BCS	Cystathionine- β -synthase
BET	Bromured'éthidium
bHLH	<i>Basic helix-lool-helix</i>
BHMT	Bétaine-homocystéinemethyltransférerase
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA1	Corne d'Ammon 1
Cdk	Cycline-dependant kinase
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DFTN	Défaut de fermeture du tube neural
DGCR8	<i>Syndrome chromosomal [or critical] region 8</i>

DHFR	Dihydrofolate réductase
DHR	Dihydrofolate
Dll1	<i>Delta-like 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNMT	<i>DNA methyl transferase</i>
DTT	Dithiotréitol
E16	16 ^{ème} jour embryonnaire
E20	20 ^{ème} jour embryonnaire
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
Fox	<i>Forkhead box</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase
GD	Gyrus denté
GNMT	Glycine N-méthyle transférase
GO	<i>Argonaute RISC catalytic component</i>
Hcy	Homocystéine
HDAC	Histone désacétylase
Hes1	<i>Hairy and enhancer for split 1</i>
HMT	Histone méthyletransferase
HRP	<i>HorseRadish Peroxydase</i>
IF	Facteur intrinsèque
J21	21 ^{ème} jour post-natal
Jag-1	<i>Jagged-1</i>
JAK	<i>Janus Tyrosine Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilo Dalton

LCC	Longueur cranio-caudale
LCCI	Longueur cranio-calcanéenne
LCR	Liquide céphalo-rachidien
Let-7	<i>Lethal-7</i>
LMBD1	<i>Probable lysosomalcobalamin transporter</i>
LSD1	<i>Lysine (K)-specific demethylase 1A</i>
LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
MAP	Protéines associées aux microtubules
MAPK	<i>Mitogen-activatedprotein kinases</i>
Mash1/Ascl1	<i>Achaete-scute complex homolog 1</i>
MAT	Méthionineadénosyltransférase
MBD	<i>Methyl-CpG-binding domain</i>
MDD	<i>Methyl donor deficiency</i>
MeCbl	Méthylcobalamine
MeCP2	<i>Methyl CpG binding protein 2</i>
MHB	<i>Midbrain-hindbrain boundary</i>
miR	microARNoumiRNA
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
MMA	Acide méthylmalonique
MS/MTR	Méthionine synthase
MT	Méthyle transférase(s)
MTHFD	5,10-méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase
MTHFR	5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTRR	Méthionine synthase réductase
NMDA	N-Méthyl-D-aspartate
NRSE	<i>Neuronal restrictive silencing element</i>
NRSF	<i>Neuron restrictive silencer factor</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé

p53	<i>Tumorprotein 53</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAX	<i>Paired-Box transcription factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerasechainreaction</i>
PG	Polyglutamate
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (<i>PIP3</i>)
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PL(P)	Pyridoxal (-5'-phosphate)
PM(P)	Pyridoxamine (-5'-phosphate)
PN(P)	Pyridoxine (-5'-phosphate)
PSD95	<i>Post-Synaptic Density protein 95</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenedifluoride
qPCR	<i>Quantitative polymerasechainreaction</i>
Qsp	Quantité Suffisante Pour
REST	<i>Repressor element transcription factor</i>
RNase	Ribonucléase
RT	<i>Reverse transcription</i> - Transcription inverse
SA	Semaine d'aménorrhée
SAH	S-adenosylhomocystéine
SAHH	SAH hydrolase
SAM	S-adenosulméthionine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Ser	Sérine
SG	Semaine de grossesse
SHMT	Hydroxyméthyltransférase
SIRT1	<i>Sirtuin1</i>

SNC	Système nerveux central
SOX	<i>SRY (Sex determining on Y)-related HMG box</i>
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
<i>STAT3</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 2</i>
SVF	Sérum de veau foetal
SVZ	Zone subventriculaire
TBE	Tris-Borate-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCII	Transcobalamine II
Tet	<i>Tet-eleven translocation protein</i>
THF	Tetrahydrofolate
TLX	<i>Human orphan nuclear receptor tailles</i>
TRBP	<i>HIV-1 TAR RNA binding protein</i>
Trim71 ou Mlin41	<i>Tripartite motif containing 71</i>
Tyr	Tyrosine
UTR	<i>Untranslated region</i>
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>

AVANT PROPOS

« Que ton aliment soit ta première médecine » (Hippocrate, 460-356 avant J.-C.).

De l'observation à la compréhension : pathologies et nutrition

Dès l'antiquité on soupçonne l'impact de l'alimentation sur la santé mais le premier principe « d'échange nutritif » n'est établi qu'au XX^{ème} siècle par Lambling (1921). Le développement de la chimie et de la biochimie moderne, au XIX^{ème} siècle, permet la découverte des macromolécules qui constituent les aliments. Elle définit trois composés (protéines, glucides et lipides), « indispensables à la vie », dont le rôle est de fournir à l'organisme le matériel nécessaire pour compenser la perte de matière et d'énergie. Les premières expérimentations animales sur des aliments artificiels créés à partir de ces composés, permettent rapidement de constater que ces molécules ne suffisent pas à combler les besoins physiologiques. On admet alors que les aliments doivent contenir d'autres substances, présentes en faible quantité, mais non moins indispensables à l'organisme. C'est l'émergence des micronutriments, vitamines et minéraux.

On effectue alors un certain nombre de recoupements entre pathologies et nutrition.

En 1497 Vasco de Gama est confronté au scorbut qui ravage son équipage. James Lind (1747) démontre que la consommation de produits frais, les agrumes, permet de prévenir et guérir ce mal grâce à l'acide ascorbique (vitamine C) découvert 50 ans plus tard. Le rachitisme et l'ostéomalacie sont connus depuis les années 1600. L'huile de foie de morue en est alors le traitement. Sir Edward Mellanby (1919) démontre chez le chiot que c'est sa teneur en Vitamine D qui procure à cette huile ses vertus curatives.

Dans les années 1930, des patientes enceintes présentent une anémie macrocytaire qui ne répond ni au fer ni aux vitamines. Lucy Wills utilise des extraits de levure pour les traiter (Wills et al., 1931). Les folates extraits de feuilles d'épinard dans les années 1940 sont identifiés comme étant les composés qui induisent cet effet (Mitchell et al., 1941).

En 1925 aux Etats-Unis, on constate la guérison de l'anémie par ingestion de foie chez le chien. A cette époque l'anémie pernicieuse est une pathologie dont l'étiologie est peu connue

et pour laquelle un traitement par apport en fer est inefficace. En 1948 un pigment rouge du foie est isolé et est nommé vitamine B12 dont l'effet curatif sur cette pathologie est démontré la même année.

Les associations entre nutrition et pathologies donnent lieu à une multiplication d'études scientifiques dans le but d'élucider les voies métaboliques impliquées et d'élaborer des traitements simples pour certaines pathologies.

L'émergence de l'embryologie et de la tératologie

Les premières notions d'embryologie remontent au XVIII^{ème} siècle. A cette époque, l'embryologie se confronte à la « théorie de la préformation », théorie la plus communément admise, qui présente l'embryon comme un être vivant entier miniature. Au XIX^{ème} siècle, Karl Ernst Von Baer initie l'embryologie moderne, qui comprend l'embryologie descriptive (modifications morphologiques) et l'embryologie causale (déterminisme). On commence alors à admettre que l'embryon est un organisme qui se développe par la succession de plusieurs stades, chacun de plus en plus complexe et directement lié à l'environnement. Von Baer réalisera entre 1828 et 1837 la première étude d'embryologie comparée qui démontre que l'embryon est constitué de trois feuilletts embryonnaires qui donneront lieu à la formation des différents organes et dont les premiers stades de développements sont communs aux animaux. Streeter (1942) et O'Rahilly et Müller (1987) synthétiseront l'ensemble du développement embryonnaire des vertébrés selon 23 stades successifs, dits « stades de Carnegie ».

L'émergence de l'embryologie et de la tératologie (étude des « monstres », êtres vivants présentant une importante malformation congénitale) a donné lieu à un grand nombre d'études qui tentent d'élucider les causes et les mécanismes mis en jeux, afin d'élaborer des stratégies préventives ou curatives.

Rôle des instances en charge de la santé publique

Parmi les causes de malformations congénitales, l'implication des carences vitaminiques a été mise en évidence. Au vu de la gravité de certaines de ces malformations, les scientifiques et les instances de santé publique insistent sur l'importance de l'adéquation entre les apports nutritionnels et les besoins physiologiques, en s'appliquant à étudier le rôle des nutriments dans le cadre de pathologies. En 1969, l'ensemble des connaissances apportées dans ce domaine a contribué à l'élaboration par l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé) et la FAO (Food and Agriculture Organization) d'une classification des carences à haut risque. En plus, le Codex Alimentarius (Codex sur la nutrition et les aliments diététiques ou de régimes) a pour mission d'informer la population et les professionnels de la santé des besoins physiologiques en termes de quantité (énergie) et de qualité (macro- et micro-nutriments), afin de prévenir les risques de carences et de pathologies associées.

A l'heure actuelle, l'OMS considère les carences en vitamines du groupe B comme étant de Priorité II, suivant de près les carences classées de Priorité I en vitamine A, en Iode et en Fer. Les carences en donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) sont liées à la survenue de nombreuses pathologies. Au cours du développement, une carence en folates (vitamine B9) a été associée à des défauts de fermeture du tube neural chez l'embryon pouvant être létaux ou fortement handicapants. La forte prévalence d'une carence en folates a abouti en 1998 à la mise en place d'une stratégie de santé publique, consistant en la supplémentation systématique des farines au Canada et aux Etats Unis. En France, la supplémentation n'est pas systématique mais est fortement recommandée pour la femme souhaitant concevoir ou pour les femmes ayant déjà été exposées à des problèmes de grossesse en lien avec des défauts de fermeture du tube neural chez le fœtus. Cette supplémentation est alors usuellement prescrite un mois avant la conception et maintenue jusqu'à la fin du premier trimestre.

Les limites liées au contexte socio-économique

Malgré la mise en place de structures chargées des problèmes de santé publique et l'effort de diffusion des informations au grand public, les problèmes de santé liés à l'alimentation sont en permanence posés. Mis à part les problèmes de carences liés à un défaut génétique, à des pathologies, au vieillissement physiologique ou à la grossesse, de nombreux autres facteurs

conduisent à la persistance de ces carences (situation géographique, politique, socio-économique, troubles du comportement alimentaire, déséquilibre alimentaire...).

D'après l'Enquête nationale périnatale de 2010 en France, en dépit des bienfaits démontrés d'une supplémentation en folates selon la posologie indiquée et les diverses recommandations, seulement 40,3 % des femmes enceintes ont été supplémentées en vitamines B9 dont 24% en amont et pendant le 1^{er} mois de grossesse, c'est-à-dire à une période efficace pour la prévention des anomalies du tube neural.

Etat de la recherche et problématiques

L'hyperhomocystéinémie qui découle d'une carence en vitamines B est impliquée dans un certain nombre de pathologies. Au cours du développement elle est liée à un retard de croissance intra-utérin et à des anomalies fœtales pouvant aboutir à des malformations congénitales létales ou graves, comme les spina-bidifa. Les microARNs (miRs) sont des régulateurs post-transcriptionnels fortement impliqués dans la modulation des différents processus biologiques qui se déroulent au cours du développement, de la maturation et de l'activité fonctionnelle cérébrale. Les altérations de la méthylation en condition de carence peuvent contribuer à une dérégulation de l'expression de miRs prédominants dans ces mécanismes. Les recommandations concernant la supplémentation en B9 contribuent à la réduction des risques liés aux altérations majeures du développement, et ont d'ores et déjà démontré leurs bienfaits lors d'actions préventives. Cependant, les phases de maturation cérébrale ne sont pas prises en compte dans les délais de prévention et n'en demeurent pas moins des périodes critiques de la mise en place du système nerveux central, sensibles à toute altération de l'environnement. Les effets d'une supplémentation tardive sur les phases de maturation fonctionnelle du système nerveux central n'ont à ce jour pas été étudiés. Ils pourraient pourtant, de manière interventionnelle et dans des cadres spécifiques, être bénéfiques.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Développement du système nerveux

Le développement est une succession d'étapes dont la transition est assurée par l'expression de facteurs intrinsèques, extrinsèques et par l'action de facteurs physiques et mécaniques externes qui agissent de manière synergique. L'embryon subit une réorganisation constante, en cascade, où chaque étape est dépendante de la précédente et permet la mise en place chronologique des pré-requis pour l'étape suivante selon une complexité croissante.

1. Embryogenèse et croissance fœtale

Le développement embryonnaire se déroule de manière séquentielle selon des mécanismes d'induction. Il est composé de deux grandes périodes ; les phases embryonnaire et foetale. La période embryonnaire correspond au passage d'un œuf fertilisé à un organisme « entier ». En embryologie descriptive, cette phase est couramment décrite selon les stades de Carnegie, qui déclinent en 23 étapes le déroulement de la période pré-embryonnaire et embryonnaire (O'Rahilly, 1979). La période pré-embryonnaire est décrite dans les stades 1 à 5 qui s'étendent du 1^{er} au 12^{ème} jour de grossesse. Elle regroupe la formation du zygote, sa segmentation lors de la descente dans les trompes (1^{ère} semaine) et l'implantation dans la paroi utérine (2^{ème} semaine) (Shettles, 1962, Shettles, 1963, Hamilton et Boyd, 1960). En termes de développement, elle correspond à une succession de divisions cellulaires qui aboutissent à une augmentation du nombre de cellules sans réelle augmentation de volume. A cette période, l'embryon mesure de 0,1 à 0,2 mm. La période embryonnaire décrite dans les stades 6 à 23 s'étend du 13^{ème} au 60^{ème} jour de grossesse. Elle regroupe la gastrulation qui met en place les feuilletts et les territoires embryonnaires à la 3^{ème} semaine, la plicature qui délimite le corps de l'embryon et l'organogénèse de la 3^{ème} à la 8^{ème} semaine. La neurulation, qui marque le début de la mise en place du système nerveux, est la 1^{ère} étape de l'organogénèse. A cette période du développement, l'embryon croît de 0,2 à environ 30 mm. La période de développement embryonnaire qui regroupe les 23 stades de Carnegie s'étend sur les 8 premières semaines de grossesse (O'Rahilly et al., 1981). Elle regroupe les phases critiques du développement. Des mécanismes d'induction définissent les axes dorso-ventral, droite-gauche et cranio-caudal ainsi que les différents territoires embryonnaires. Ainsi, au

cours des deux premiers mois de grossesse, toute anomalie peut conduire à un arrêt spontané du développement.

En obstétrique, le suivi de la grossesse s'exprime en nombre de semaines d'aménorrhée (SA), qui correspond au temps écoulé depuis la fin des dernières menstruations. Le nombre de SA correspond aux semaines de grossesse (ovulation et fertilisation) + 2 semaines. Le développement fœtal se déroule à la suite des 8 premières semaines de grossesse (10 semaines d'aménorrhées). Cette phase de développement correspond à une période de croissance avec une augmentation de la taille du fœtus et des organes ainsi qu'une augmentation de la masse pondérale. Le fœtus ne subit plus de modifications anatomiques majeures mais une maturation des organes. Il se redresse selon l'axe longitudinal délimité par l'utérus, en position tête en bas dans la majeure partie des cas. A ce stade, la survie du fœtus dépend de la maturité des poumons et du cerveau. La viabilité définitive de l'enfant n'est en réalité acquise qu'à partir de la 28^{ème} SA. La prématurité correspond généralement à une naissance entre les 29^{ème} et 38^{ème} SA. Les enfants ne pèsent alors pas plus de 2.5 kg. En temps normal, la taille du fœtus passe de 3 cm à 8 semaines à 50 cm à terme (40^{ème} SA), l'individu pèse environ 3 g au terme de l'embryogénèse (10^{ème} SA), 90 g à la fin du premier trimestre (14^{ème} SA), 1,2 kg au terme du deuxième trimestre (26^{ème} SA) et en moyenne 3,350 kg à la naissance.

2. Neurulation et mise en place anatomique du système nerveux

Le système nerveux central et le système circulatoire sont les premiers à se développer, dès la 2^{ème} semaine de grossesse (SG). Les prérequis à la neurulation sont mis en place lors de la gastrulation (stades 6 et 7, environ 13^{ème} au 17^{ème} jour) qui marque l'apparition de l'axe longitudinal et de la symétrie bilatérale (O'Rahilly, 1970). C'est tout d'abord une migration du mésoblaste extra-embryonnaire, initiée au niveau d'un épaissement caudal de l'ectoblaste qui aboutit à la mise en place de la ligne primitive en direction crâniale. L'émergence de la ligne primitive (épaississement cellulaire sur la face dorsale) s'accompagne de la formation du sillon primitif. L'invagination cellulaire qui s'opère latéralement à l'axe antéro-postérieur, entre l'ectoblaste et l'endoblaste (présents au stade 5, 7^{ème} au 12^{ème} jour), est à l'origine du troisième feuillet embryonnaire (le mésoblaste intra-embryonnaire). C'est la présence de la

ligne primitive qui engage la formation du système nerveux central. Son extension caudo-craniale s'achève au niveau du 1^{er} tiers de l'embryon où son épaissement aboutit à la formation du Nœud de Hensen. A ce niveau, un second mécanisme d'invagination permet la migration des cellules qui formeront la corde, ce qui accentue l'inflexion du sillon.

Au stade 8 (18^{ème} au 19^{ème} jour) tous les prérequis à la formation du tube neural sont en place. On distingue un creusement des tissus le long de l'axe cranio-caudal dont les bords font saillie pour former des bourrelets neuraux (O'Rahilly et Müller, 1981). A ce stade le système circulatoire de l'embryon est également en place.

La neurulation à proprement parler commence au stade 9 (19^{ème} au 21^{ème} jour), entre la 3^{ème} et la 4^{ème} SG. L'involution au niveau de l'axe cranio-caudal s'accroît de sorte à former une gouttière neurale dont les bords se surélèvent ; il s'agit de la toute première ébauche du système nerveux dont découleront le système nerveux central (à partir du tube neural) et périphérique (à partir des crêtes neurales). Le tissu mésodermique para-axial se segmente de sorte à former les premières paires de somites (1 à 3) de part et d'autre du futur système nerveux (Müller et O'Rahilly, 1983). Au fur et à mesure du développement embryonnaire, le nombre de somites augmente selon l'axe cranio-caudal ; c'est une des références utilisées pour dater l'embryon. Chaque somite sera à l'origine de 3 types de structures différentes : la partie axiale évoluera en sclérotome (futurs vertèbres, côtes et cartilages axiaux), la partie médiale évoluera en myotome (futurs muscles striés) et la partie la plus latérale en dermatome (futurs tissus conjonctifs situés sous la peau : derme et hypoderme). La fusion des bourrelets neuraux et la formation des premières somites induit une constriction de l'ensemble des structures qui s'accompagne de la formation d'une inflexion lordosique donnant naissance à un pli céphalique et un pli caudal, qui marque le début de la délimitation du corps. L'embryon présente alors une forme dorsalement concave. En parallèle on observe la mise en place de l'ébauche cardiaque.

Au stade 10 (22^{ème} au 23^{ème} jour) la formation du tube neural commence (O'Rahilly et Gardner, 1979). Les bourrelets neuraux de la gouttière neurale fusionnent. La fermeture de la gouttière neurale en direction craniale et caudale aboutit à la formation du tube neural (Liu et Niswander, 2005). Les points de fusion sont appelés neuropores, antérieur ou postérieur. Au moment de la fusion du tube neural, la réorganisation cellulaire aboutit au rejet de quelques cellules des bourrelets neuraux qui formeront les crêtes neurales. Les cellules de ces structures

migreront de sorte à former les ganglions spinaux qui projeteront un axone en direction centrale et un axone en direction périphérique à travers les nerfs spinaux. A l'extrémité antérieure de la gouttière neurale, les structures se modifient pour former les 3 vésicules cérébrales primitives (proscéphale, mésencéphale, rhombencéphale). A ce stade, la fermeture antérieure du tube neural atteint déjà le mésencéphale (Müller et O'Rahilly, 1985), l'embryon passe de 4 à 12 somites et effectue ses premiers battements cardiaques (**Figure 1**).

Au stade 11 (23^{ème} au 26^{ème} jour) équivalant au stade 13 à 20 somites, la fermeture du tube neural se poursuit aux deux extrémités de l'axe et aboutit à la fermeture du neuropore antérieur, tandis que le neuropore postérieur est encore ouvert (Müller et O'Rahilly, 1986). Le proscéphale commence à être modifié avec l'apparition des vésicules optiques. Les plis céphalique et caudal subissent une inflexion ventrale, qui marque pour la partie craniale le début de l'enroulement cérébral.

Le stade 12 (26^{ème} au 29^{ème} jour) correspond au stade 21 à 29 somites. Il est le siège de la fermeture du neuropore postérieur (Müller et O'Rahilly, 1987) et est associé à la mise en place des bourgeons des membres antérieurs. Les nerfs crâniens commencent à apparaître (**Figure 2**). A la suite de la fermeture du tube neural, l'embryon se courbe de sorte à adopter une position dorsalement concave qui permettra la fermeture de la face ventrale.

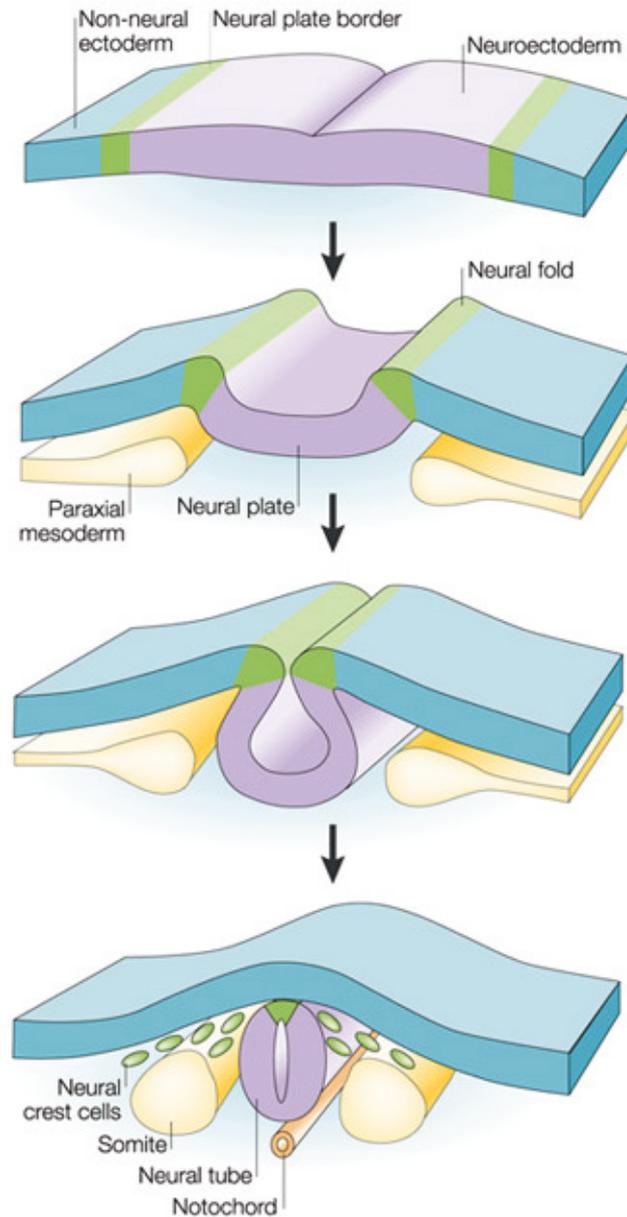
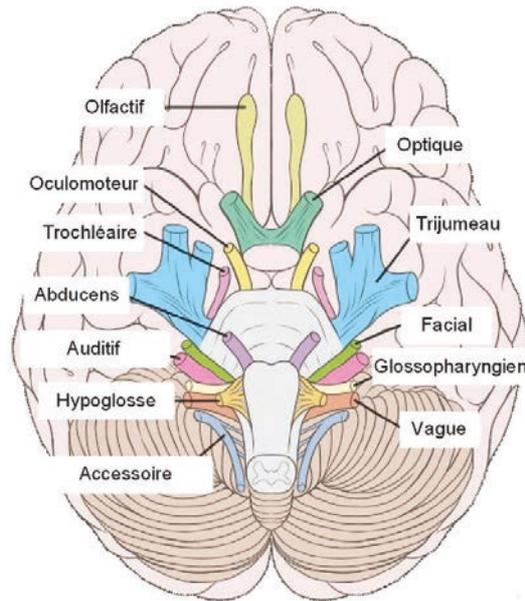


Figure 1 : Schéma de la fermeture du tube neural (adapté de Liu et Niswander, 2005).

L'émergence du tube neural marque la première étape de la mise en place du système nerveux central. Le neuroectoderme est positionné de part et d'autre de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Il s'invagine pour former une gouttière, appelée plaque neurale. Lors du mouvement, ses bords se surélèvent et fusionnent progressivement. La fusion s'effectue en direction craniale et caudale au niveau des points de fusion, appelés neuropores antérieur ou postérieur. La réorganisation cellulaire s'accompagne du rejet de quelques cellules, entre l'ectoderme et les somites, appelées cellules des crêtes neurales, et qui donneront naissance au système nerveux périphérique. L'ensemble du tube neural sera à l'origine de la moelle épinière, à l'exception de son extrémité antérieure qui se modifiera en encéphale.



Nerfs crâniens	Origine	Fonction - Organe cible
I - Olfactif	Diencéphale	S - odorat
II - Optique	Téleencéphale	S - vision
III - Oculomoteur	Mésencéphale	M - oeil
IV - Trochléaire	Mésencéphale	M - oeil
V - Trijumeau	Myéleencéphale	M/S : S - face, M - muscles masticateurs
VI - Abducens	Myéleencéphale	M - oeil
VII - Facial	Myéleencéphale	M/S - muscles de la face
VIII - Accoustique	Myéleencéphale	S - audition et équilibre
IX - Glossopharyngien	Myéleencéphale	M/S : S de la langue, M/S du pharynx
X - Vague	Myéleencéphale	M/S - cœur, poumons, viscères
XI - Accessoire	Myéleencéphale	M - muscles du cou
XII - Hypoglosse	Myéleencéphale	M - langue

Figure 2 : Les 12 paires de nerfs crâniens (d'après L. Testut, Anatomie humaine, 1899).

Les 12 nerfs crâniens dérivent des 3 territoires cérébraux primitifs (diencéphale, mésencéphale, myéleencéphale). Ils assurent la communication entre le système nerveux central et les différents organes cible par leur fonction sensorielle (S), motrice (M) ou mixte (M/S).

3. Expansion du système nerveux

Au cours du stade 13 (29^{ème} au 31^{ème} jour), l'embryon présente plus de 30 somites. Le système nerveux ne présente pas de modification majeure. Une évolution des vésicules optiques aboutit à la formation des placodes cristalliniennes. Un renflement des ganglions spinaux aboutit à la mise en place des nerfs rachidiens et branchiaux (Müller et O'Rahilly, 1988). C'est également le siège de la mise en place du processus maxillaire, des bourgeons des membres postérieurs et des ébauches des différents organes.

Au stade 14 (31^{ème} au 35^{ème} jour) la principale modification anatomique du système nerveux central consiste en flexions cervicale et mésencéphalique prononcées. Elles seront le point de départ de la mise en place des 5 vésicules cérébrales définitives (Müller et O'Rahilly, 1988) (**Figure 3**). A ce stade, les placodes olfactives sont en contact avec le télencéphale.

Le stade 15 (25^{ème} au 38^{ème} jour) correspond à la mise en place de la face avec l'apparition du processus frontal et maxillaire et l'apparition du cou.

Les stades 16 et 17 (38^{ème} au 44^{ème} jour) rassemblent principalement des modifications de la partie antérieure de l'embryon avec, notamment, une croissance de la tête et une précision des structures de la face (yeux, nez, oreilles) ainsi que des mains. Le prosencéphale est maintenant divisé en télencéphale suivi du diencéphale. Le mésencéphale poursuit sa flexion de sorte à se replier sur lui-même. L'apparition d'une très forte flexion pontique au niveau du rhombencéphale permet l'émergence en position dorsale du métencéphale (futur cervelet), tandis que le myélencéphale (qui formera le pont) fait la jonction entre les vésicules cérébrales et la moelle épinière. C'est le siège de la mise en place de plusieurs territoires de futures régions cérébrales comme l'hippocampe ou le cervelet (Müller et O'Rahilly, 1989). L'ébauche de l'hypophyse apparaît en contact avec le plancher du diencéphale. C'est également le siège de la mise en place des muscles striés et des muscles du dos ainsi que du squelette cartilagineux, notamment par l'apparition du bourgeon cartilagineux de l'os occipital et des vertèbres cervicales.

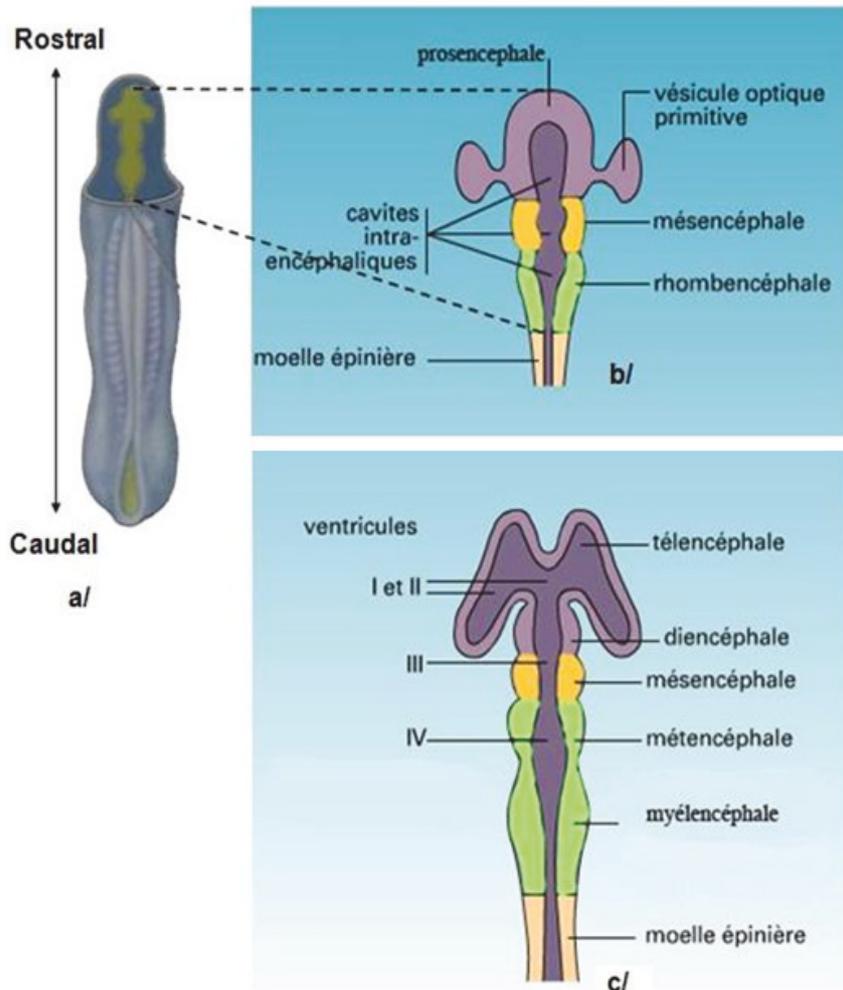


Figure 3 : Différenciation des différentes vésicules cérébrales (<http://accs.inrp.fr>)

a - La fermeture du tube neural s'effectue en direction rostrale et caudale. L'invagination de la plaque neurale en direction ventrale et le soulèvement des bourrelets neuraux du côté dorsal aboutissent à l'apparition de points de contact. Ils sont appelés neuropores antérieur et postérieur et initient la fusion de la structure.

b - De manière concomitante à la fermeture du tube neural, l'extrémité antérieure augmente en volume et s'organise en territoires cérébraux à l'origine de 3 vésicules cérébrales primitives : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (du pôle antérieur au pôle postérieur).

c - Lorsque le tube neural est clos, les vésicules cérébrales primitives évoluent pour former 5 vésicules cérébrales définitives. Le télencéphale et le diencéphale dérivent du prosencéphale. Le diencéphale est suivi par la vésicule du mésencéphale qui ne subit pas de modification, puis par le métencéphale et le myélencéphale qui dérivent du rhombencéphale.

Le stade 18 (44^{ème} au 48^{ème} jour) est principalement marqué par la mise en route des processus d'ossification ; ils sont clairement visibles dans les derniers stades embryonnaires (O'Rahilly et al., 1980, Müller et O'Rahilly, 1980).

Les stades 19 à 22 (48^{ème} ou 56^{ème} jour) correspondent à un allongement du tronc, à une position regroupée des membres et à une précision des membres postérieurs. Le visage est clairement délimité.

Au stade 23 (56^{ème} au 60^{ème} jour), qui marque la fin du développement embryonnaire, l'embryon présente un corps et des membres formés ainsi qu'une tête bien arrondie. Le volume de l'ébauche cérébrale représente plus d'un tiers du corps. Le plexus choroïde est mis en place dans les ventricules latéraux et le 4^{ème} ventricule (O'Rahilly et Müller, 1990). Un troisième ventricule prend naissance au niveau du foramen interventriculaire et se développe au niveau du diencéphale. Le thalamus s'individualise dans le diencéphale. La rotation des hémisphères commence dans le télencéphale et aboutira à un recouvrement complet des autres vésicules cérébrales, à l'exception du métencéphale qui formera le futur cervelet et qui commence à se développer (Müller et O'Rahilly, 1990). Le mésenchyme lâche richement vascularisé qui entoure les vésicules cérébrales commence à s'individualiser en méninges. Autour de la moelle épinière, le squelette axial est bien marqué : disques intervertébraux formés à partir de zones denses du tissu conjonctif et corps vertébraux formés à partir de zones cartilagineuses qui s'étendent jusqu'à la base du crâne.

À la fin du 2^{ème} mois de grossesse, les somites ont disparu pour former différentes structures internes. La croissance de l'embryon est alors évaluée par d'autres paramètres, notamment la mesure de la longueur cranio-caudal (LCC) qui correspond à la plus grande longueur (O'Rahilly et Müller, 1984).

4. Période fœtale : croissance cérébrale et mise en place fonctionnelle

À la fin du stade 23, l'embryon passe sous la dénomination de fœtus et entame sa croissance fœtale. La première partie de la période fœtale, de la 10^{ème} à la 20^{ème} SA est caractérisée par la forte croissance en longueur. La seconde partie de la grossesse, 20^{ème} à 40^{ème} SA, est caractérisée par une forte croissance en termes de masse pondérale. La longueur

cranio-caudale est la mesure de référence jusqu'à la fin de la phase principale de croissance (20^{ème} SA). Au-delà de ce stade, la croissance fœtale et la croissance du nouveau-né seront évaluées par la mesure de la longueur cranio-calcanéenne (LCCI) qui correspond à la taille de l'individu jambes étendues.

La période fœtale est le siège de la croissance des organes et de l'acquisition de leur fonctionnalité. De façon concomitante à la rotation des hémisphères cérébraux, les entités fonctionnelles se mettent en place en suivant les mouvements physiques induits par la croissance du télencéphale. Les bulbes olfactifs s'individualisent aux pôles antérieurs des ventricules. Le corps calleux se met en place entre les deux hémisphères et est surplombé par le foramen interventriculaire. Au niveau de la paroi médiane et du plancher des ventricules latéraux du diencephale se forme le cumulus des ganglions. La queue du noyau caudé se prolonge dans les lobes temporaux et subit la rotation des hémisphères. Le thalamus apparaît en position basale entre les ganglions ; en-dessous émergent successivement l'hypothalamus, l'épiphysse et l'hypophysse. Le thalamus et les ganglions de la base, présents dans la zone entre le diencephale et le cervelet, deviendront une zone primordiale d'intégration des données. Le cortex cérébral et le cervelet se développent. Une partie du ventricule s'individualise en zone matrice en contact avec la lame corticale. Les cellules vont migrer de manière chronologique pour contribuer à la formation successive des couches corticales et du cervelet. Le plexus choroïde s'étend dans les ventricules qu'il occupe presque entièrement, et sera à l'origine de la formation du liquide céphalo-rachidien (Dixon et Halliburton, 1913) dont la synthèse contribue à l'expansion de volume cérébral. Sous la boîte crânienne, les méninges se développent à la surface du cerveau. La dure-mère et l'arachnoïde s'insinuent entre le télencéphale et le cervelet de sorte à former la tente du cervelet tandis que la pie-mère est en contact direct avec la surface des structures cérébrales (O'Rahilly et Müller, 1986). L'espace sous arachnoïdien représente la loge liquidienne externe contenant le liquide céphalo-rachidien tandis que la loge liquidienne interne correspond aux ventricules cérébraux (**Figure 4**).

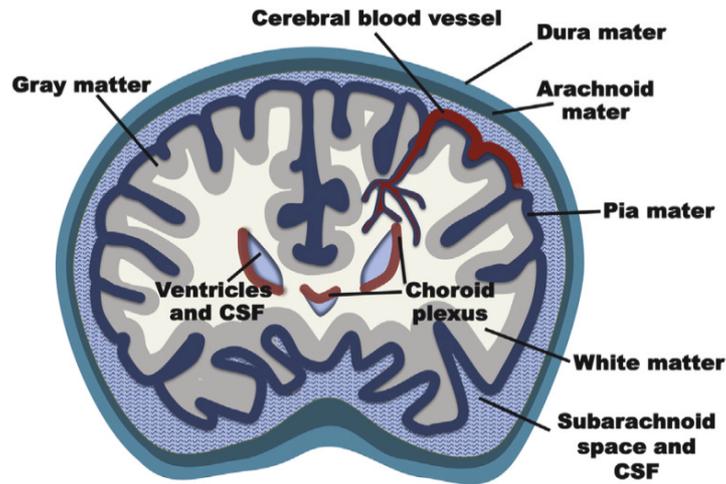


Figure 4 : Organisation des méninges, coupe coronale (Russi et Brown, 2014).

Le cerveau est protégé au sein de la boîte crânienne. La fin de la période embryonnaire est marquée par la formation de plaques membraneuses dont l'ossification aura lieu progressivement au cours de la période fœtale. La fusion totale des différentes plaques crâniennes n'aura lieu qu'après la naissance.

Sous la boîte crânienne, 3 membranes assurent secondairement la protection cérébrale. La pie-mère est la structure en contact direct avec les hémisphères, l'arachnoïde est la membrane intermédiaire, tandis que la dure-mère est celle en contact avec la boîte crânienne. Le plexus choroïde, qui tapisse la paroi des ventricules cérébraux, assure la synthèse du liquide céphalo-rachidien. La présence de sinus permet sa circulation à la surface de l'encéphale, dans l'espace sous-arachnoïdien délimité par la pie-mère et l'arachnoïde. On y trouve également les veines cérébrales superficielles.

Arachnoid mater : archnoïde, Cerebral blood vessel : vaisseaux sanguins cérébraux, Choroid plexus : plexus choroïde, CSF (cerebro-spinal fluid) : liquide céphalo-rachidien, Dura mater : dure-mère, Gray matter : matière grise, Pie mater : pie-mère, Subarachnoid space : espace sous-arachnoïdien, White matter : matière blanche.

Les ébauches osseuses se mettent en place par un mécanisme d'ossification membraneuse au niveau de la calotte crânienne, des os de la face, de la mâchoire supérieure et remplace peu à peu le cartilage de Meckel qui constitue la mâchoire inférieure pour former le menton. La colonne cervicale et lombaire est encore ouverte. La formation de centres d'ossification compacts marque le début de l'ossification enchondrale des arcs vertébraux, des corps vertébraux et des côtes. Malgré l'apparition des centres d'ossifications, la persistance de cartilage explique que la croissance ne s'achève qu'au moment de la puberté. Pendant la période fœtale, la croissance du corps est plus importante que celle du système nerveux. La moelle épinière s'étend avec la croissance mais ne se poursuit pas au-delà de la 1^{ère} vertèbre lombaire, donc les derniers nerfs spinaux émergent de la moelle épinière à ce niveau. Les fibres nerveuses sortent du canal vertébral et les ganglions spinaux sont positionnés dans les foramens inter-vertébraux (espace en arrière du corps vertébral). Le décalage qui s'opère entre la sortie des fibres et le déplacement des ganglions spinaux au sein des foramens inter-vertébraux par allongement de la colonne induit un étirement des fibres nerveuses du côté caudal qui porte le nom de « queue de cheval » (**Figure 5**).

Au moment du terme, les sutures entre les os de la boîte crânienne ne sont pas ossifiées, ce qui permet une facilitation pour le passage de la ceinture pelvienne au moment de l'accouchement ainsi que la croissance du volume cérébral post-natal.

Innervation par les nerfs spinaux mixtes (sensori-moteurs)

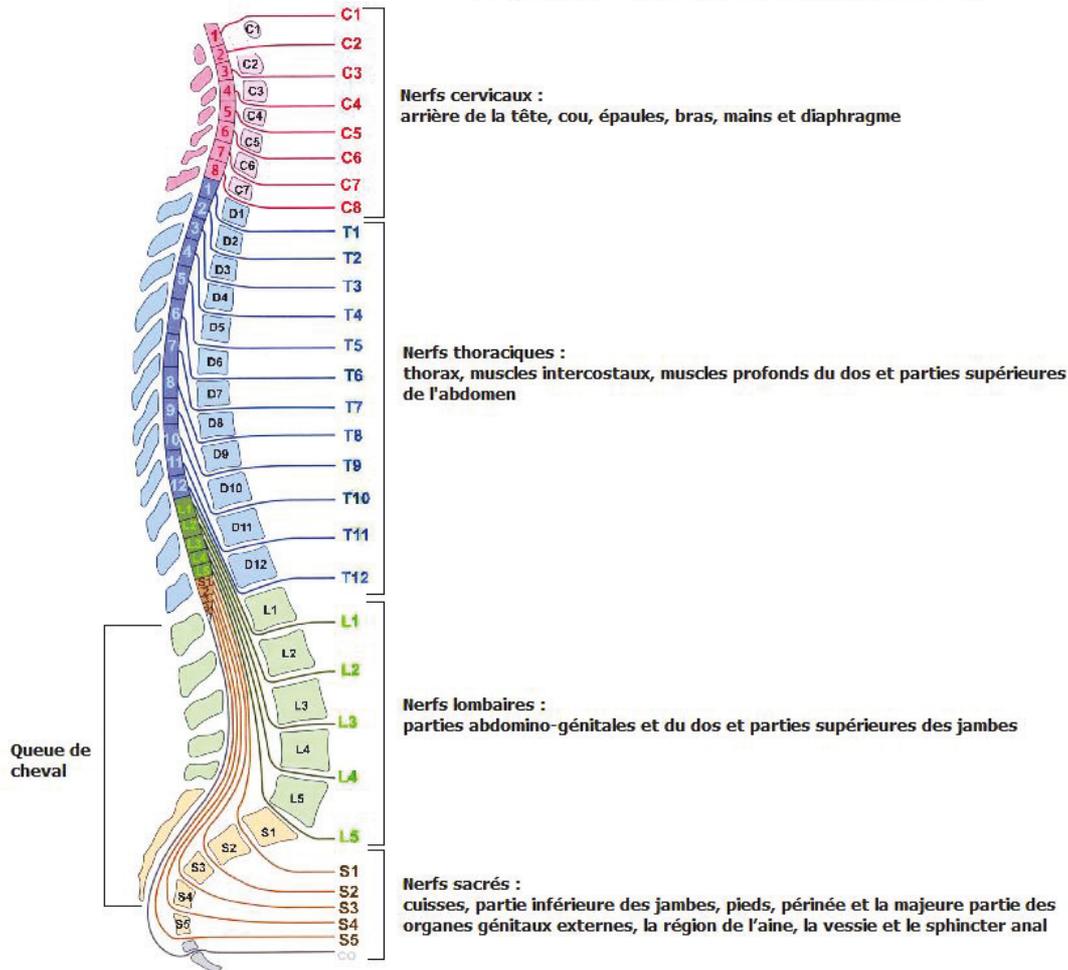


Figure 5 : Sortie des nerfs spinaux par leur vertèbre respective (Groupe de Recherche et d'Etude en Médecine Manuelle Osthéopathie, <http://www.gremmo.net> ; modifié)

Au cours de la phase embryonnaire, le système nerveux croît de manière plus importante que le reste du corps. Cependant, la tendance s'inverse au cours du développement fœtal.

A l'origine, chaque segment spinal est entouré par une vertèbre. Le nerf spinal qui émerge de chaque segment spinal est relié à un ganglion disposé dans le foramen de la vertèbre correspondante.

Avec la croissance fœtale, la colonne vertébrale s'allonge tandis que le système nerveux ne subit pas de modification majeure. A terme, le dernier segment spinal sacré est au niveau de la première vertèbre lombaire. Puisque les ganglions sont placés dans les foramens vertébraux, leur position est décalée par rapport à leur segment spinal correspondant. Les nerfs qui émergent de la moelle épinière s'allongent avec le déplacement des ganglions et la longueur d'étirement est d'autant plus importante à partir du premier segment lombaire spinal. La région lombo-sacrée ne contient alors que des fibres nerveuses étirées, auxquelles on donne le nom de « queue de cheval ».

5. Architecture cérébrale et fonctionnalités

Bien qu'en termes de développement les structures ont des origines territoriales précises, leurs associations fonctionnelles sont indépendantes de la régionalisation et sont basées sur un grand nombre de circuits de projections formant des réseaux de communications (thalamus/cortex puis hippocampe ou cervelet/pont) associés à des relais (thalamus/noyaux gris centraux). En termes fonctionnels, le cortex cérébral regroupe trois structures corticales : le néocortex, l'archicortex et le paléocortex.

Le néocortex est phylogéniquement le plus récent, il correspond à 90% du manteau cortical et sa structure s'étend avec la rotation des hémisphères pour recouvrir l'ensemble des hémisphères cérébraux. La croissance se réalise selon un mécanisme de « inside-out layering ». Aux 14^{ème} et 15^{ème} SA, des vagues de prolifération dans la zone subventriculaire génèrent des neuroblastes qui migrent de manière apicale en suivant les cellules pyramidales déjà différenciées. Les 6 couches cellulaires qui constituent le cortex sont visibles à la 28^{ème} SA. Elles comportent les aires motrices du côté frontal, des aires sensorielles du côté occipital et des champs d'associations sensito-sensorielles et motrices au centre (Broca, 1961). A la 32^{ème} SA, la surface s'étend encore plus par la mise en place des circonvolutions et des plis cérébraux. C'est la zone de traitement et de la régulation de l'ensemble des fonctions sensorielles et motrices (Mott, 1894). Le cervelet est appuyé contre le 4^{ème} ventricule. La partie interne forme le vermis (structures vermiformes étirées en longueur). Le cortex cérébelleux contient une zone matrice interne, une zone du manteau, une zone marginale externe et une zone matrice externe. Les cellules nerveuses et gliales migrent via les piliers corticaux. Le cortex cérébelleux présente lui aussi une surface plissée mais avec deux couches cellulaires : la couche granulaire externe (stratum moléculaire) et la couche granulaire interne (stratum granulaire) contenant les noyaux cellulaires. Ces deux couches sont séparées par les cellules de Purkinje. Le cervelet constitue un centre de traitement moteur pour le contrôle des réflexes posturaux en réponse aux organes sensoriels et aux organes de l'équilibre. Conjointement aux signaux du cortex cérébral moteur, il coordonne et synchronise les gestes et contrôle la précision des mouvements. Au niveau du tronc cérébral, le pont correspond à la structure relais entre le cerveau et le cervelet tandis que le bulbe rachidien contribue à la régulation des fonctions vitales autonomes. Dans la moelle épinière, l'organisation est inversée par rapport au cerveau. La substance grise contenant les noyaux cellulaires est en

position centrale tandis que les prolongements axonaux sont en périphérie. D'une part, les projections axonales se propagent vers les centres intégrateurs cérébraux tandis que, d'autre part, les projections axonales sortent de la moelle épinière par les nerfs spinaux de la corne dorsale de la moelle. Les afférences sensorielles entrent dans la moelle épinière par les cornes ventrales pour transmettre les informations aux centres intégrateurs (**Figure 6**).

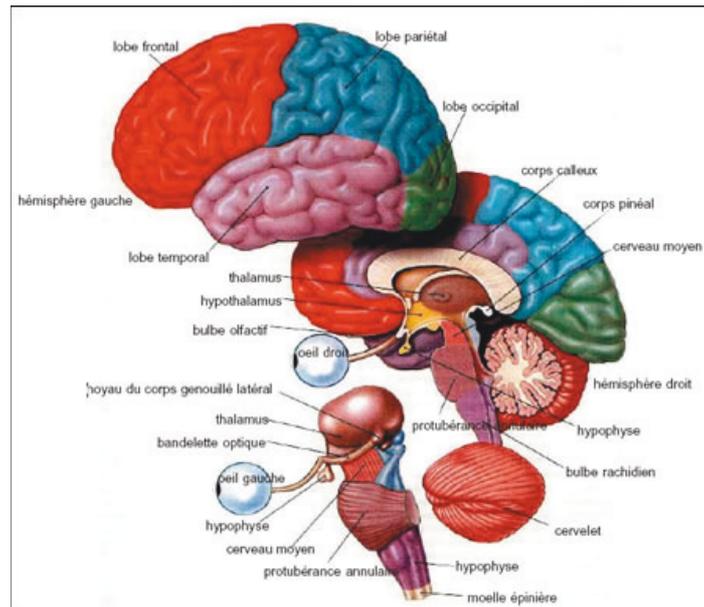


Figure 6: Vue en coupe sagittale de l'architecture intra-cérébrale (disponible sur www.brocku.ca)

Le néocortex regroupe trois structures. Le cortex, composé des lobes frontal, pariétal, occipital et temporaux, recouvre la quasi-totalité des structures cérébrales. Il contient les différentes aires motrices, sensorielles et d'association dont la surface est augmentée par des circonvolutions. Le cervelet, qui présente également une surface plissée, logé entre le lobe occipital du cortex et le pons, est associé au contrôle du mouvement et de l'équilibre. Le tronc cérébral, constitué du pons, du bulbe rachidien et de la protubérance annulaire sert de voie de projection ou de centre de contrôle des fonctions autonomes. L'archicortex, en position centrale, est composé de l'hippocampe, du gyrus denté et des amydales. Ces structures, disposées de manière bilatérale autour du thalamus sont principalement associées aux fonctions de mémorisation. Le paléocortex, composé des noyaux gris centraux, du thalamus et des structures endocrines est disposé sous l'archicortex, entre le lobe frontal et le tronc cérébral. Il s'agit d'un centre d'intégration et d'une zone relais entre le système nerveux et le système endocrine.

L'archicortex est la structure la plus ancienne phylogénétiquement ; il existe déjà chez les poissons dans le rhinencéphale, et est la structure responsable du traitement des sensations olfactives. Chez l'être humain, on le trouve dans des structures très anciennes telles que l'hippocampe, le gyrus denté et les amygdales, qui obtiennent leur position en suivant la rotation du néocortex jusqu'aux lobes temporaux. C'est la structure attachée aux fonctions de mémorisation à court et à long terme (**Figure 7**).

Le paléocortex est bien représenté chez les reptiles où il atteint son développement maximum, mais il est encore présent chez les Mammifères dans des structures anciennes telles que les noyaux gris centraux ou le rhinencéphale. Il est ainsi constitué des ganglions de la base également appelés noyaux gris centraux, qui sont accolés aux ventricules cérébraux. Dans cette zone, le thalamus est disposé en position médiane et est latéralement entouré des noyaux gris centraux : le striatum (formé par le putamen et le noyau caudé), le globus pallidus, la substance noire et le noyau sub-thalamique. Le thalamus ne fait pas à proprement parler partie des noyaux gris centraux. C'est une structure d'intégration de l'ensemble des afférences sensitives et sensorielles ainsi que des efférences motrices. Il contribue à la régulation de la conscience, de la vigilance et du sommeil en relayant les informations entre les différentes structures cérébrales en passant par les ganglions de la base (**Figure 7**). L'hypophyse et l'épiphysse (ou glande pinéale) sont des organes neuroendocrines qui libèrent des messages hormonaux dans le sang. L'épiphysse synthétise la mélatonine pendant la nuit pour ralentir l'activité gonadique et réguler les rythmes biologiques veille/sommeil. L'adénohypophyse en position antérieure synthétise les hormones peptidiques ; adrénocorticotrophine (ACTH), hormone lutéinisante (LH), hormone folliculo-stimulante (FSH), hormones thyroïdiennes (TH, 5TH), mélanotropine (MSH pour melanocyte stimulating hormone), prolactine. La neurohypophyse postérieure libère la MSH (antagoniste de la mélatonine), l'ocytosine et la vasopressine. Le système est étroitement régulé par l'hypothalamus qui transmet des signaux de libération des différentes hormones ; il constitue le système de relais entre le système nerveux et le système endocrine. La libération des hormones est effectuée dans les vaisseaux du plexus pie-mérien ou dans les ventricules.

Au cours du développement et de la maturation cérébrale, des défauts de mise en place des structures peuvent aboutir à diverses pathologies (**Schéma de synthèse 1**).

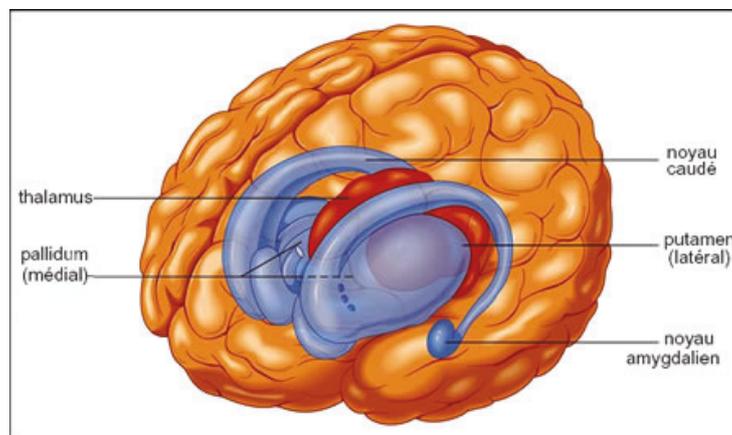
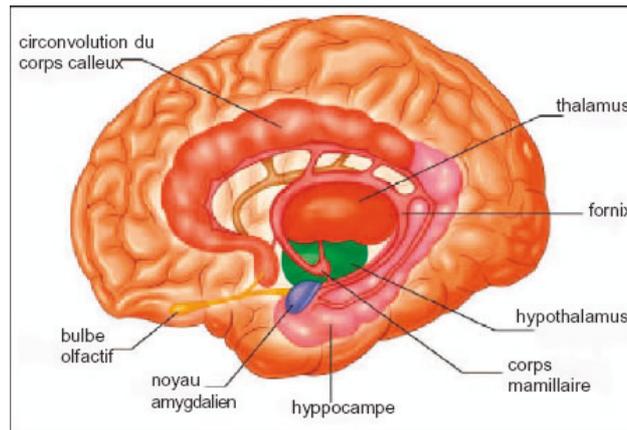


Figure 7 : Représentation du système limbique (en haut) et des noyaux gris centraux (en haut et en bas) (figures disponibles sur www.brocku.ca)

L'archicortex et le paléocortex sont des structures placées en position centrale au sein du système nerveux ventral. Lors de la rotation des hémisphères, certaines structures sont étirées de la zone frontale à la zone temporale, comme l'hippocampe ou le noyau caudé. Les structures en positions centrales, comme le thalamus, l'hypothalamus, l'hypophyse ou l'épiphyse ne sont pas affectées par cette réorganisation.

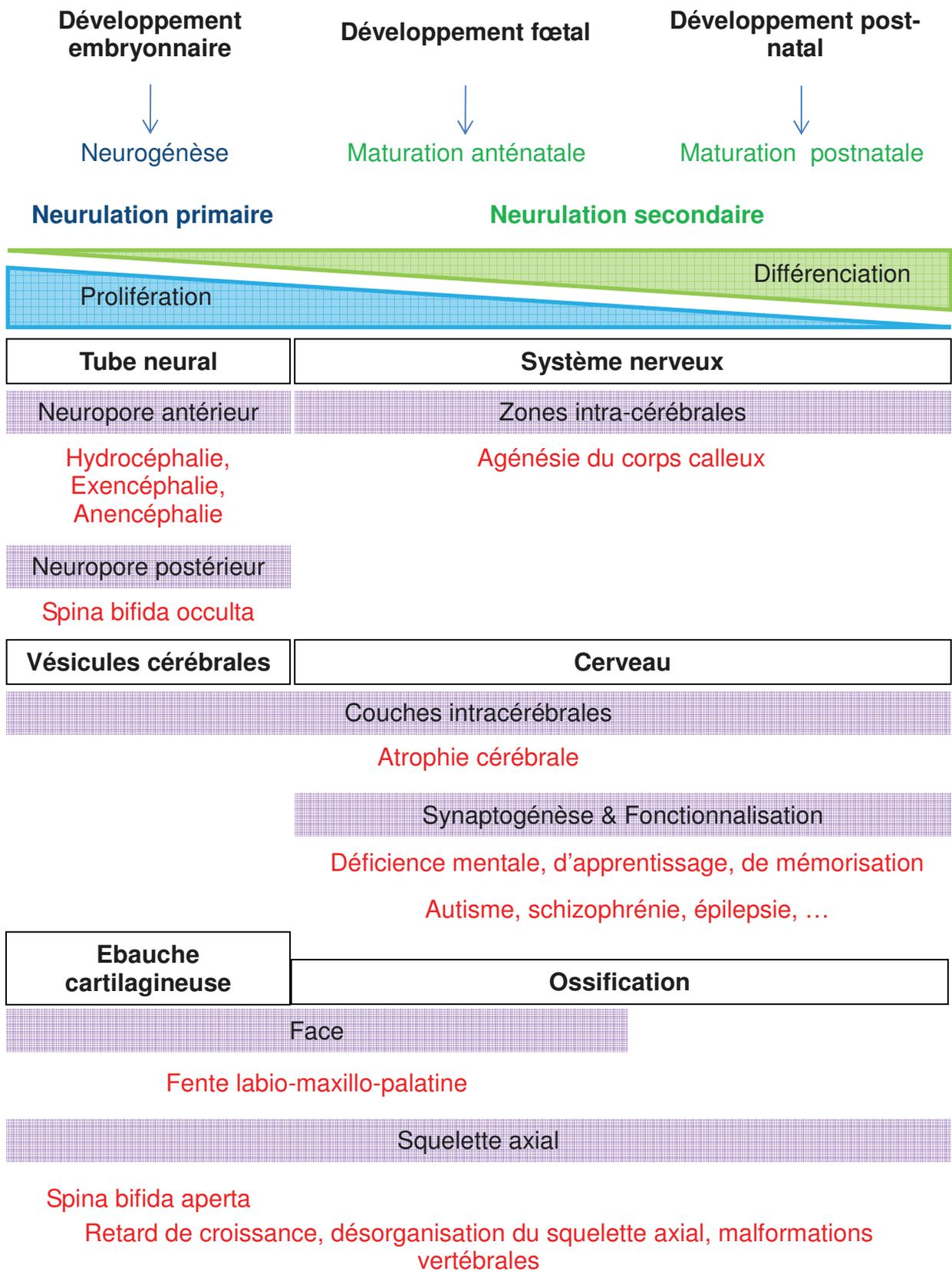


Schéma de synthèse 1 : Pathologies associées à un défaut de développement du système nerveux central.

II. Déterminants du neuro-développement

Lors de la fermeture du tube neural, les neuroblastes prolifèrent pour constituer un stock de progéniteurs neuronaux. Au début de la période fœtale, à partir de 14 semaines, les progéniteurs neuronaux commencent à migrer vers des sites appropriés pour la formation des différentes régions du cerveau. Le mouvement cellulaire nécessaire à la mise en place des structures se fait par mouvements amyboïdes. La mise en place de cônes de croissance constitués de filipodes (ramifications du cytoplasme) permet l'utilisation de points de contact sur des cellules piliers, souvent des cellules gliales, et la contraction du cytosquelette d'actine et myosine permet le mouvement cytoplasmique (Witte et al., 2008). La migration s'arrête lors de la création d'un point de contact fort grâce à la présence de molécules d'adhésion. A ce moment là, la stabilisation se fait par une perte de dynamisme des microtubules du cytosquelette qui sert alors au transport de protéines ou de métabolites à travers la cellule.

La différenciation cellulaire s'effectue à partir du moment où le tube neural est clos. Les précurseurs multipotents du neuroépithélium perdent progressivement leurs capacités de prolifération et acquièrent peu à peu leurs spécialisations cellulaires au cours de la différenciation, pour aboutir en temps et en lieu spécifiques aux différentes lignées neurales : oligodendrocytes, astrocytes et neurones (Ihrie et Alvarez-Buylla, 2008). Un nombre limité de progéniteurs conservent leur capacité à proliférer et à se différencier, dans des zones restreintes du système nerveux central comme la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe et la zone subventriculaire (Ihrie et Alvarez-Buylla, 2008) (**Figure 8**).

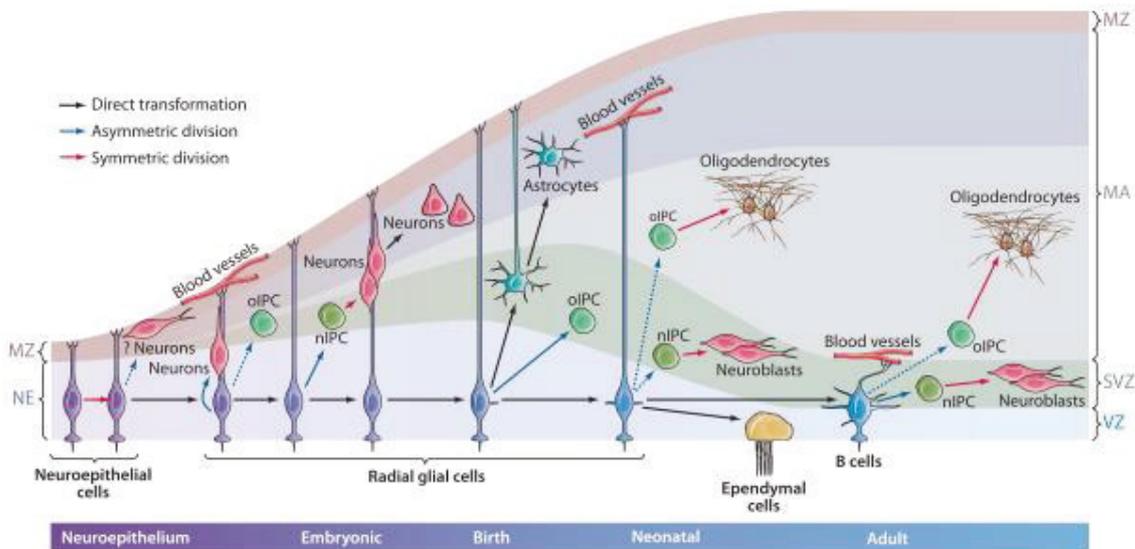


Figure 8 : Mise en place des différentes lignées cellulaires constituant le système nerveux (Krigstein et Alvarez-Buylla 2009).

Au cours de la différenciation, les cellules du neuroépithélium prolifèrent par divisions symétriques ou asymétriques, avant de s'engager dans les différents profils de cellules neurales par transformation.

Au cours de la mise en place des différentes lignées cellulaires, le neuroépithélium résiduel prend le nom de zone ventriculaire. La zone marginale persiste et donne également naissance à deux nouvelles structures : la zone subventriculaire et le manteau.

Les cellules neuroépithéliales se composent de deux populations de cellules : les glioblastes et les neuroblastes. Parmi les glioblastes, une fraction de la population donne naissance à des cellules gliales radiales qui ont une fonction de piliers pour la migration des cellules progénitrices entre les différentes couches cérébrales, tandis que la seconde est à l'origine des cellules progénitrices des astrocytes et des cellules progénitrices des oligodendrocytes. Les neuroblastes seront à l'origine des cellules neuronales. Les différents progéniteurs migrent jusqu'à la zone subventriculaire où ils conservent leur statut de progéniteurs, ou migrent jusqu'au manteau où ils se différencient en astrocytes, oligodendrocytes ou neurones. D'autres populations cellulaires sont présentes au sein du système nerveux. Les cellules de la microglie dérivent de cellules mésenchymateuses tandis que certaines cellules résiduelles de la zone ventriculaire nommées cellules épendymaires donnent naissance aux cellules épithéliales du plexus choroïde.

MA : manteau, MZ : zone marginale, NE : neuroépithélium, nIPC : cellules progénitrices neuronales, oIPC : cellules progénitrices oligodendritiques, SVZ : zone subventriculaire, VZ : zone ventriculaire

La mise en place des réseaux commence entre la fin de la période embryonnaire et le début de la période fœtale ; elle est mise en évidence par l'acquisition de certains réflexes (Wozniak et al., 1980). Les constituants du cytosquelette ont un rôle important très tôt au cours de la maturation du système nerveux central. La mise en place des axones et dendrites est assurée par une déstabilisation localisée du cytosquelette qui permet la polarisation de la cellule, l'émergence de l'axone, et qui fait intervenir les « microtubule-associated proteins » (MAPs), de sorte à assurer ponctuellement le dynamisme nécessaire. Les oligodendrocytes et les cellules de Schwann, cellules auxiliaires des axones, enveloppent respectivement les fibres du système nerveux central et périphérique par profonde invagination de leur membrane et enroulement en tours successifs pour assurer la conduction neuronale.

La maturation fonctionnelle du système nerveux se fait par la mise en place des réseaux synaptiques. Dès 25 semaines, une première phase de maturation est réalisée, les cellules surnuméraires sont détruites par apoptose. Au cours de la période fœtale, la mise en place des cellules dans les différentes structures s'accompagne de la mise en place d'un grand nombre de connexions entre les neurones par le développement de synapses. Ces structures responsables de la communication cellulaire et de la transmission nerveuse sont produites en très large excès. Après la naissance, la maturation se poursuit. Les signaux afférents sensitifs et moteurs aboutissent à la sélection des circuits neuronaux définitifs, de nombreux neurones sont éliminés mais surtout de très nombreuses synapses sont créées ou détruites (Holt et Mikati, 2011). L'utilisation des réseaux synaptiques contribue à leur renforcement et leur maintien, tandis que les connexions inutilisées sont éliminées (Johnston et al., 2001). Tout au long de la vie, l'activité des synapses sera modulée par les mécanismes de « potentialisation à long terme » ou de « dépression à long terme » pour favoriser ou inhiber certaines voies de transmission. La phase de sélection neuronale et synaptique est indispensable au bon fonctionnement cérébral puisque l'activité de neurones surnuméraires peut aboutir à des troubles neurologiques tandis que des défauts de plasticité synaptique peuvent aboutir à des défauts d'apprentissage ou de mémorisation, voire à des déficiences mentales. Ces altérations sont retrouvées dans un certain nombre de pathologies, comme l'autisme, la schizophrénie et l'épilepsie (Joseph, 1999, Anand et Scalzo, 2000, Edbauer et al., 2010).

La mise en place du système nerveux central est régulée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (Caldwell et al., 2001, Lillien, 1998). Ceux-ci permettent de réguler

l'expression spatio-temporelle d'un ensemble de gènes impliqués dans la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et la synaptogenèse ; ils sont regroupés sous le terme de « programme neurogénique ». L'orchestration de l'expression des gènes et de leurs moyens de régulation permet la coordination harmonieuse des différents processus nécessaires à la mise en place du système nerveux. L'induction des cellules par des facteurs extrinsèques (facteurs de croissance, neuromédiateurs, neurotransmetteurs...) aboutit à l'activation de voies de signalisation intrinsèques au bout desquelles des facteurs de transcription assurent l'expression de gènes, prédéterminés selon le type d'engagement des cellules. Le système d'expression génique est modulé de manière chronologique par différents régulateurs, épigénétiques ou épigénomiques, comme les microARNs (Krichevsky et al., 2006).

1. Voies de régulation épigénomique et épigénétique de l'expression des gènes

a. Modification de l'ADN et des histones

La régulation de l'expression des gènes commence très tôt au cours du développement et est indispensable à l'embryogenèse (Robertson et Wolffe 2000, Okano et al., 1999, Goto et al., 1994). Dès la phase de fertilisation, l'ADN subit une déméthylation globale (Hajkova et al., 2002). Lors de la phase de pré-gastrulation, des phénomènes de méthylation de novo, région- et gène-dépendants, s'effectuent de sorte à exprimer les gènes nécessaires à la différenciation cellulaire (Delaval et Feil, 2004, Razin et Shemer, 1995) ; les profils de méthylation seront donc différents entre progéniteurs et cellules différenciées (Meissner et al., 2008). L'ajout des groupements méthyles s'effectue sur la position 5' des cytosines, principalement dans les îlots CpG (Razin et Riggs, 1980). Tous les dinucléotides CG ne seront pas méthylés et les différents profils de méthylation présenteront une distribution spécifique selon les tissus (Liang et al., 2011, Razin et Szyf, 1984). La méthylation de l'ADN est un phénomène réversible (Lu et al., 2004, Ramchandani, et al., 1999), ce qui supporte l'hypothèse de la « programmation fœtale ». Cette notion repose sur l'hypothèse que les anomalies physiologiques pourraient faire intervenir des ajustements au niveau moléculaire, susceptibles d'être transmis à la descendance avec des conséquences à court et/ou à long

terme. Des troubles précoces sont associés à des profils de méthylation de l'ADN altérés (Mychasiuk et al., 2012, Roth et Sweatt, 2011, P.O. McGowan, et al., 2009, Murgatroyd et al., 2009, Mueller et Bale, 2008, Novikova et al., 2008, Champagne et al., 2006, Weaver et al., 2004) mais peuvent être réversés de manière plus tardive (Weaver et al., 2006), comme dans le cadre d'apports en méthyles (Weaver et al., 2005).

L'expression en temps et en lieu spécifiques des gènes est ainsi dépendante du profil de méthylation de l'ADN. Cette cinétique d'expression est associée à une dynamique structurale de l'ADN qui autorise ou non l'expression des séquences des gènes qu'elle contient. De manière générale, l'euchromatine disponible pour les phénomènes de transcription est associée à un profil d'hypométhylation, tandis que l'hétérochromatine non accessible aux acteurs de la transcription est associée à un profil d'hyperméthylation (Razin et Cedar, 1977). Il existe donc une corrélation inverse entre le taux d'expression des gènes et le taux de méthylation de leurs promoteurs (Rauch et al., 2009, Weber et al., 2007). La présence de cytosines méthylées dans une séquence régulatrice empêche la fixation des facteurs de transcription et contribue à la répression de l'expression des gènes (Takizawa et al., 2001, Watt et Molloy, 1998, Inamdar, et al., 1991). La présence de cette base modifiée au niveau des promoteurs de l'ADN permet le recrutement de protéines de liaison à l'ADN méthylé (MBD, pour methylated DNA binding domain proteins) qui présentent un rôle de répresseurs de la transcription (Cross et al., 1997, Nan et al., 1997, Lewis et al., 1992). Ces protéines sont couplées à d'autres co-répresseurs et enzymes de remodelage de la chromatine qui favorisent le changement de conformation de l'ADN de sa structure euchromatine à hétérochromatine pour la répression de l'expression des gènes (Fuks et al., 2003, Jones et al., 1998, Nan et al., 1998). Le profil de méthylation de l'ADN est mis en balance avec l'état du code histone (profil de méthylation ou acétylation des histones qui l'entourent) (Gupta et al., 2010, Miller et al., 2008). Le profil des promoteurs n'est pas la seule zone de l'ADN à réguler l'expression des gènes puisque la méthylation des gènes en dehors des promoteurs serait favorable à la transcription (Wu et al., 2010, Lister et al., 2009, Hellman et Chess, 2007).

La méthylation de l'ADN fait intervenir les ADN méthyltransférases (DNMTs) (Razin et Cedar, 1977), ainsi que le donneur de méthyle S-adenosyl-méthionine (SAM). Ces enzymes jouent un rôle crucial au cours du développement ; DNMT1 et DNMT3a sont fortement exprimées au stade embryonnaire mais leur expression persiste dans le système nerveux central mature (Feng et al., 2005, Brooks et al., 1996, Goto et al., 1994) où leur activité

contribue à la régulation de l'expression des gènes neuronaux (Feng et al., 2005, Fan et al., 2001, Robertson et Wolffe 2000, Brooks et al., 1996, Goto et al., 1994) et aux phénomènes de plasticité synaptique (Feng et al., 2010) (**Figure 9**).

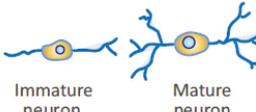
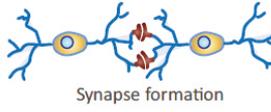
Developmental stage	Embryonic	Early postnatal	Adulthood
DNA methyltransferases expressed	<p>DNMT1 (Maintains methylation in dividing cells)</p> <p>DNMT3a (<i>de novo</i> DNA methylation)</p> <p>DNMT3b (<i>de novo</i> DNA methylation) Peak expression</p>	<p>DNMT1 (Maintains methylation in dividing cells)</p> <p>DNMT3a (<i>de novo</i> DNA methylation) Peak expression</p>	<p>DNMT1 (Maintains methylation in dividing cells)</p> <p>DNMT3a (<i>de novo</i> DNA methylation) Declining expression</p>
Proposed function of DNMTs	<p>Neurogenesis</p>  <p>NPC Immature neuron</p>	<p>Neuronal maturation</p>  <p>Immature neuron Mature neuron</p>	<p>Synaptic plasticity</p>  <p>Synapse formation</p>

Figure 9 : Principaux acteurs de la méthylation de l'ADN en fonction du temps (Baker-Andresenet al., 2013).

Après fertilisation, le matériel génétique du zygote subit une déméthylation globale. Des phénomènes de méthylation de novo, région- et gène-dépendants, s'effectuent de sorte à exprimer les gènes spécifiques aux différents types cellulaires. Ce type de méthylation est assuré par deux DNA-méthyltransférases : DNMT3a et DNMT3b. Les deux formes sont présentes au cours de l'embryogenèse, avec une présence prédominante de DNMT3b. DNMT3a semble majoritairement impliquée dans les phénomènes post-natals précoces, qui correspondent au siège de son pic d'expression. DNMT3a et DNMT3b assurent la régulation de l'expression des gènes nécessaires au maintien du statut des cellules progénitrices neurales et des neurones immatures. Par sa présence lors de la phase post-natale précoce, DNMT3a serait principalement associé au maintien des neurones immatures.

Tout au long du développement et de la vie, le statut de méthylation du matériel génétique doit être assuré. Ce type de méthylation est assuré par DNMT1. Il s'agit d'une DNA-méthyltransférase présente à tous les stades et serait particulièrement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes nécessaires aux mécanismes de plasticité synaptique.

DNMT : DNA-Methyl Trasferase ; NPC : cellules progénitrices neurales

Des réactions de déméthylation surviennent (Bruniquel et Schwartz, 2003, Lucarelli et al., 2001, Oswald et al., 2000, Szyf et al., 1995, Wilks et al., 1984) notamment dans les neurones post-mitotiques (Feng et al., 2010, Miller et Sweatt, 2007, Levenson et al., 2006, Weaver et al., 2004, Martinowich et al., 2003). Elles constituent une réponse à l'activité neuronale (Guo et al., 2011 ; Ma et al., 2009) ou à l'apprentissage (Lubin et al., 2008). Les mécanismes mis en jeu font appel aux systèmes de réparation de l'ADN. Les processus de déméthylation pourraient faire intervenir la création de sites abasiques par action de glycosylases (Jost, 1993, Razin et al., 1986), de mismatch C/T ou G/C (Kangaspeska et al., 2008, Rai et al., 2008, Morgan et al., 2004) qui pourraient contribuer aux phénomènes de déméthylation globale (Popp et al., 2010). Lorsque les taux de SAM sont faibles, les DNMTs peuvent intervenir en désaminant les cytosines méthylées en thymidines (Zingg et al., 1998, Shen et al., 1992). Les protéines de liaison à l'ADN contenant un domaine de fixation au méthyle-CpG (MDB), telles que methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) et les methyl-CpG-binding domain proteins 1, 2 et 4 (MBD1, MBD2 et MBD4) forment des complexes protéiques impliqués dans le recrutement d'acteurs de la répression de l'expression génique dont les histones désacétylases (HDACs) (Defossez et Stancheva, 2011, Dhasarathy et Wade., 2008). Parmi elles, MBD2 pourrait avoir une activité déméthylase intrinsèque au niveau des îlots CpG (Detich et al., 2002, Bhattacharya et al., 1999). Cependant, certaines équipes ne sont pas parvenues à retrouver cette activité (Boeke et al., 2000, Ng et al., 1999, Wade et al., 1999). Par contre, des 5-hydroxy-méthyle-cytosines sont présentes dans l'ADN (Pelizzola et al., 2008). Les protéines de la famille ten-eleven translocation (Tet) sont capables d'induire la déméthylation (Guo et al., 2011, Tahiliani et al., 2009) et ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (Tet1) est capable de transformer les méthyle-cytosines en hydroxy-méthyle-cytosines pour déméthyliser ou maintenir le statut déméthylé de certains gènes (Kriaucionis et Tahiliani 2014, Guo et al. 2011, He et al., 2011, S. Ito, et al., 2010). La déméthylation liée à MBD2 pourrait faire intervenir des mécanismes d'oxydation (Hamm et al., 2008) par l'intervention de cette protéine (**Figure 10**).

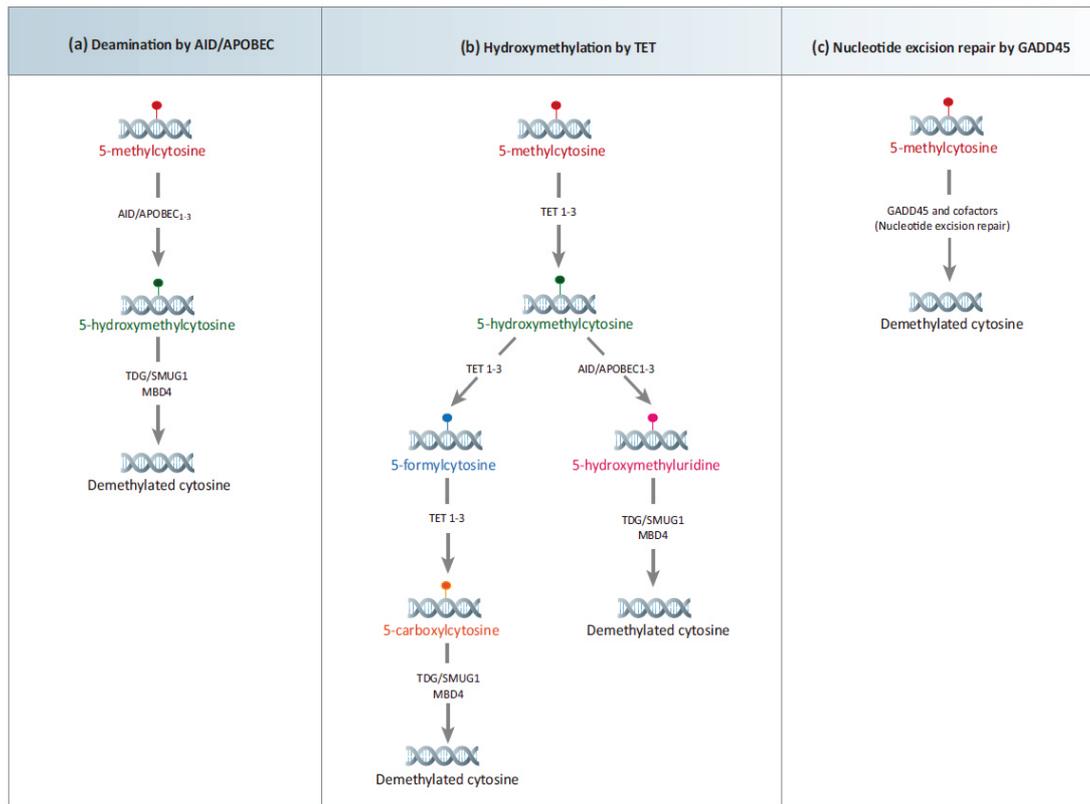


Figure 10 : Mécanismes de déméthylation (Baker-Andresenet al., 2013).

En réponse au taux d'activité neuronal, le profil d'expression des gènes peut être amené à changer pour assurer certains mécanismes comme la plasticité synaptique ou l'apoptose. Les mécanismes de déméthylations sont alors mis en jeu pour assurer l'expression des gènes impliqués.

La création de 5-hydroxymethylcytosine peut induire des chaînes de réactions enzymatiques plus ou moins complexes. Ces réactions aboutissent à la déméthylation de manières indépendantes des mécanismes de réparation de l'ADN.

AID/APOBEC: zinc-dependent DNA-deaminase; GADD45: Growth arrest and DNA-damage-inducible protein; MBD: methyl-CpG-binding domain protein; TDG/SMUG: DNA-glycosylase; TET: ten eleven translocation family

De nombreuses études font le lien entre méthylation de l'ADN et niveau d'expression des gènes dans les différents stades de développement, notamment au sein des neurones (Guo et al., 2011, Iwamoto et al., 2011, Mikaelsson et Miller, 2011, Han et al., 2010, LaPlant et al., 2010, Miller et al., 2010, Feng et al., 2007, Miller et Sweatt 2007). Le taux et le type de méthylation participent à la définition du statut cellulaire ; les formes hydroxyméthylées sont associées à la totipotence (Ficz et al., 2011, Ruzov et al., 2011) tandis qu'un switch vers les formes méthylées est associé à la mise en place du devenir cellulaire (Ficz et al., 2011). La méthylation contribue à la transition des cellules souches ou progéniteurs (Kim et al., 2009, Hatada et al., 2008, Mohn et al., 2008) en cellules différenciées exprimant des marqueurs spécifiques (Cortese et al., 2011, Hirabayashi et Gotoh, 2010, Meissner et al., 2008, Mohn et al., 2008, Takizawa et al., 2001). Cependant, la modification du taux de méthylation n'est pas la seule régulation mise en jeu puisque la variation de méthylation de gènes peut ne pas avoir de conséquences sur leur taux d'expression basale (Chen et al., 2012, Sorensen et al., 2010, Zajac et al., 2010).

b. Modification des histones

La modification de la structure des nucléosomes est une régulation décisive pour déterminer l'accessibilité des promoteurs aux facteurs de transcription, et donc pour la régulation de l'expression des gènes (Yoo et al., 2006). Le code histone est un système complexe de régulation par méthylation et acétylation, pouvant correspondre à des signaux différents selon la sous-unité à laquelle elle s'applique. Les nucléosomes sont des associations d'ADN et de protéines histones H2A, H2B, H3 et H4 (Margueron R et al., 2005) dont les queues N-terminales peuvent subir différentes modifications, comme des méthylation, des acétylations, des phosphorylations ou des ubiquitinations (Kouzarides, 2007, Shilatifard, 2006, Bonaldi et al., 2004, Nowak et Corces, 2004, Strahl et Allis, 2000). Les marques de méthylation sont des modifications stables tandis que les marques d'acétylation et de phosphorylation correspondent à des modifications dynamiques. L'action d'histones acétyltransférases (HATs) et d'histones déméthylases (HDMs) (Cloos et al., 2006, Shi et al., 2004) contribue à la conformation euchromatine nécessaire à l'expression des gènes tandis que l'action d'histones désacétylases de type I et II (HDACs, à domaine catalytique à zinc) et

d'histones méthyle-transférases (HMTases) contribuent à la conformation hétérochromatine qui n'autorise pas l'expression des gènes (Y. Zhang et al., 1999). Les protéines HDACs de type III (ou sirtuines, nicotinamide NAD⁺-dépendantes) interviennent dans la modulation de protéines non-histones. Certaines marques de méthylation correspondent à un signal répresseur, comme la triméthylation de l'histone H3 lysine 27 (H3K27me3) (Wang et al., 2010) et H3K9me3 (Ryu, et al., 2006, Fujita et al., 2003, Fuks et al., 2003), tandis que d'autres correspondent à un signal activateur, comme la monométhylation de l'histone H4 lysine 20 (H4K20me1), ou les triméthylations H3K4me3, H3K36me3 et H3K79me3 (Bannister et Kouzarides, 2005, Santos-Rosa et al., 2002). Des statuts bivalents comme l'association de la marque répression H3K27me3 et de quelques H3K4me3 permettent une dynamique expression/répression rapide (Azuara et al., 2006, Bernstein et al., 2006). De la même manière, des marques d'acétylation peuvent conduire à une expression, comme H3K9ac, H3K14ac, H4K8ac, H4K12ac ou H4K16ac (Peleg et al., 2010, Hargreaves et al., 2009) (**Figure 11**). La position des histones modifiées est un facteur supplémentaire pour la régulation de l'expression des gènes (**Figure 12**).

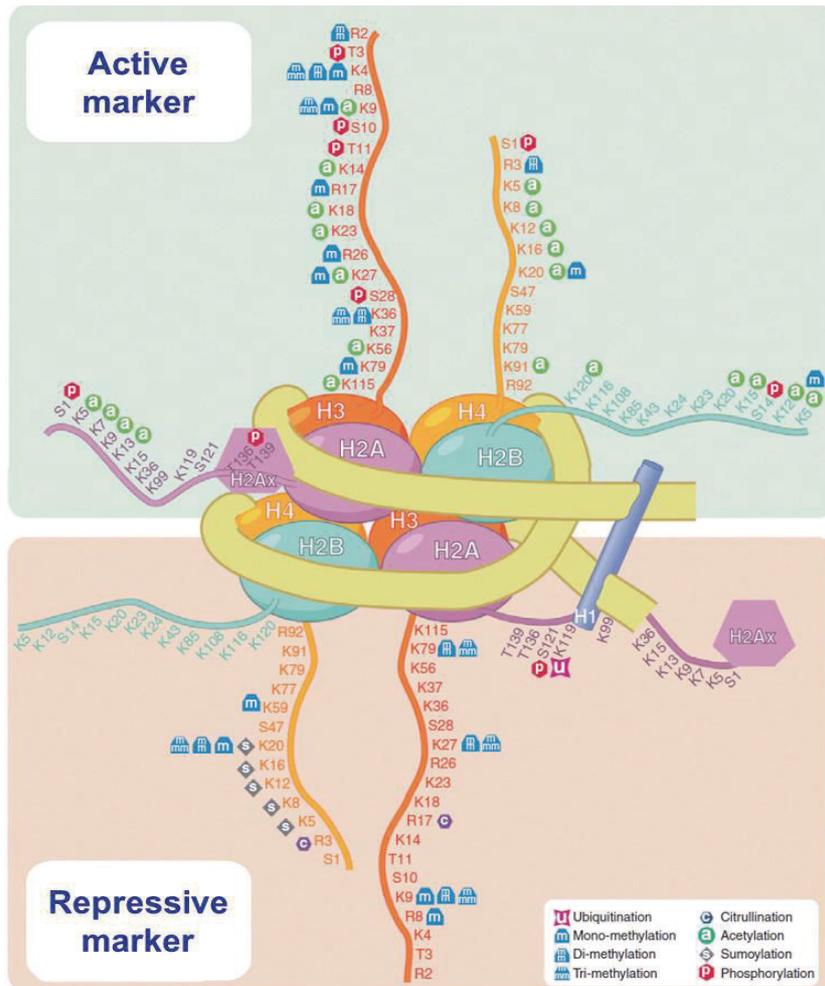


Figure 11 : Les différentes marques du code histone contribuent à l'expression ou à la répression des gènes (Kim, 2014).

Le code histone est un système de régulation qui fait intervenir un ensemble de modifications sur différents résidus des queues N-terminales des protéines histones H2A/H2B, H3 et H4.

Parmi ces modifications : l'ubiquitination, la sumoylation, la citrullination, la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation. Les modifications les plus décrites sont la phosphorylation et l'acétylation à caractère dynamique, qui font intervenir un équilibre entre kinases/phosphatases et histones acétylases/histones désacétylases, ainsi que la méthylation décrite comme stable qui fait appel à des DNA-methyl-transférases.

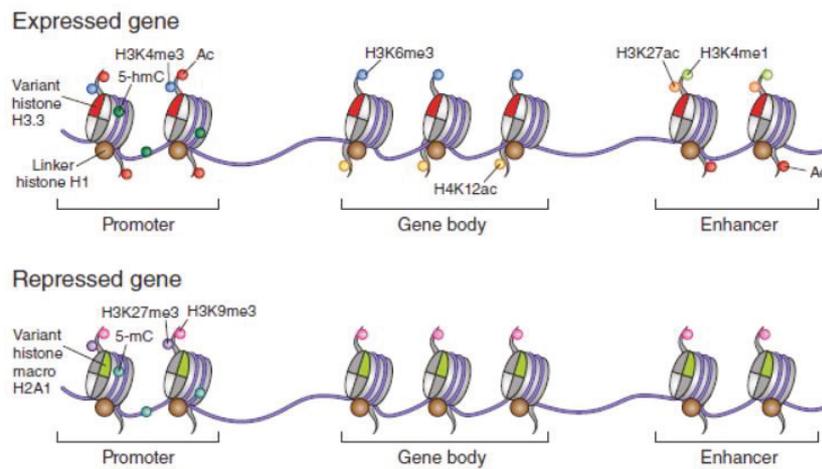


Figure 12 : L'emplacement des marques contribue à l'expression ou à la répression des gènes (modifié de Jakovcevski et Akbarian, 2012).

Le système de régulation de l'expression des gènes par le code histone est d'autant plus complexe que la position des nucléosomes marqués entre en jeu. La régulation est basée sur l'équilibre entre les marques activatrices et répressives des histones constituant les nucléosomes situés au niveau des promoteurs, du corps du gène ou des régions enhancer, auquel s'ajoute l'état de méthylation du gène lui-même.

2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression des protéines par les miRs

a. Biogenèse des ARN non-codants de type miRs

En complément de la régulation de l'expression des gènes par modification de l'ADN ou des histones, la cinétique d'expression des gènes peut être modulée par l'action de petits acides ribonucléiques (ARNs) non-codants nommés microARNs (miRNAs ou miRs). Ce sont des régulateurs post-transcriptionnels (Manakov et al., 2009). Ils sont décrits comme des régulateurs chronologiques de l'expression des gènes du programme neurogénique, de sorte à assurer l'expression coordonnée et harmonieuse des gènes spécifiques et des voies de signalisation (Martinez et Gregory, 2010). Certains miRs sont spécifiquement exprimés au niveau du cerveau et sont impliqués dans les différentes étapes du développement et de la

maturation cérébrale (Maller Schulmann et al., 2008, Krichevsky et al., 2006, Kim et al., 2004).

Les miRs sont des éléments simple-brin de petite taille (22 à 24 nucléotides) principalement intergéniques mais certains sont transcrits à partir de séquences situées dans des introns ou des exons de séquences d'ARN non codants ainsi que dans les introns de gènes codant pour des protéines (Kim, 2005). Leur synthèse nécessite différentes étapes de maturation structurale, qui sont également nécessaires à leur translocation du noyau vers le cytoplasme. Le transcrit primaire (pri-miR) est une séquence de plusieurs kilobases transcrite par l'ARN polymérase II, au sein du noyau où elle est pliée sous forme de tige-boucle (Du et Zamore, 2005). Elle est prise en charge par la Rnase III Drosha qui, associée à DiGeorge syndrome chromosomal region 8 (DGCR8), clive le pri-miR en pré-miR (Denli et al., 2004, Gregory et al., 2003). Le pré-miR ne compte alors que 70 à 80 nucléotides. Il contient la structure tige-boucle d'à peu près 22 nucléotides ainsi que 2 nucléotides non appariés en 3'. Ces caractéristiques sont nécessaires à la reconnaissance du pré-miR par l'exportine-5 Ran-GTP-dépendante qui se charge de sa translocation vers le cytoplasme (Yi et al., 2003, Gwizdek et al., 2002). Une population particulière d'ARN non-codants de type miRs, appelés miRtrons, présente une séquence située dans des introns de gènes codants. Leur structure, similaire à celle des pré-miRs, est acquise lors de l'épissage et présente une première phase de maturation indépendante du complexe Drosha/DGCR8 (Babiarz et al., 2008, Berezikov et al., 2007, Okamura et al., 2007, Ruby et al., 2007). Après translocation dans le cytoplasme, les pré-miRs sont reconnus et maturés par la Rnase III Dicer (Du et Zamore, 2005, Grishok et al., 2001, Hutvagner et al., 2001, Ketting et al., 2001). A la suite du recrutement de Dicer et des transactivateurs HIV-1 TAR RNA binding protein (TRBP) et PACT, le clivage de la structure tige-boucle aboutit à la forme mature d'environ 22 nucléotides. Il existe toutefois des exceptions ; miR-451 n'est pas maturé par DICER mais par l'activité catalytique de Argonaute RISC catalytic component 2 (AGO2) (Cifuentes et al., 2010). Une fois sous forme mature, un seul brin est généralement incorporé dans le complexe de répression miR-mediated silencing complex (miRISC) et associé à TRBP, argonaute RISC catalytic component 1 (AGO1) et AGO2 qui en sont les principales protéines (Du et Zamore, 2005, Bartel et al., 2004). AGO1 lie directement le brin du miR sélectionné (Mourelatos et al., 2002) qui est également associé à FRMP (Jin et al., 2004). AGO2 est également contenu dans le complexe en association directe avec les miRs pour réguler la répression des ARN messagers (ARNm)

cibles (Hammond et al., 2001). Le complexe contient un certain nombre d'autres protéines telles que pumilio RNA-binding family member 2 (Pum2) et moloney leukemia virus 10 homolog (MOV10) (**Figure 13**).

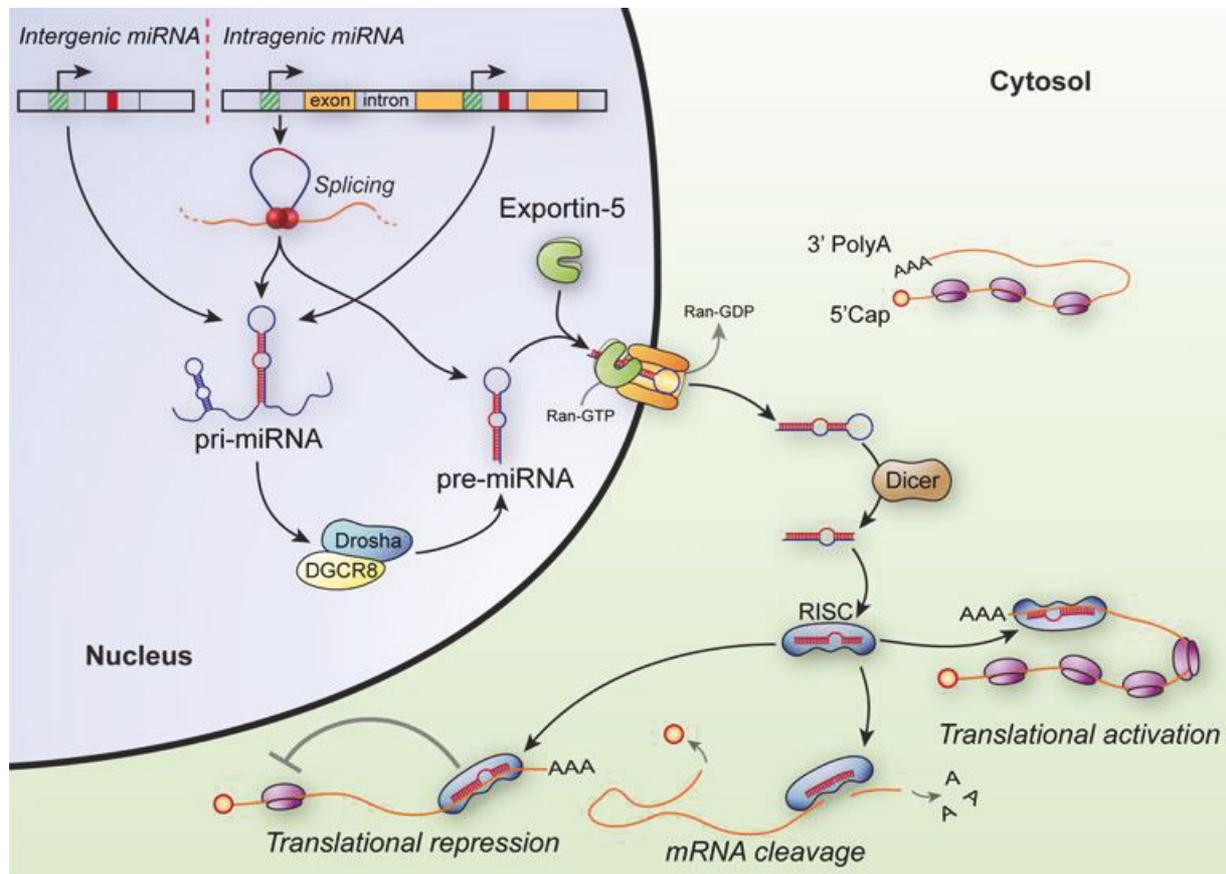


Figure 13 : Voie de biogenèse des miRs (Olde Loohuis et al., 2012).

La voie principale de synthèse commence dans le noyau lors de la transcription des séquences par une ARN polymérase II, qui aboutit à la libération de séquences précurseurs pri-miRNA. Leur processing par la Rnase III Drosha aboutit à des précurseurs pré-miRs sous forme tige-boucle possédant à l'extrémité 3' des nucléotides non appariés. La structure est reconnue par l'exportine-5 et transloquée dans le cytoplasme où elle est maturée par la Rnase III Dicer en séquence double brins dont le brin anti-sens est généralement sélectionné pour incorporer le miRISC silencing complex, composé de nombreuses protéines.

L'association du miR à sa séquence cible conduit à la répression de sa traduction ou le plus souvent à une dégradation de l'ARNm par désadénylation.

b. Mode d'action du complexe miRISC

Les possibilités de régulation post-transcriptionnelle des ARNm cibles par le complexe miRISC sont nombreuses puisqu'un miR peut cibler un grand nombre d'ARNm, tout comme un ARNm peut être ciblé par de nombreux miRs (Sinha et al., 2011, Peter, 2010, Wu et al., 2010, Bartel, 2009, Yoo et al., 2009). La reconnaissance des ARNm cibles se fait par complémentarité de séquence imparfaite ou « presque » parfaite (Bartel, 2009), entre la séquence « seed » du miR composée de 6 à 8 nucléotides (disposée de 2 à 5pb de son extrémité 5') et la séquence miR responsive element (MRE) de la région 3' untranslated region (UTR) des ARNm majoritairement (Bartel et al., 2004) ; il arrive également que l'association ait lieu en 5' UTR ou dans la région codante des gènes (Tay et al., 2008). L'association d'un miR à son ARNm cible aboutit à une répression de la traduction ou le plus souvent à une dégradation de l'ARNm par désadénylation (Yates et al., 2013, Ebert et Sharp, 2012, Pasquinelli, 2012, Huntzinger et Izaurralde, 2011, Guo et al., 2010, Du et Zamore, 2005, Bartel et al., 2004). L'inhibition de la traduction fait intervenir une interaction entre les protéines du complexe miRISC et les protéines d'initiation (Kong et al., 2008). La régulation est dépendante de la coiffe m7G en 5' UTR (Mathonnet et al., 2007, Wakiyama et al., 2007) puisque l'inhibition de la traduction est basée sur un système de compétition en 5' entre les protéines AGO et eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E), qui lors de la traduction permet la circularité de l'ARNm en coopération avec les poly(A)-binding protein 1 (PABP1) (Sonenberg et Dever, 2003). D'ailleurs, de nombreux miRs sont associés aux polyribosomes (Kim et al., 2004, Nelson et al., 2004). La perte de conformation conduit à une réduction de l'efficacité de la traduction ainsi qu'à une plus forte exposition de la queue 3' poly-A aux exonucléases (Mathonnet et al., 2007). Suite à l'action du complexe miRISC, les ARNm dont la traduction est réprimée s'accumulent au sein des P-Bodies. Ces structures contiennent des enzymes de décoiffage (DCP1/DCP2) et de déadénylation (complexe CCR4/CAF1/NOT1). La protéine GW182 en est un composant majeur et son association avec la protéine Ago2 est responsable de la séquestration des complexes miRISC/ARNm cibles au sein des P-Bodies (**Figure 13**).

c. Interventions des miRs dans le système nerveux central

Les miRs possèdent une expression spatio-temporelle finement régulée (Cochella et Hobert, 2012, Kapsimali et al., 2007, Landgraf et al., 2007), qui permet leur contribution dynamique (Miska et al., 2004) aux processus de régulation des phénomènes de développement, de maturation cérébrale et de plasticité synaptique. La régulation de ces processus par les miRs est indispensable puisque l'absence totale de Dicer, et l'altération de l'expression des miRs qui en découle, est liée à une altération de la différenciation neuronale et à des défauts morphologiques du système nerveux central et périphérique. Leur régulation intervient dans différentes régions cérébrales ainsi que dans différents types cellulaires (Haramati et al., 2010, Huang et al., 2010, Kawase-Koga et al., 2010, Kawase-Koga et al., 2009, Cuellar et al., 2008, Davis et al., 2008, De Pietri Tonelli et al., 2008, Kim et al., 2007, Landgraf et al., 2007, Schaefer et al., 2007, Miska et al., 2004, Giraldez et al., 2005). De la même manière, des altérations du développement du système nerveux central, des défauts cognitifs d'apprentissage et de mémorisation spatiale ont été observés dans le cadre d'une absence de DGCR8 (Sellier et al., 2013, Wang et al., 2007, Stark et al., 2008, Babiarz et al., 2011). Les miRs sont exprimés dans tous les types de tissus ; cependant, ils peuvent être spécifiques de certains tissus voire de certaines structures. Le pré-miR-138 est ubiquitaire mais sa forme mature n'est exprimée que dans le cerveau et le foie ; puisque son transport cytoplasmique n'est pas altéré dans les autres tissus, c'est la régulation de sa maturation par Dicer qui est mise en jeu (Obernosterer et al., 2006). Au sein du système nerveux central, l'expression des miRs peut être homogène ou spécifique de certaines régions cérébrales (Olsen et al., 2009, Bak et al., 2008, He et al., 2007). Leur présence et celle des protéines impliquées dans leur mode de régulation, dans le cytoplasme de l'axone (Hengst et al., 2006 ; Giuditta et al., 2002) et des dendrites (Lugli et al., 2008 ; Kye et al., 2007) contribuent à la régulation de la traduction locale des ARNm ; bien que la majorité des mécanismes de traduction s'effectue dans le soma. Les pré-miRs sont transloqués dans différentes zones subcellulaires, comme les synapses, et maturés in situ (Lugli et al., 2008). Le transport implique une discrimination des différents pré-miRs puisque les miRs dérivés d'un même pré-miR, donc d'une même région génomique, présentent un profil d'expression variable dans les différents compartiments subcellulaires (Kye et al., 2007). Les processus mis en jeu demeurent cependant mal connus (Kaplan et al., 2009). Les mécanismes de traduction locale,

et la régulation par les miRs sont indispensables au développement du système nerveux central, à la neurogenèse (Doginiet al., 2008, Wheeler et al., 2006, Kosik et Krichevsky, 2005, Smirnova et al., 2005, Miska et al., 2004), à la différenciation (Krichevsky et al., 2006, Smirnova et al., 2005, Sempere et al., 2004), à la survie (Cox et al., 2008), à la guidance des axones (Aschrafi et al., 2010, Leung et al., 2006, Ming et al., 2002, Zhang et Poo, 2002, Campbell et Holt, 2001, Campbell et al., 2001), à la régénération axonale (Hanz et al., 2003, Zhang et al., 2001), à la mise en place des synapses (Schacher et Wu, 2002), et à la plasticité synaptique (Wang et al., 2009, Si et al., 2003, Beaumont et al., 2001, Martin et al., 1997) ; cette dernière étant déterminante dans les mécanismes de consolidation de la mémoire (Guzowski et al., 2000) (**Figure 14**). Toute altération peut donc aboutir à des déficits cognitifs (Ehninger et al., 2008). Lors des mécanismes de mémorisation, seules les synapses stimulées qui disposeront du matériel nécessaire vont profiter des mécanismes impliqués dans la plasticité synaptique (Bramham et Wells, 2007, Smart et al., 2007, Aschrafi et al., 2005, Kandel, 2001). La traduction locale est alors un avantage puisque peu de copies d'un ARNm transloquées à la synapse peuvent être traduites en grand nombre de protéines, tandis que les protéines traduites en grand nombre dans le soma nécessitent d'être transportées (Wang et al., 2010).

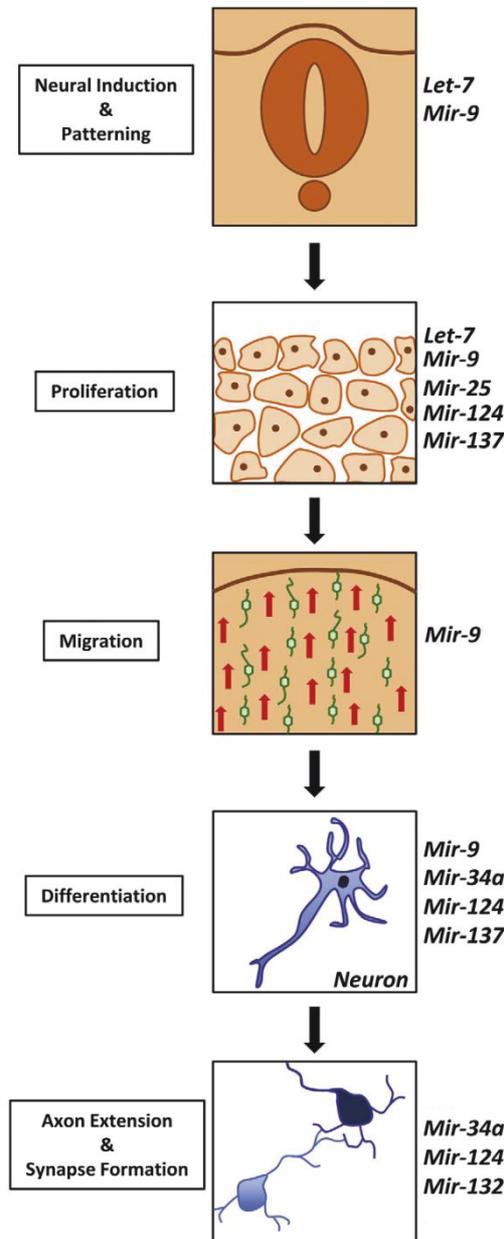


Figure 14 : Intervention des miRs dans les différentes étapes du développement du système nerveux central (adapté de Motti et al., 2012).

La mise en place du système nerveux central fait intervenir les miRs dans la régulation dans le temps et dans l'espace des gènes nécessaires aux différentes phases du développement, notamment par la régulation de la traduction locale.

Dans le cerveau, leur expression peut être dépendante d'une région cérébrale ou d'un type cellulaire, ou être ubiquitaire. Leur action peut également être spécifique d'une phase du développement ou impliquée dans différents processus : organisation structurale, prolifération, migration, différenciation, extension axonale ou synaptogénèse.

3. Régulation des voies de signalisation par les miRs

a. Prolifération, différenciation et survie

La mise en place de l'axe antéro-postérieur fait intervenir l'expression différentielle des nombreux gènes Hox (Dasen et Jessell, 2009), tandis que l'axe dorso-ventral est déterminé par l'expression ventrale de SHH (sonic hedgehog) couplée à l'expression mésodermique de l'acide rétinoïque (Jessell, 2000) et des Bone morphogenetic proteins (BMPs) côté dorsal. Dans ce cadre, des miRs comme miR-17-3p ou miR-196 contribuent au maintien des différents territoires (Chen et al., 2011, Asli et Kessel, 2010, McGlenn et al., 2009, Sehm et al., 2009, Hornstein et al., 2005). L'organisation spatiale des cellules neuronales et gliales du système nerveux central met en jeu un certain nombre de voies de signalisation au cours de la fermeture du tube neural (Maller Schulman et al., 2008) et de la morphogenèse des régions cérébrales comme le cortex ou l'hippocampe (Davis et al., 2008) (**Figure 15**).

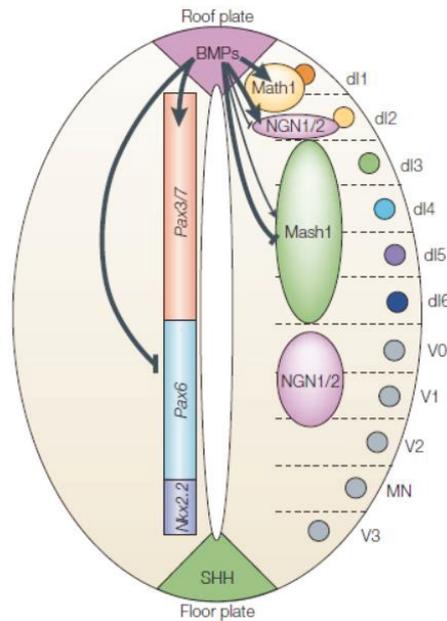


Figure 15 : Régionalisation dorso-ventrale et antéro-postérieure de la moelle épinière par l'expression délimitée des gènes Hox et basic helix-loop-helix (bHLH) (Liu et Niswander, 2005)

L'axe dorso-ventral est défini par l'expression des BMPs et de membres de la famille du TGFβ côté dorsal, ainsi que par l'expression SHH côté ventral.

Les cellules progénitrices neurales sont dans un premier temps divisées en larges domaines dorso-ventraux par l'expression différentielle des gènes homeotiques Pax. Les BMP activent les gènes Pax dorsaux et délimitent de domaine d'expression de Pax6.

La signalisation BMP est également impliquée dans la régulation des sous-populations cellulaires qui expriment différents membres de la famille bHLH. Les niveaux les plus élevés de BMP définissent une sous-population exprimant Math1 au niveau le plus dorsal tandis que les niveaux moins élevés sont associés à des sous-populations exprimant les NGN1/2 et le facteur de transcription Mash1 aux niveaux plus ventraux. La régionalisation des cellules précurseurs mène à la formation de populations distinctes du côté dorsal et ventral : les interneurones dorsaux, interneurones ventraux et les neurones moteurs.

bHLH : basic helix loop helix proteins; BMPs : bone morphogenetic proteins; dI1–6 : interneurones dorsaux; MN : neurones moteurs; NGN1/2 : neurogénines 1 et 2; SHH : sonichedgehog; TGFβ : transforming growth factor-β; V0–3 : interneurones ventraux

La mise en place du système nerveux central passe par la délimitation des différentes vésicules cérébrales. Cette délimitation s'effectue à partir de centres d'organisation qui émettent des molécules de régulation qui contrôlent l'expression des gènes impliqués dans la mise en place des différentes structures cérébrales. Entre le mésencéphale et le rhombencéphale, la midbrain-hindbrain boundary (MHB) est en premier lieu définie par l'expression des voies de signalisation wingless integration site (Wnt) et fibroblast growth factor (FGF) (Wurst et Bally-Cuif 2001). Une fois la MHB déterminée, sa maintenance est liée à l'expression de miR-9 dans les régions qui l'entourent. MiR-9 est exprimé dans l'ensemble du tube neural, à l'exception de la MHB, et contribue à la répression des gènes nécessaires à la mise en place de cette structure (Leucht et al., 2008). miR-9 semble cibler directement fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR-1), qui serait la voie principale impliquée dans la MHB, ainsi que fibroblast growth factor receptor 8 (FGFR-8) et canopy, qui interviennent dans la voie de signalisation du FGF, ce qui explique l'expansion de la MHB le long de l'axe antéro-postérieur en son absence (Leucht et al., 2008).

La neurogenèse se décline sous la forme d'une cascade chronologique dans laquelle les miRs vont réguler la prolifération et la différenciation (Kawase-Koga et al., 2010, Kawase-Koga et al., 2009, De Pietri Tonelli et al., 2008). Les cellules souches neuronales ou les progéniteurs neuroépithéliaux vont pouvoir conserver un état prolifératif ou peu à peu, au cours des divisions successives, s'engager dans des voies en tant que progéniteurs de plus en plus spécialisés pour former les différentes lignées cellulaires, jusqu'à donner naissance à des cellules post-mitotiques pleinement différenciées et spécialisées (Conti et Cattaneo, 2010, Li et Jin, 2010).

miR-9 intervient dans la régulation du devenir cellulaire ainsi que dans la mise en place des sous-types cellulaires, la modulation de la croissance axonale, et le réseau synaptique (Bonev et al., 2012, Dajas-Bailador et al., 2012, Otaegi et al., 2011, Shibata et al., 2011, Laneve et al., 2010, Saunders et al., 2010, Zhao et al., 2009, Packer et al., 2008, Shibata et al., 2008, Conaco et al. 2006). Dans les human neuronal progenitor cells (hNPCs) dérivées de human embryonic stem cells (hESC), miR-9 est nécessaire à la prolifération (Delaloy et al., 2010) en inhibant la migration par la régulation de Stathmin, une protéine associée à l'instabilité des microtubules. Il contribue à la croissance axonale et au branchement des

synapses par la régulation de microtubule-associated protein 1b (MAP1b), qui intervient dans la stabilité des microtubules (Dajas-Bailador et al., 2012). Cependant, dans le prosencéphale, miR-9 est associé à une perte de l'état prolifératif en faveur de la différenciation (Zhao et al., 2009) par la répression du facteur de transcription human orphan nuclear receptor tailless (TLX ou Nr2e1), associé à l'auto-renouvellement. TLX et miR-9-1/miR-9-2 sont des répresseurs transcriptionnels mutuels (Zhao et al., 2009). La régulation réalisée par miR-9 pourrait aboutir à un effet sur la balance entre prolifération et différenciation, puisqu'il est exprimé dans les cellules en prolifération ainsi que dans les neurones matures (Leuchter et al., 2008, Wienholds et al., 2005, Lagos-Quintana et al., 2002). miR-9 réprime sirtuin 1 (SIRT1), une histone désacétylase (Saunders et al., 2010) et réprime des facteurs de transcription de la famille des bHLH, inhibiteurs de la différenciation, comme les protéines enhancer of split (Hes), telles que Hairy1, Her1 ou Her9 (Bonev et al., 2011). Il réprime également des facteurs de la promotion de la prolifération comme Forkhead box protein G1 (FoxG1). Il existe un rétro-contrôle entre miR-9 et hairy and enhancer of split-1 (Hes1), une protéine qui contribue à l'homéostasie des cellules souches neurales (Bonev et al., 2012). Enfin, miR-9 et miR-9* (miR partiellement complémentaire de miR-9 dérivé du brin même précurseur) ciblent le facteur de transcription répresseur de la neurogenèse representational state transfer/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) et son cofacteur REST corepressor 1 (CoREST) (Packer et al., 2008, Conaco et al., 2006). miR-9 contribue principalement à la transition prolifération/différenciation dans les neurones nouvellement formés (Shibata et al., 2011, Shibata et al., 2008), ce qui explique qu'un gain de fonction puisse aboutir à une altération de la prolifération des progéniteurs et de leur migration par induction précoce de la différenciation (Zhao et al., 2009). Au cours de la différenciation des cellules, il pourra notamment contribuer à la mise en place des neurones moteurs (Otaegi et al., 2011) en régulant le taux de forkhead box protein P1 (FoxP1) nécessaire à la création des différents sous-types (Dasen et al., 2008, Rouso et al., 2008) et réguler le devenir cellulaire des neurones sensoriels par répression du gène Sens (Li et al., 2006). miR-9 pourrait réguler un certain nombre d'autres gènes du système nerveux tels que Paired box protein-6 (Pax6) et ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2 (Elavl2) (**Figure 16**).

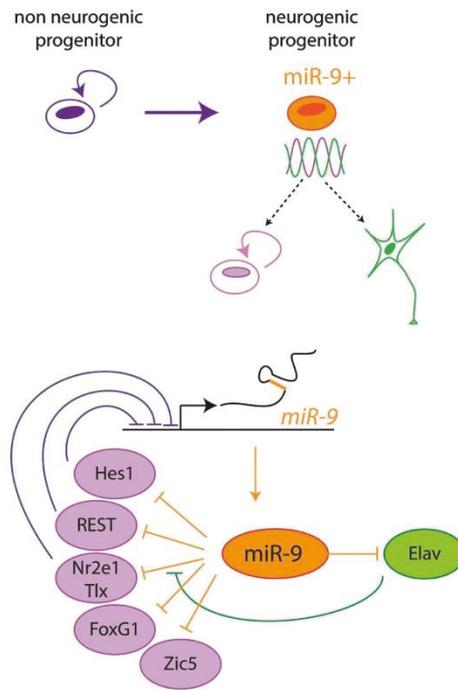


Figure 16 : Cibles principales de miR-9 et phénomène de feedback négatif (Coolen et al., 2013).

MiR-9 participe à la régulation du devenir cellulaire. Les progéniteurs sont dans un état d'équilibre qui leur permet de répondre à des signaux de prolifération ou de différenciation.

Il réprime des facteurs de prolifération comme TLX (ou Nr2e1) et FoxG1. Il contrôle également les facteurs de transcription de la famille des bHLH, inhibiteurs de la différenciation, comme les protéines Hes ou le facteur de transcription répresseur de la neurogenèse REST/NRSF. Ainsi, il favoriserait la transition des progéniteurs non-neuronaux riches en Hes1 vers un profil de progéniteurs neuronaux dont les taux de Hes1 est variable. Toutefois il régulerait également le statut des neurones matures en réprimant Elavl2.

miR-9 est sous le rétrocontrôle négatif de ces cibles ; qu'elles soient impliquées dans la prolifération (violet) ou la différenciation (vert).

bHLH : basic helix loop helix proteins ; Elavl2 : ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2; FoxG1 : Forkhead box protein G1; Hes : enhancer of split; REST/NRSF : representational state transfer/ neuron-restrictive silencer factor; TLX ou Nr2e1 : human orphan nuclear receptor tailless

Au cours du développement, miR-124 est exprimé un peu plus tard que miR-9 mais il est lui aussi exprimé dans les progéniteurs neuronaux ainsi que dans les neurones où son expression perdure à l'âge adulte où il correspond au miR le plus exprimé dans le cerveau (Liu et al., 2012, Deo et al., 2006, Krichevskiy et al., 2006, Sempere et al., 2004, Lagos-Quintana et al., 2002). Son expression augmente au cours de la différenciation et est régulée par le facteur de transcription REST, sur lequel il exerce un rétro-contrôle (Conaco et al., 2006). Il contribue à la fois à la répression des gènes de la prolifération, à l'expression des gènes neuronaux impliqués dans la différenciation (Vo et al., 2010, Coolen et Bally-Cuif, 2009, Conaco et al., 2006), et est associé à la croissance axonale (Yu et al., 2008). Il intervient notamment dans la neurogenèse au niveau du cortex embryonnaire (Maiorano et Mallamaci, 2009) ainsi qu'au niveau de l'hippocampe adulte et contrôle la mise en place des différentes lignées cellulaires dans les niches de cellules souches de la zone subventriculaire (SVZ) (Akerblom et al., 2012, Cheng et al., 2009). La réduction de l'expression de miR-124 est associée au maintien des pools de progéniteurs neuronaux, tandis que son augmentation est associée à la différenciation neuronale. Sex determining region Y-box 9 (Sox9), un régulateur des cellules souches (Farrell et al., 2011, Scott et al., 2010, Cheng et al., 2009), et Jagged 1 (Jag1), un ligand de Notch (Cheng et al., 2009), sont également régulés par miR-124 pour favoriser le programme neuronal. Son mode d'action fait intervenir la répression de facteurs de transcription anti-neuraux comme Notch (Chen et al., 2011), REST et la protéine small C-terminal domain phosphatase 1 (SCP1) qu'il recrute (Visvanathan et al., 2007, Wuet al., 2006). Sa régulation aboutit à l'élimination des facteurs anti-neuraux et des transcrits non-neuronaux. La suppression du répresseur de l'épissage alternatif polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1) autorise la régulation de l'épissage alternatif par polypyrimidine tract-binding protein 2 (PTBP2) qui est corrélée à un profil d'épissage spécifique des cellules neurales (Makeyev et al., 2007, Lim et al., 2005) (**Figure 17**). La sur-expression de miR-124 perturbe la plasticité synaptique via son action sur cAMP Response Element-binding protein (CREB) (Rajasethupathy et al., 2009). Certaines études présentent à l'inverse miR-124 comme un acteur majeur de la prolifération des cellules souches neurales (Sun et al., 2012 ; Weng et Cohen, 2012; Clark et al., 2010).

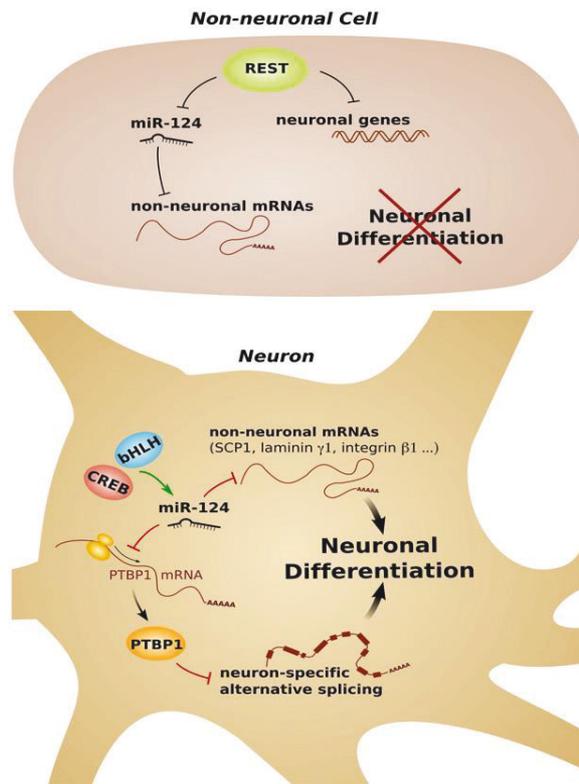


Figure 17 : Maintien de l'identité neuronale par miR-124 (Fiore et al., 2008).

MiR-124 régule de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la différenciation neuronale. Son expression est régulée par le facteur de transcription REST, sur lequel il exerce un rétro-contrôle.

Dans les cellules non neuronales, REST réprime l'expression de miR-124 et d'autres gènes neuronaux, comme SCP1, la laminine γ 1 ou l'intégrine β 1. Dans les cellules neuronales, miR-124 est exprimé en raison de l'absence de REST et de l'action de facteurs de transcription, comme CREB ou les facteurs bHLH. La présence de miR-124 conduit à la répression des gènes non-neuronaux ou des facteurs de répression des gènes neuronaux, comme PTBP1.

bHLH : basic helix loop helix proteins; CREB : C-AMP Response Element-binding protein; PTBP1 : polypyrimidine tract-binding protein 1; REST : representational state transfer; SCP1 : small C-terminal domain phosphatase 1

Il est probable que miR-9/miR-9* et miR-124 coopèrent dans la levée de la répression des gènes neuraux (Packer et al., 2008 ; Conacoet al., 2006) pour diriger les progéniteurs vers un profil neuronal (Krichevsky, et al., 2006). Leur action conjointe a par ailleurs été démontrée dans le tube neural où elle assure la neurogenèse. La répression de la sous-unité BRG1/brm-associated factor subunit 53a (BAF53a), du complexe de remodelage de la chromatine BRG1/brm-associated factor SWItch/Sucrose Non Fermentable-like (BAF53Swi/Snf-like), et son remplacement par BRG1/brm-associated factor subunit 53b (BAF53b) joue un rôle dans la répression de la prolifération (Yoo et al., 2011, Yoo et al., 2009, Lessard et al., 2007). Dans les progéniteurs, REST maintient l'expression de miR-9 et miR-124 à un taux faible pour assurer la présence du transcrit BAF53a par inhibition de la transcription de BAF53b (Yoo et al., 2011). Le switch de régulation qui aboutit à la répression de REST par miR-9 et miR-124 permet la transition des cellules en phase de différenciation (Akerblom et al., 2012), par l'expression de facteurs de transcription neurogéniques tels que neurogenic differentiation factor 2 (NeuroD2), Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1 (Ascl1 ou Mash1, pour mammalian achaete scute homolog-1) ou myelin transcription factor 1-like (Myt1L) (Yoo et al., 2009) (**Figure 18**). Au cours de la différenciation, ils favorisent les phénomènes de maturation et le maintien de l'identité neurale en régulant la voie signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) par inhibition de sa phosphorylation (Krichevsky et al., 2006), qui conduit à la diminution de son activation et de sa translocation au noyau (Aaronson et al., 2002 ; Boeuf et al., 2001). STAT3 est impliqué dans les processus de prolifération, de différenciation, d'apoptose et de survie (Ihle, 2001, Dziennis et Alkayed, 2008), via lesquels il assure le maintien du pool de progéniteurs neuronaux et à la survie des neurones différenciés (Kerek et al., 2013). Il contribue également à l'intégration des neurones et à la croissance des neurites (Conway, 2006, He et al., 2005).

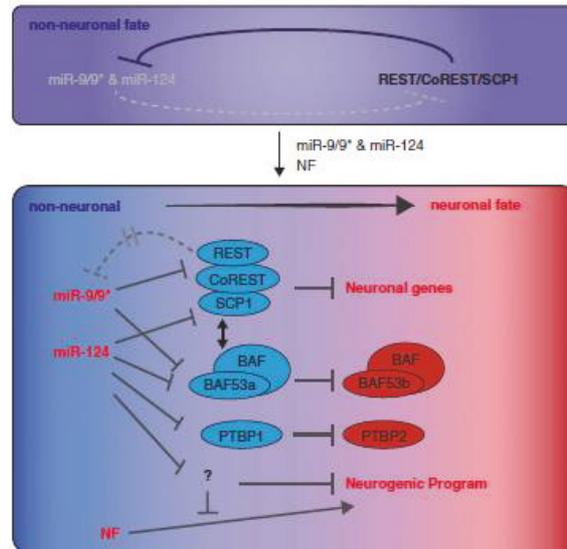


Figure 18 : Exemple de boucle de rétro-contrôle impliquant miR9/miR-9*, miR-124 et REST/SCP1 (Sun et al., 2013).

MiR-9/9 et miR-124 sont réprimés de manière synergique dans les cellules non-neuronales. La répression de miR9/9* et miR-124 fait intervenir des facteurs répresseurs des acteurs neurogéniques comme SCP1, le complexe REST ou les complexes non-neuronaux BAF, de sorte à promouvoir l'expression des gènes non-neuronaux.*

Une augmentation d'expression de miR-9/9 et miR-124 conduit à un switch en faveur d'un profil neuronal. MiR-9 et miR-124 assurent la répression de nombreux facteurs, comme REST, BAF53a et PTBP1 qui assurent normalement la répression de la neurogenèse. La synergie de ces miRs suggère une action programmée sur différentes cibles au cours de la conversion neuronale.*

BAF53a : BRG1/brm-associated factor subunit 53a ; NF : facteurs de transcription neurogéniques ; PTBP1 : polypyrimidine tract-binding protein 1 ; REST : representational state transfer ; SCP1 : small C-terminal domain phosphatase 1

D'autres miRs sont mis en jeu tels que lethal-7 (let-7) (Schwamborn et al., 2009), miR-23 (Lin et Fu, 2009), miR-34a (Aranha et al., 2011).

Let-7 est impliqué dans la fermeture du tube neural en réprimant tripartite motif containing 71 E3 ubiquitin protein ligase (Trim71) (Maller Schulmann et al., 2008). Il réprime des gènes de la prolifération qui inhibent la différenciation comme c-Myc, Pax6, Ascl1, et des facteurs de transcription comme HBL-1 et DAF-12 (Ramachandran et al., 2010, Sampson et al., 2007, Grosshans et al., 2005, Abrahante et al., 2003, Lin et al., 2003). Son expression augmente au cours du développement : il est absent ou faiblement exprimé dans les cellules souches et les progéniteurs (Wulczyn et al., 2007, Thomson et al., 2004) tandis qu'il est fortement exprimé dans les phases tardives du développement et dans les tissus adultes (Sempere et al., 2004; Thomson et al., 2004). Let-7a induit la différenciation neuronale par association à Tripartite motif-containing protein 32 (Trim32) et AGO1 (Schwamborn et al., 2009). Let-7b induit également la différenciation en favorisant la sortie du cycle cellulaire en réprimant un régulateur de la cycline D1, un récepteur TLX activateur de la voie Wnt/ β -cathénine (Qu et al., 2010, Zhao et al., 2010, Nishino et al., 2008). Let-7 est capable d'inhiber la croissance cellulaire dans les cellules cancéreuses (Takamizawa et al., 2004) en réprimant l'expression de RAS et MYC (Johnson et al., 2005), ce qui réduit l'activation des voies liées aux Mitogen-activated protein kinases (MAPK).

miR-23 est associé à une augmentation de la croissance cellulaire (Cheng et al., 2005) et à une répression de la migration cellulaire. Il module la sensibilité des neurones à l'apoptose et est lié à une réduction de la mort cellulaire par répression du ligand Fas, qui pourrait exercer un rétro-contrôle sur son expression (Li et al., 2013) et celle de Apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf-1) (Chen Qet al., 2014). La répression de la migration répond à une inhibition de p21 Protein-Activated Kinase 6 (PAK6) qui conduit à un défaut de phosphorylation LIM domain kinase 1 (LIMK1) associé à une répression de la cofilin ; miR-23 aboutit ainsi à une maintenance du cytosquelette d'actine (Cai et al., 2015). miR-23 intervient également dans la mise en place des cellules gliales et la myélinisation (Lin et al., 2014). Une augmentation excessive de Lamin B1 (LMNB1) aboutit à un arrêt prématuré de la différenciation des oligodendrocytes (Lin et Fu, 2009) par répression du gène de la myéline. miR-23 assure la différenciation et la myélinisation en réprimant la LMNB1. Il réprime également Phosphatase and Tensin homolog (PTEN), ce qui contribue à l'expression des voies phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Protein kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin

(mTOR) et MAPK et aboutit à l'expression de la myéline, au moins en partie par la voie phosphatidylinositol 3, 4, 5 trisphosphate (PIP3) (Lin et al., 2013).

miR-34a stimule la différenciation neuronale. Il existe une voie de rétro-contrôle entre miR-34 et Tumor protein p53 (p53), qui assure la régulation des mécanismes d'induction de la différenciation (Jain et al., 2012). Dans les cellules souches neurales, miR-34 réprime SIRT1 et favorise par ce biais l'activité p53 ; ce qui aboutit à une stimulation de la différenciation et à une croissance neuritique (Aranha et al., 2011). D'un autre côté, miR-34 peut contribuer à la différenciation astrocytaire de manière SIRT1-indépendante (Aranha et al., 2011). D'une manière p53-dépendante, miR-34 aboutit à la répression de la voie Wnt/ β -Cathénine qui aboutit à une inhibition de la prolifération et des capacités de migration cellulaire (Kim et al., 2011). miR-34 réprime la β -Cathénine et certains transcrits impliqués dans la voie, ce qui aboutit à l'inhibition du complexe de transcription β -Cathénine-T-cell factor/lymphoid enhancing factor (TCF/LEF) (Kim et al., 2011). Il contribue à la régulation de la voie Notch en ciblant directement son ligand Delta-Like1 (Dll1), ce qui favorise la différenciation neuronale et les mécanismes d'apoptose en inhibant les capacités prolifératives des cellules (De Antonellis et al., 2011). miR-34 intervient également dans la répression des phénomènes de transition épithélio-mésenchymateuse et de migration cellulaire en réprimant l'activation de STAT3 par répression de l'Interleukin-6 (IL6) (Rokavec et al., 2014). Il contribue de la même manière à la répression de la voie Akt/Pi3K/PTEN et de STAT3 (De Antonellis et al., 2011) (**Figure 19**).

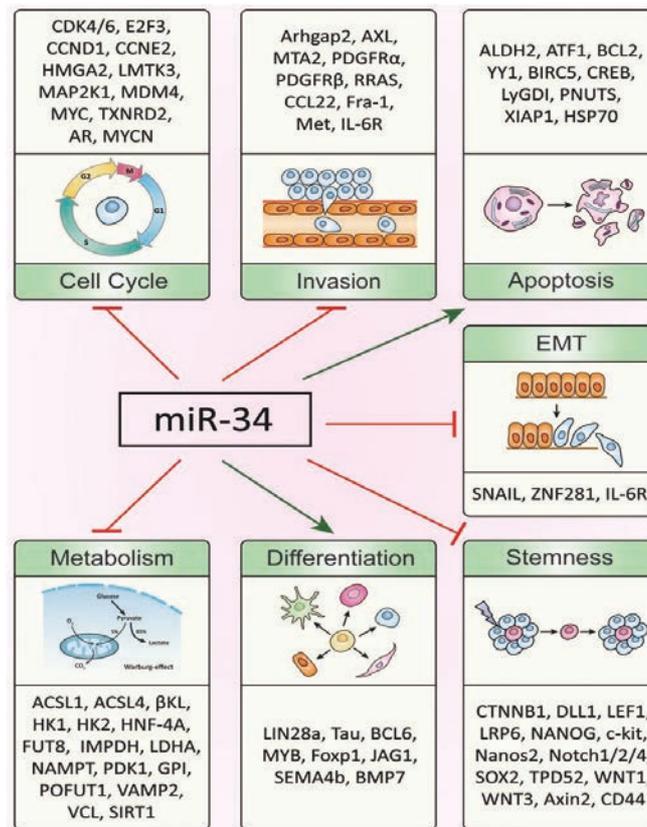


Figure 19 : Voies de régulation sous contrôle de miR-34 (Rokavec et al., 2014).

miR-34 est un régulateur majeur de la balance prolifération/différenciation. Son action de répression sur des cibles telles que DLL1/Notch, SOX2 ou NANOG contribue à la régulation des cellules souches. Cette action est étroitement liée à la régulation du cycle cellulaire, par répression de CDK, MAPK ou MYC. Il contribue également à la régulation des capacités de transition épithélio-mésenchymateuse et d'invasion par la régulation de cibles telles que IL-6R ou PDGFR. Parallèlement, miR-34 conduit à une régulation du métabolisme qui accompagne les phénomènes de différenciation, qu'il favorise via LIN28a, Foxp1, JAG1 ou BMP7, et de mort par apoptose, via la régulation de CREB, BCL2 ou HSP70.

BCL2 : B-cell lymphoma 2; BMP7 :Bone morphogenetic protein 7 CDK : Cyclin-dependent kinase; CREB : C-AMP Response Element-binding protein; DLL1/Notch : Delta-like1/Notch; Foxp1 : Forkhead box protein P1; HSP70 : Heat Shock Protein 70; IL-6R : Interleukin-6 receptor; JAG1 : jagged 1 protein;LIN28a : Lin-28 Homolog A; MAPK :Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1; MYC : Proto-Oncogene C-Myc; NANOG : NanogHomeobox; PDGFR :Platelet-derived growth factor receptors;SOX2 : sex determining region Y-box 2

b. Maturation cérébrale, plasticité synaptique et mémorisation

Au cours de la maturation du système nerveux central, d'autres miRs interviennent également comme miR-132 (Wanet et al., 2012) et miR-137 (Smrt et al., 2010).

CREB est un facteur de transcription impliqué dans le développement, la maturation et la plasticité neuronale. CREB et miR-132 sont sujets à un rétro-contrôle (Sakamoto et al., 2011). Sous l'activation de CREB, miR-132 favorise la croissance neuritique par répression de p250GAP (Wayman et al., 2008, Vo et al., 2005), la survie et l'intégration des neurones aux circuits synaptiques (Luikart et al., 2011 ; Pathania et al., 2012). miR-132 participe également à la régulation de DNMT3a (Miller et al., 2012, Magill et al., 2010). Or, DNMT3a est indispensable aux mécanismes d'apprentissage, de mémorisation et de plasticité synaptique dans l'hippocampe (Feng et al., 2010). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) est associé à l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation comme MAPK/Extracellular signal-regulated kinases (ERK), phospholipase C γ (PLC γ) et PI3K, qui sont indispensables à la différenciation, à la survie, à la croissance neuritique ainsi qu'à la plasticité synaptique (Numakawa et al., 2010a, Minichiello, 2009, Reichardt, 2006, Huang and Reichardt, 2003). C'est un acteur principal de la plasticité synaptique en assurant le maintien des α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA) et N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) à la synapse (Remenyi et al., 2013, Yoshii et Constantine-Paton, 2010, Caldeira et al., 2007a, Caldeira et al., 2007b). Par l'activation de la voie MAPK/ERK il contribue au maintien des récepteurs au glutamate ainsi qu'à l'augmentation du nombre post-synaptique de sous-unités AMPAR GluR1, NMDAR NR2A, NR2B, mais aussi de l'expression pré-synaptique de synapsine I (SYN1) et synaptotagmine (SYT) (Tuerxun et al., 2010, Kumamaru et al., 2008). La stimulation par BDNF (Remenyi et al., 2010) est associée à une augmentation de la voie de signalisation CREB, qui fait intervenir la voie ERK pour favoriser l'expression des récepteurs au glutamate (Tuerxun et al., 2010, Kumamaru et al., 2008, Matsumoto et al., 2006) et de miR-132. Ce miR est aujourd'hui fortement associé aux capacités cognitives (Hernandez-Rapp J et al., 2015), mais doit rester exprimé dans une certaine mesure pour assurer les processus de transmission synaptique et de mémorisation (Hansen et al., 2013, Scott et al., 2012). Dans son rôle de régulateur de la plasticité synaptique, il semble coopérer avec miR-34a (Joilin et al., 2014)

pour la régulation de MAPK1, induite par la potentialisation à long terme (LTP). Son inhibition conduit à une réduction de la prolifération cellulaire dans l'hippocampe et à une diminution de l'expression post-synaptique de post-synaptic density protein 95 (PSD-95) sans altérer le profil des synapsines pré-synaptiques (Yi et al., 2014). miR-132 a également un rôle neuroprotecteur en maintenant l'expression du BDNF par répression de Nuclear receptor related 1 protein (Nurr1) (Lungu et al., 2013) et en régulant l'apoptose par répression de PTEN/P300/Forkhead box O3a (FOXO3a), qui sont des acteurs clés de la voie de signalisation AKT (Wong et al., 2013). miR-132 est réprimé dans les neurones destinés à mourir par une diminution des marques H3K4me2 et H3K9ac au niveau de son promoteur, de sorte à lever son effet neuroprotecteur (Hwang et al., 2014) (**Figure 20**).

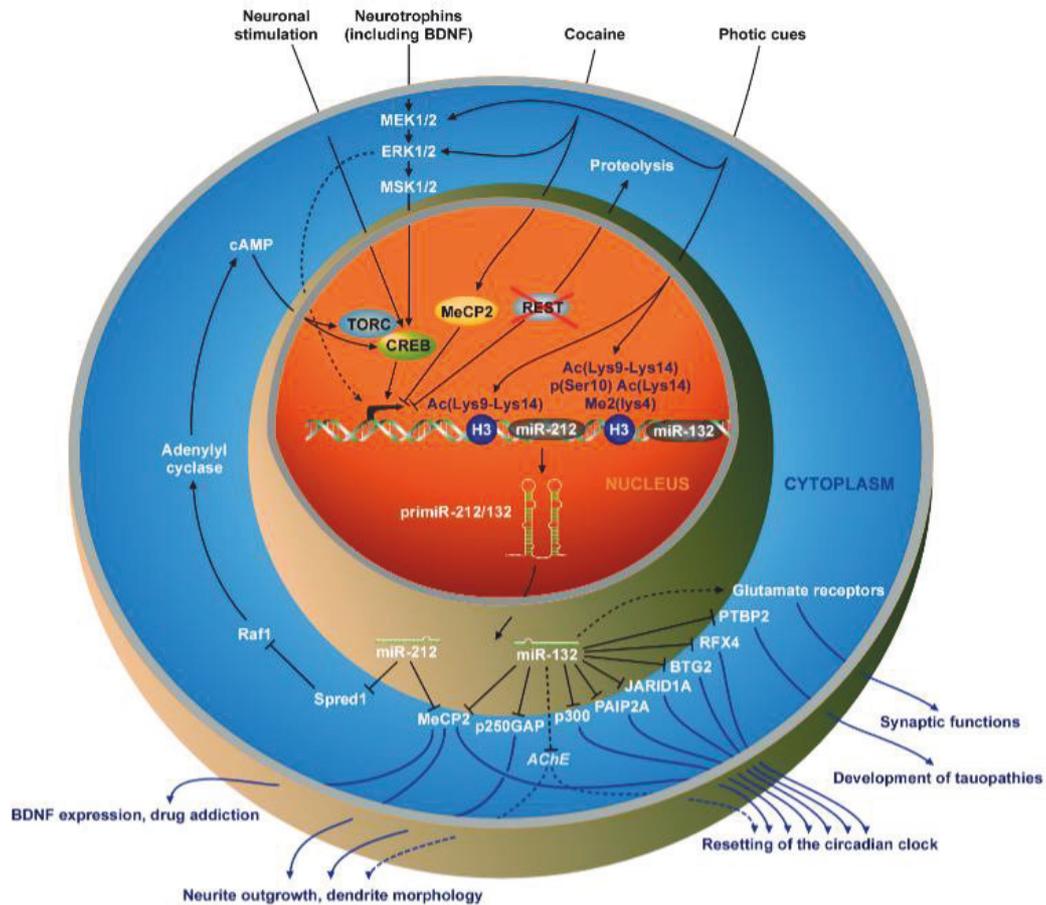


Figure 20 : Voies de régulation impliquant miR-132 dans le système nerveux central (Wanet et al., 2012)

miR-132/miR-212 sont des miRs principalement présents dans le cerveau au cours de la maturation ou à maturité. La stimulation neuronale ou l'action de neurotrophines comme BDNF conduisent à l'activation de la transcription de ce cluster de miRs via l'activité du facteur de transcription CREB. Le profil d'acétylation contribue également à leur expression. *miR-132/miR-212* jouent un rôle dans la répression de MeCP2 et la régulation de l'expression de BDNF, de la morphologie dendritique ainsi que la de la croissance neuritique. *miR-132* participe également à la régulation de la fonction neuronale. Il réprime PTBP2, un acteur de l'épissage alternatif, qui favoriserait l'action des récepteurs au glutamate au cours de la fonction et de la plasticité synaptique.

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor; CREB: C-AMP Response Element-binding protein; MeCP2: methyl CpG binding protein 2; PTBP2: Polypyrimidine Tract Binding Protein 2

miR-137 est lui aussi enrichi dans les neurones où il contribue à la régulation de la prolifération, de la morphogenèse dendritique et de la maturation fonctionnelle des cellules (Smrt et al., 2010 ; Szulwach et al., 2010). Dans les cellules en prolifération, TLX et lysine (K)-specific demethylase 1A (LSD1), forment un complexe de répression de l'expression de miR-137. Lors du switch vers la différenciation, l'expression de miR-137 aboutit à un rétro-contrôle sur LSD1 dans les neurones post-mitotiques (Sun et al., 2011). Son expression bloque le cycle cellulaire en phase G1/S pour promouvoir la différenciation en inhibant les cyclin-dépendant kinases (CDK) (Jiang et al., 2013, Sun et al., 2011, Szulwach et al., 2010, Tarantino et al., 2010, Silberet al., 2008). Dans le cerveau adulte, son expression est régulée par Sox2, facteur de transcription d'auto-renouvellement, et la protéine de liaison à l'ADN MeCP2, qui contribue à la levée de l'inhibition de Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2), responsable de l'augmentation de la marque H3K27 (Szulwach et al., 2010). A la suite de la différenciation, miR-137 est impliqué dans la maturation neuronale par son rôle dans la régulation de la morphogenèse dendritique et la mise en place des épines dendritiques. miR-137 peut réprimer Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (Mib-1), une ubiquitine-ligase de la membrane post-synaptique, de sorte à réguler la croissance axonale (Smrt et al., 2010). Dans le cadre de l'activité synaptique, mir-137 cible la cyclo-oxygénase-2 (COX2), exprimée dans les dendrites des neurones excitateurs (Breder et al., 1995) et précurseur de Prostaglandine E2 (PGE2) qui peut lier des récepteurs pré-synaptiques pour activer la voie AMPc/protéine kinase A (cAMP/PKA) impliquée dans la libération du glutamate et la transduction du signal (Akaneya, 2007). L'expression de miR-137 doit ainsi être maintenue dans une certaine mesure. miR-137 réprime transcription factor 4 (TCF-4), un facteur de transcription nucléaire qui intervient dans la régulation de la modulation des signaux sensoriels (Kwon, et al., 2011, Brzozka et al., 2010). miR-137 intervient également dans la régulation de Zinc finger protein 804A (ZNF804A) qui contribue à la migration neuronale et à la plasticité synaptique par son intervention dans la signalisation de la dopamine. ZNF804A cible Catechol-O-méthyltransferase (COMT), une enzyme qui dégrade la dopamine par méthylation (Girgenti et al., 2014). La répression de ZNF804A aboutit à une hyperactivité dopaminergique, néfaste pour le neurone d'autant plus que ZNF804A est également associé à la régulation de Dopamine receptor D2 (DRD2) (Girgenti et al., 2014) (**Figure 21**).

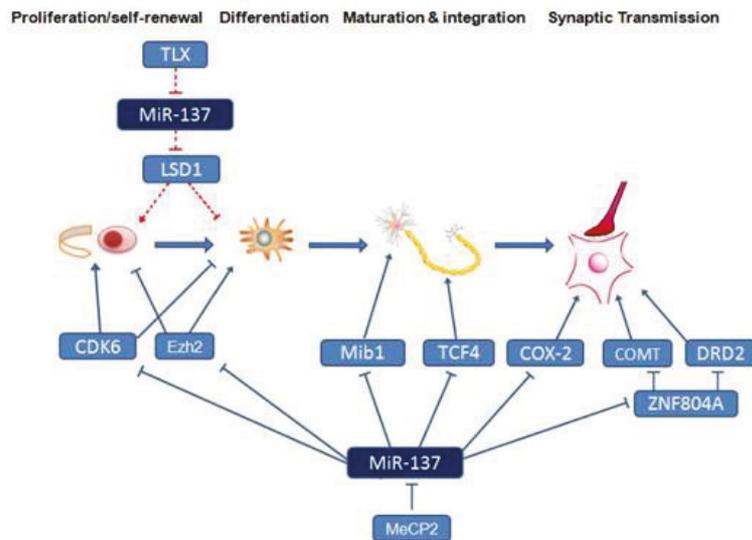


Figure 21 : Voies de régulation du système nerveux par miR-137 (Yin et al., 2014).

En bleu les voies présentes chez l'embryon, en rouge les voies présentes chez l'adulte.

Dans les cellules en prolifération, miR-137 est réprimé par TLX, ce qui autorise l'action de LSD1 sur les cellules de sorte à privilégier l'autorenouveau et réprimer la différenciation. miR-137 contribue à la différenciation en réprimant LSD1 ou des acteurs du cycle cellulaire tels que CDK6. Lors de la maturation et de la fonctionnalisation du système nerveux central, sa régulation par MeCP2 contribue à l'expression de Ezh2 et au contrôle de la méthylation H3K27 répressive. La répression de Mib1 et TCF4 participe au contrôle de la croissance axonale et la modulation des signaux sensoriels. Plus tard, son action sur COX-2 et ZNF804A contribue à la régulation de l'activité neuronale et à la plasticité synaptique.

CDK6: Cyclin-dependent kinase 6; COX-2: Cyclo-oxygenase 2; Ezh2: Enhancer Of Zeste Homolog 2; LSD1 : lysine (K)-specific demethylase 1A; MeCP2 :methyl CpG binding protein 2; Mib1 : E3 ubiquitin-protein ligase 1; TCF4 : Transcription Factor 4; TLX: The Human Orphan Nuclear Receptor Tailless; ZNF804A : Zinc finger protein 804A

c. Altération de l'expression des miRs et anomalies du SNC

L'expression des miRs joue un rôle crucial dans le développement du système nerveux central (Cochella et Hobert, 2012) où ils régulent ainsi spécifiquement les mécanismes biologiques (neurogenèse, différenciation...) qui interviennent à des moments précis du développement (embryogénèse ou maturation post-natale) (Olde Loohuis et al., 2012). A l'extrémité antérieure, l'altération de l'expression de miR-9 contribue à des défauts de compartimentation de certaines régions cérébrales dont il est un acteur clé (Cochella et Hobert, 2012). Une surexpression de Let-7 est impliquée dans la répression de l'expression de Trim71 et est associée à de nombreuses anomalies de fermeture du tube neural antérieur comme les exencéphalies, ainsi que dans l'augmentation de la létalité intra-utérine (Maller Schulmann et al., 2008). La régulation de l'expression du ligand Dll1 par miR-34a est indispensable à la régulation de la voie impliquant le récepteur Notch. Une expression inappropriée de miR-34a et l'activation prématurée de la différenciation neuronale ont été impliquées dans des défauts de fermeture du tube neural postérieur (Ichi et al., 2010). miR-124 est nécessaire à l'acquisition d'un phénotype neuronal par les progéniteurs lors de l'induction de la différenciation. S'il n'est pas correctement exprimé, la voie STAT3 et la neurogenèse sont perturbées (Krichevsky et al., 2006). Dans le cerveau mature, la surexpression pathologique de certains miRs peut influencer les capacités cognitives ; miR-34 est connu pour avoir un effet négatif sur l'apprentissage et la mémorisation dépendants de l'hippocampe par son action de répression de SIRT-1. miR-132 et miR-137 sont également des acteurs majeurs du fonctionnement cérébral et de la mémorisation puisqu'ils régulent la plasticité synaptique (Pai et al., 2014, Kawashima et al., 2010). Dans ces mécanismes, miR-124 est prédit par bioinformatique pour être un régulateur potentiel de AMPAR2, tandis que des études mettent en évidence le rôle de Let-7 dans la régulation de AMPA2 et de miR-132 dans celle de AMPAR1, NMDAR2A et NMDAR2B, par des mécanismes indirects non élucidés. Les miRs peuvent également réguler le cycle des monocabones puisque la méthyl-tetrahydrofolate reductase (MTHFR), nécessaire à la formation du 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-me-THF), est une cible de miR-34 (Shookhoff et Gallicano, 2010). Une altération du cycle des folates et de l'homocystéine aboutit à un défaut de méthylation. Enfin, un défaut dans la biogenèse des miRs peut aussi intervenir dans des pathologies génétiques. Un défaut de

DGCR8 est impliqué dans le syndrome de DiGeorge, tandis qu'un défaut de FMRP participe au syndrome du X-fragile (**Figure 22**).

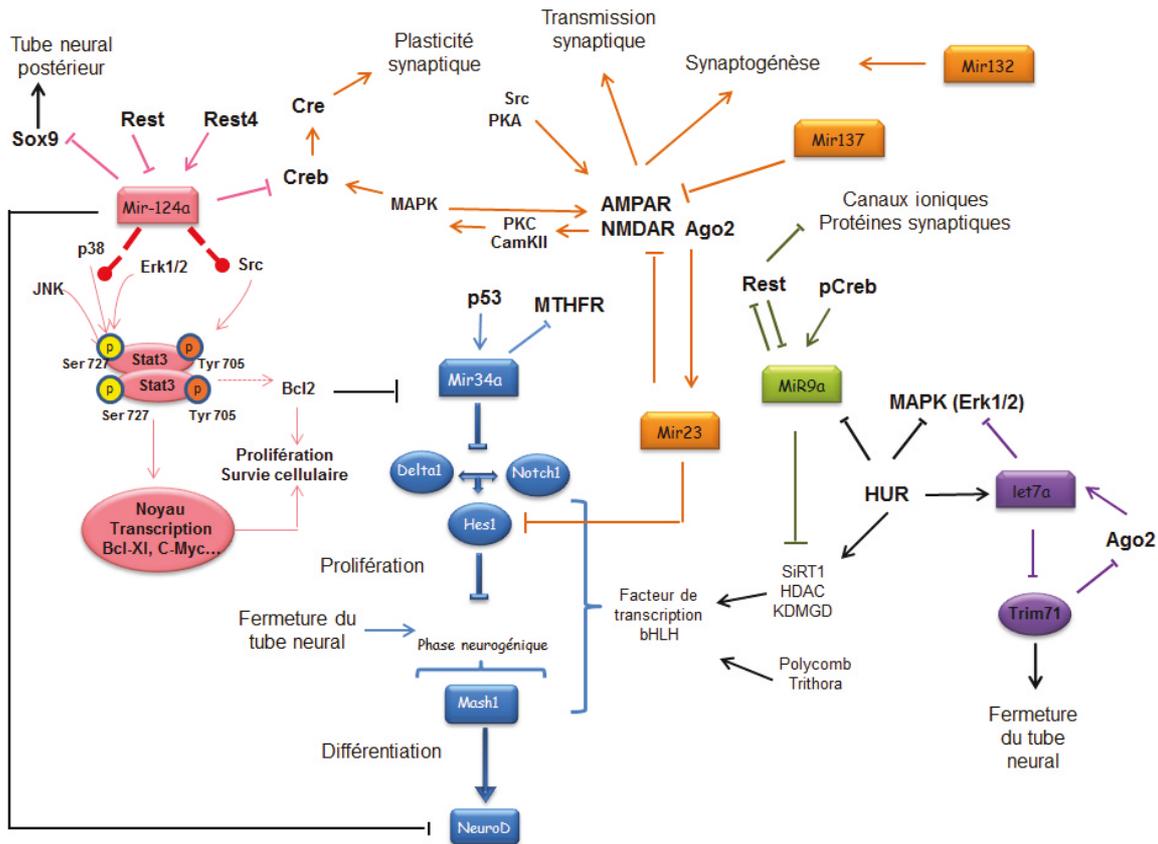


Figure 22 : Représentation de voies majeures de la régulation du développement du système nerveux central

Les miRs sont des régulateurs post-transcriptionnels qui participent à la régulation de l'ensemble des phénomènes biologiques. Au cours du développement *let-7a* est indispensable à la fermeture du tube neural antérieur en réprimant l'expression de *Trim71*. *miR-34a* est nécessaire au contrôle de la transition prolifération/différenciation par la régulation de la voie *Dll1/Notch* et des facteurs de transcription *bHLH*, assurant la fermeture du tube neural postérieur. *miR-9* régule des acteurs du remodelage de la chromatine. Il contribue notamment à la compartimentation des différentes régions cérébrales. De manière concomitante, *miR-124a* est nécessaire au contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire pour assurer un pool de progéniteurs neuronaux suffisant à la mise en place du système nerveux central. Il régule notamment la voie *STAT3* et l'équilibre entre les acteurs pro- et anti-apoptotiques. Plus tard il contribuera également à la régulation de la plasticité synaptique par la régulation des voies de réponse à l'activation des récepteurs au glutamate via *Src* et *CREB*. *miR-137* et *miR-132* sont également des acteurs de la régulation de la plasticité synaptique après la stimulation des neurones. Il participe à la régulation de l'activité de *CREB* qui peut passer par une cascade de kinases. *miR-23* pourrait intervenir au cours des différentes étapes de développement et maturation en régulant l'expression des *bHLH* ou des récepteurs au glutamate.

4. Voies de régulation mises en jeu

a. *STAT3*

STAT3 est un facteur de transcription indispensable à la régulation de la survie, au maintien de l'état indifférencié et à la neuroprotection (Zhao et al., 2011). Différents signaux extracellulaires via des cytokines (interleukines, Granulocyte-colony stimulating factor, ...), ainsi que des hormones (growth hormone, érythropoïétine, thrombopoïétine, ...) ou des interférons, contribuent à l'activation de récepteurs par dimérisation suite à l'activation d'une tyrosine kinase non-récepteur associée (NRTK) qui permet le recrutement de différents effecteurs. La dimérisation du récepteur provoque la dimérisation des Janus Kinase 1 et 2 (JAK1 et 2) associées, qui s'activent par auto-phosphorylation mutuelle. Le dimère JAK1/2 phosphoryle le récepteur sur des résidus tyrosines et assure le recrutement des protéines STAT3 ; ce qui donne le nom commun « JAK-STAT » à cette voie (Mihara et al., 2012, Murray et al., 2007). La protéine STAT3 est à son tour phosphorylée. Les JAK contribuent à la phosphorylation des tyrosines du domaine de dimérisation comme la Tyr705 et à la translocation du dimère. La phosphorylation des tyrosine kinases peut également faire intervenir des kinases cytoplasmiques comme Src (Yu et al., 2009a, Turkson et al., 1998) selon le ligand et le récepteur impliqués. Une seconde vague de phosphorylation des sérines, comme la Ser727, via Erk (MAPK) (Decker et Kovarik, 2010, Lin et al., 2009), Protein kinase C (PKC) ainsi que par d'autres acteurs comme p38 ou c-Jun N-terminal kinase (JNK) permet la régulation de l'activité de facteur de transcription de STAT3 sur les séquences consensus interféron-stimulated responsive element (ISRE), accompagnée ou non d'autres facteurs de transcription ou de remodelage de la chromatine (acétyltransférases CREB-binding protein (CBP)/P300, BRG/BRM, ...). Cette activité peut être régulée par des tyrosine-phosphatases spécifiques des JAK et des inhibiteurs Cis qui fixent le récepteur phosphorylé ainsi que par des mécanismes de rétro-contrôle, notamment par Suppressor of cytokine signaling (SOCS), un des gènes activés par la fixation du dimère STAT3. STAT3 non phosphorylé pourrait toutefois avoir une activité de régulation des gènes dans le noyau en induisant la translocation d'autres protéines (Timofeeva et al., 2012, Wakahara et al., 2012, Vogt et al., 2011). Au cours du développement, son rôle est primordial puisque son absence est associée à une létalité

précoce, avant même la gastrulation (Takeda et al., 1997) et sa répression est associée à une différenciation spontanée. Son expression dans les premières semaines de grossesse est indispensable à la prolifération et à la migration cellulaire utérine (Weber et al., 2012, Poehlmann et al., 2005) nécessaire à la mise en place du placenta. Son expression contribue à l'implantation de l'embryon et à son développement. Elle augmente au cours de la grossesse (Deverman et Patterson, 2009) et sa répression est associée à un risque d'avortement spontané (Wang et al., 2012b, Mulla et al., 2010). STAT3 est connu pour intervenir dans la prolifération, la survie, la croissance cellulaire et la différenciation (Marase et al., 2012, Yoon et al., 2012, Cheng et al., 2011). L'action conjointe des facteurs de transcription STAT3, NANOG et octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) active le cycle cellulaire et participe au maintien des cellules à l'état indifférencié (Do et al., 2013, Hawkins et al., 2012). De plus, STAT3 contribue au remodelage de la matrice cellulaire pour le maintien de l'auto-renouvellement cellulaire (Przybyla et al., 2013). Par son rôle de régulateur de c-myc et c-fos, STAT3 contribue au passage d'un stade quiescent à la phase G1 du cycle cellulaire (Kiuchi et al., 1999), il intervient également dans le passage de la phase G1/S via son action sur les cyclines D et E/Cdk2 (Leslie et al., 2006, Barre et al., 2005). Au niveau de la transition G2/M, il peut cependant avoir un effet répresseur par son action sur la voie p21/p53 (Huang et al., 2012, Hawthorne et al., 2009, Bienvenu et al., 2005). STAT3 contribue à la survie cellulaire en activant les protéines anti-apoptotiques B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large(Bcl-xl), Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1 (Mcl1) et Akt (Choi et al., 2009, Park et al., 2005) et en réprimant les protéines pro-apoptotiques Bcl-2-associated X protein (Bax). En favorisant l'expression des survivines, STAT3 contribue à la répression des caspases (Gritsko et al., 2006, Catlette-Falcone et al., 1999). Il participe à la neuroprotection en favorisant l'expression des gènes de régulation de la régénération et du neurodéveloppement (Dziennis et Alkayed, 2008). La répression de STAT3 est associée à un retard de maturation des oligodendrocytes et à un défaut de myélinisation ; ce qui expliquerait que la dérégulation de STAT3 soit en lien avec des altérations cognitives (Park et al., 2013, Wan et al., 2010, Chiba et al., 2009) (**Figure 23**).

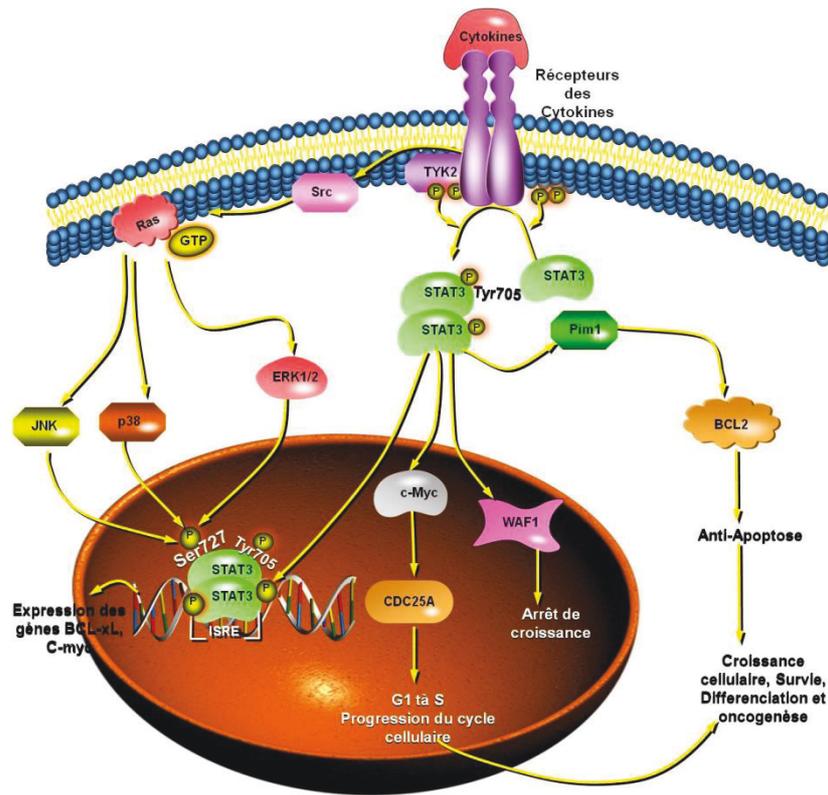


Figure 23 : Voie de signalisation STAT3 (www.sabiosciences.com, modifié).

La fixation de cytokines aux récepteurs des cytokines conduit à leur dimérisation suite à leur phosphorylation par des tyrosines kinase non-récepteur associées. La dimérisation des récepteurs permet l'autophosphorylation des protéines kinases associées et le recrutement des protéines STAT3. Les protéines kinases JAK associées aux récepteurs phosphorylent STAT3 pour permettre leur dimérisation. Le dimère phosphorylé pourra avoir une action directe sur certaines protéines telles que BCL2. D'autres kinases, Src, ERK1/2 p38 ou JNK peuvent phosphoryler STAT3 de sorte à permettre sa translocation au noyau. Par son rôle de facteur de transcription, il pourra réguler l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la survie, la différenciation et l'oncogénèse.

b. Dll1/Notch

La voie de signalisation Notch est connue pour réguler la prolifération et la différenciation des cellules souches et des progéniteurs neuronaux en modulant l'expression de facteurs de transcription intervenant dans le programme neurogénique (HES1) (Nagao et al., 2007). Il a été rapporté que les folates exerceraient une influence sur la prolifération cellulaire et la différenciation des cellules souches neurales au moins en partie par l'activation de cette voie (Zhang et al., 2008b, Mattson et Shea, 2003). Dll1 se lie au récepteur Notch et contribue à la régulation de facteurs de transcription comme Hes1 et Hes5 qui contrôlent le programme neurogénique. Hes5 et certains gènes Sox, notamment Sox-2, agissent en coopération pour contrôler la prolifération cellulaire (Lugert et al., 2010). Hes1 contribue à la répression des gènes pro-neuronaux par répression des bHLH comme Mash1, Math1 ou les neurogénines. Mash1 (ou Ascl1) conduit à l'induction de la différenciation (Sugimori et al., 2007). La cinétique d'expression des différents acteurs est donc un mécanisme indispensable au bon déroulement des étapes de développement puisqu'une inactivation de Hes1 et une expression inappropriée de Mash1 aboutit à une différenciation prématurée à l'origine de défauts de fermeture du tube neural (Copp et al., 2003), qui implique notamment les mécanismes de régulation épigénétiques folate-dépendants (Ichi et al., 2010). La répression exercée par les bHLH pro-neuronaux sur Pax6 réprime les capacités d'autorenouvellement des progéniteurs (Sansom et al., 2009 ; Sugimori et al., 2007) et favorise l'expression d'autres membres de la famille Pax impliqués dans la différenciation et l'identité neuronale comme Pax2 qui est indispensable à la formation du tube neural (Matsunaga et al., 2000). Il existe une interaction entre les voies Notch et STAT3 au cours de l'induction de la différenciation. La phosphorylation sur les Tyr705 et Ser727 nécessaire à l'activation de STAT3 est Notch-dépendante (Gouti et al., 2008) (**Figure 24**).

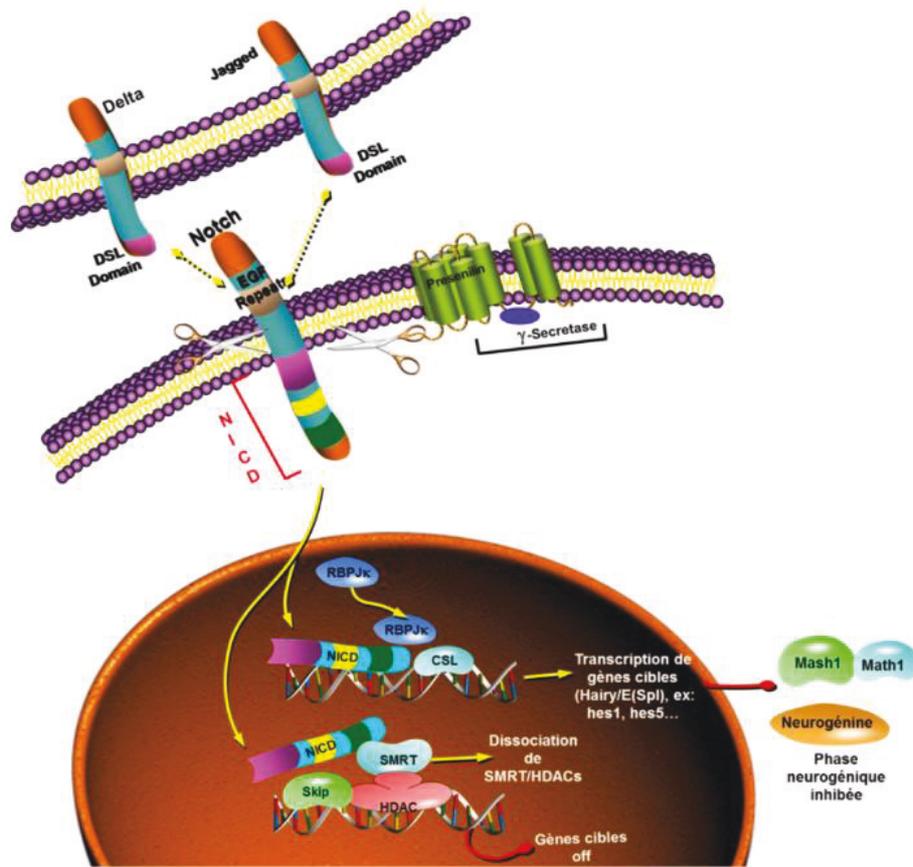


Figure 24 : Voie de signalisation Dll1/Notch (www.sabiosciences.com, modifié).

La fixation des ligands Delta-like 1 ou Jagged au récepteur Notch aboutit au clivage du domaine Notch intracellulaire (NICD) par l'action de γ -sécrétases. Il pourra réprimer l'expression de gènes en dissociant des acteurs de remodelage de la chromatine ou favoriser l'expression de gènes cibles, tels que les gènes de la famille Hes qui pourront réprimer des gènes neurogéniques. La voie Notch contribue ainsi à la régulation du switch entre prolifération et différenciation.

c. Récepteurs AMPA et NMDA

Dans l'hippocampe, les acteurs principaux de la plasticité sont les récepteurs au glutamate, notamment présents dans la couche nommée corne d'Ammon 1 (CA1) et connus pour participer au processus de mémorisation à court et long terme (Kelsch et al., 2014, Pereira et al., 2014). Subdivisés en plusieurs familles, ces récepteurs peuvent être ionotropiques (kaïnate, AMPA ou NMDA), à rôle de canaux ioniques, ou métabotropiques (metabotropic glutamate receptor, mGluRs), alors associés à des voies de signalisation qui peuvent aboutir à la modification de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place ou le fonctionnement de la synapse (Lohmann et Kessels, 2014, Huettner, 2003). Les récepteurs de type kaïnate interviennent principalement au cours du développement embryonnaire et fonctionnent de manière équivalente aux récepteurs AMPA. Les récepteurs AMPA et NMDA sont actifs sous forme tétramérique. Pour AMPA, se sont les formes 1 et 2 qui sont principalement présentes dans l'hippocampe du jeune individu et de l'adulte. La forme 2 est la seule forme perméable au calcium, c'est le ratio entre les sous-unités 1 et 2 qui définit l'activité de la synapse (Hamada et al., 2014, Hanley, 2014 Whitehead et al., 2013, Ju et al., 2004). Pour les récepteurs NMDA, ce sont les formes 2A et 2B qui sont prédominantes dans l'hippocampe adulte, en association avec la sous-unité 1. C'est dans ce cas la sous-unité 2B qui définit la perméabilité au calcium de la synapse (Glasgow et al., 2015, Murphy et al., 2014, Shipton et Paulsen, 2014, Garaschuk et al., 1996). Les récepteurs subissent un remaniement permanent de leur composition en sous-unités selon l'activité synaptique. Les récepteurs AMPA potentialisent les récepteurs NMDA ; ils agissent en synergie pour réguler l'activité et la plasticité synaptique et sont sujets à des rétro-contrôles (Gray et al., 2011, Derkach et al., 2007). Des mécanismes de phosphorylation permettent de moduler la signalisation AMPA/NMDA et de réguler la composition en sous-unités (Grau et al., 2014, Knox et al., 2014, Murphy et al., 2014 Wang et al., 2014), notamment par l'intervention d'acteurs post-synaptiques comme PSD95 (Ba et al., 2014). Selon le profil d'activité des synapses, deux sortes de plasticité peuvent se mettre en place : une « potentialisation à long terme » (ou long term potentiation, LTP) ou une « dépression à long terme » (ou long term depression, LTD). L'activation des récepteurs NMDA aboutit à un influx calcique avec pour cible des protéines kinases telles que calcium/calmodulin-dependent protein kinases II (CaMK II), PKA et PKC dans les épines dendritiques (Wang et al., 2014). Ces kinases

phosphorylent les récepteurs AMPA et NMDA, augmentant ainsi leur sensibilité. Dans le noyau, la CaMKII aura pour cible le facteur de transcription CREB, qui joue un rôle dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, de neurogenèse et de plasticité synaptique (Hardingham et al. 2010). La synthèse protéique locale permet d'augmenter le nombre de récepteurs, le trafic des récepteurs, les switch de sous-unités et l'ancrage aux protéines du cytosquelette qui favorisent l'expression de surface, la diffusion latérale et la stabilisation des récepteurs (**Figure 25**).

Au cours du développement et de la maturation cérébrale, des voies de signalisation majeures sont finement régulées pour assurer la mise en place et la fonctionnalité du système nerveux central (**Schéma de synthèse 2**). La dérégulation des différents acteurs moléculaires peut contribuer aux pathologies précédemment décrites (**Schéma de synthèse 1**).

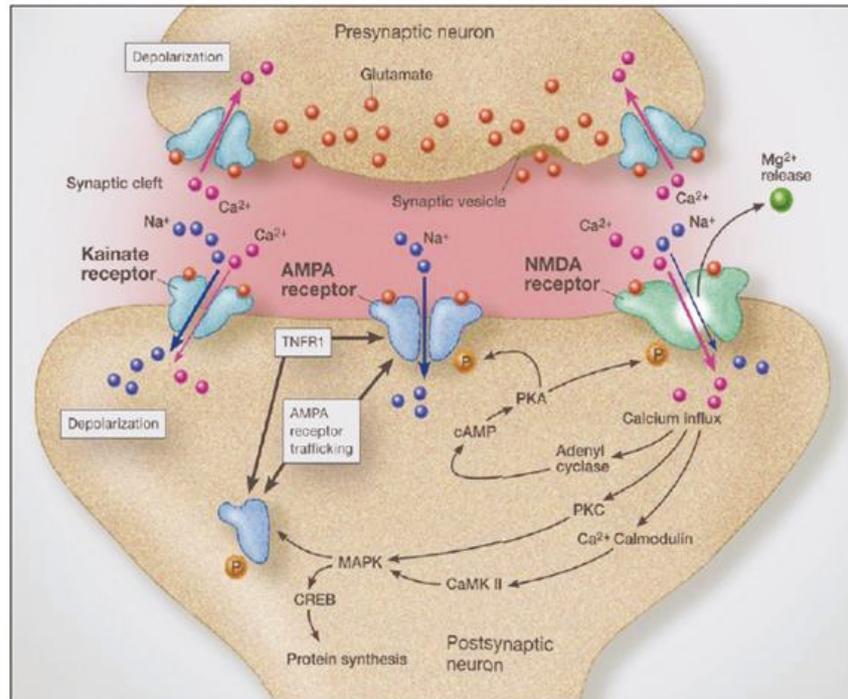


Figure 25 : Voies de signalisation des récepteurs AMPA et NMDA (Blaylock, 2013).

Dans les neurones, les types de récepteurs au glutamate sont au nombre de 3 : les récepteurs kainates semblent principalement impliqués lors du développement, les récepteurs AMPA et NMDA sont les formes présentes dans le cerveau adulte et sont des acteurs majeurs de la plasticité synaptique. Au cours de la stimulation neuronale, la libération de glutamate active le système de récepteurs AMPA/NMDA. L'influx de calcium qui suit l'activation des récepteurs aboutit à l'action d'une cascade de protéines kinases qui pourront agir directement sur les récepteurs. Leur phosphorylation peut moduler leur composition en sous-unités ou favoriser leur stabilité et leur activité. Les cascades de kinases peuvent également aboutir à la modulation de gènes par activation du facteur de transcription CREB de sorte à exprimer les différents acteurs mis en jeu dans les mécanismes de plasticité synaptique.

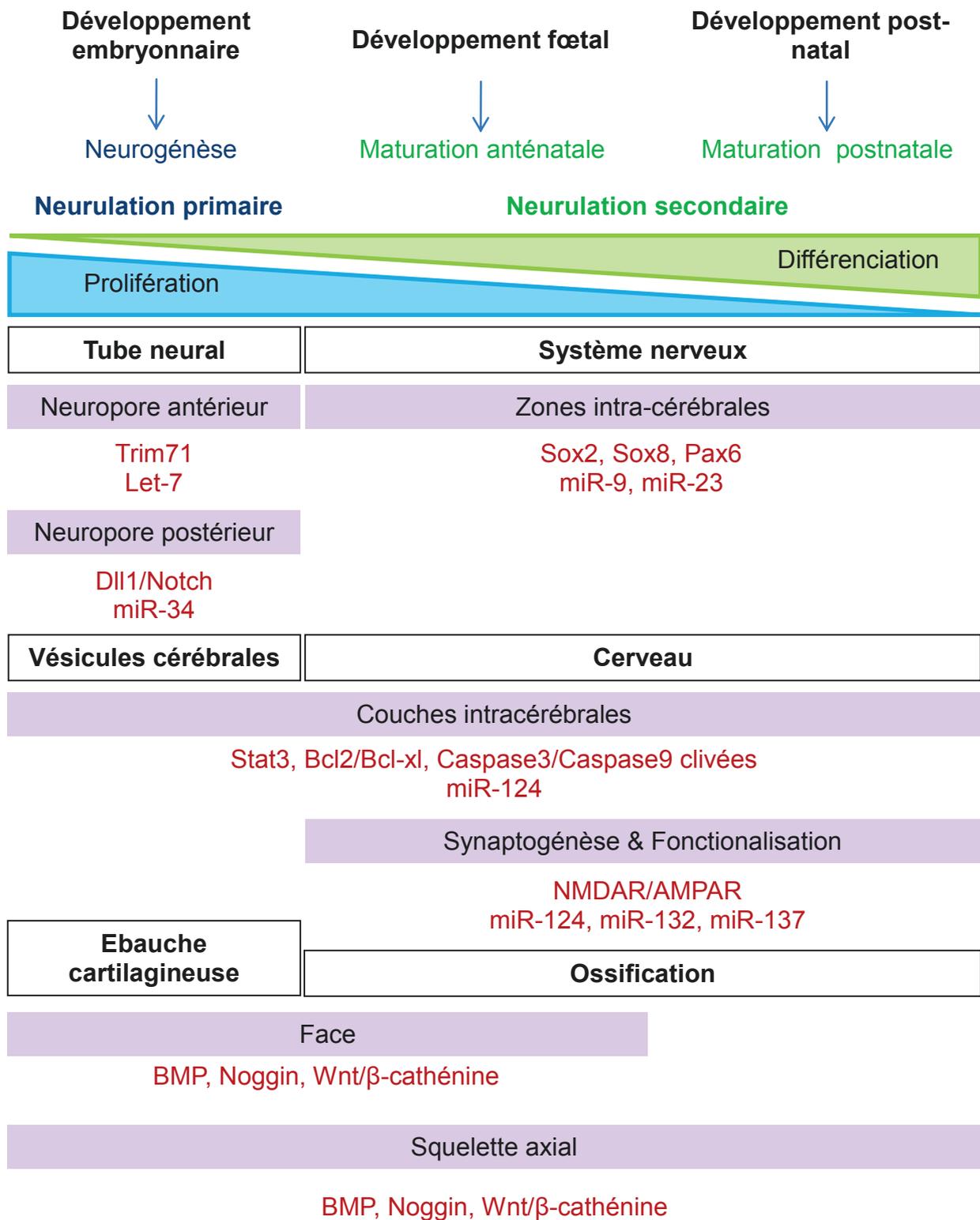


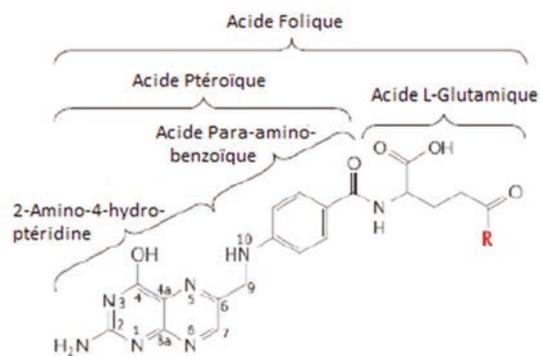
Schéma de synthèse 2: Voies de signalisation impliquées dans la mise en place du système nerveux et sa fonctionnalité.

III. Vitamines B9 et B12

1. La vitamine B9, ou folates

a. Structure, sources et besoins

Les folates (vitamines B9) sont des molécules hydrosolubles constituées d'un noyau ptérine, d'un acide para-aminobenzoïque et d'un acide glutamique (1 à 14 chaînes de glutamates) (Rebeille et al., 2006) (**Figure 26**). Déclinés sous la forme de nombreux dérivés, ils sont principalement organisés sous forme de polyglutamates (PG) liés à des protéines. Ce sont les dérivés réduits non oxydés qui constituent les formes biologiquement actives. Par leur rôle de co-substrats pour le transfert de groupes monocarbonés (Wagner, 1995) ils sont les acteurs principaux du cycle des folates.



R	Molécule
OH	Folate monoglutamique
Acide glutamique poly(γ -glutamyl) _n	Folate polyglutamique

Figure 26 : Structure de l'acide folique

L'acide folique est constitué d'un groupe 2-amino-4-hydro-ptérine et d'un acide para-amino-benzoïque qui forment un acide ptéroïque, lui-même associé à un acide L-glutamique pouvant porter un radical -OH s'il s'agit d'un folate monoglutamique ou une chaîne $-(\gamma\text{-glutamyl})_n$ s'il s'agit d'un folate polyglutamique.

La quantité nécessaire au renouvellement du stock est de 0,3mg/jour chez l'Homme. Puisque ces composés ne sont pas synthétisés par les mammifères, les principales sources d'acide folique proviennent de l'alimentation. On les trouve en forte quantité dans les abats (foies, rognons), les céréales et graines (blé, tournesols), les fruits (agrumes, abricots), les légumes verts et féculents (asperges, lentilles), le lait et les fromages fermentés (Iyer et Tomar., 2009). Une alimentation équilibrée suffit donc à couvrir les besoins quotidiens (**Tableau 1**) et correspond à 90% des apports, tandis que 10% sont synthétisés par la flore intestinale.

Individus	B9 - ANC (µg/jour)
Nourrisson	70
Enfant (1 à 12 ans)	150 – 250
Adolescent (13 à 19 ans)	300
Homme adulte	330
Femme adulte	300
Femme enceinte	400
Femme allaitante	400
Personne âgée (> 75 ans)	400

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en folates (AFSSA 2001)

b. Absorption des folates

L'action de protéases (pepsine, gastrine) et d'enzymes digestives spécifiques, comme la γ -glutamyl-hydrolase, permettent la rupture des liaisons aux protéines et l'hydrolyse des polyglutamates en monoglutamates (Yao et al., 1996).

L'internalisation cellulaire repose sur trois systèmes de transport. Les folates sont absorbés par les cellules intestinales du jéjunum proximal via un transport actif qui fait intervenir des « proton-coupled folates transporters » (PCFT) (Zhao et al., 2009) de forte

affinité pour l'acide folique. Le transport du folate est alors pH-dépendant et fait intervenir un co-transport d'ions H^+ . Ces récepteurs sont également exprimés dans le rein, le foie, le placenta, la rétine et le cerveau (Zhao et al 2009, Qui et al 2006). Des « reduced folate carriers » (RFC) sont présents mais non fonctionnels au niveau intestinal. Ils utilisent un transport PO_4^{3-} -dépendant qui est optimal à pH neutre. De haute affinité pour les folates réduits (Assaraf et Goldman 1997), ils interviennent dans les reins, les axones et dendrites ainsi que dans les cellules du canal rachidien (Wang et al., 2001). Les « folate receptors » (FR), qui utilisent un mécanisme d'endocytose, sont exprimés dans le cortex, le placenta, les glandes salivaires, l'utérus, le pancréas, les glandes bronchiques et les alvéoles pulmonaires, et sont de forte affinité pour l'acide folique et le 5meTHF. Ils sont présents dans un certain nombre de lignées tumorales, notamment IGROV1 (ovariocarcinoma, Weitman et al., 1992), Caco-2 (colon carcinoma) et KB (epidermoidcarcinoma) (Kane et al., 1986, Antony et al., 1985). Dans le cadre d'un excès de folates, il peut exister un gradient passif (Galivan et al., 2000, Nguyen et al., 1997, Rosenberg, 1990) (**Figure 27**).

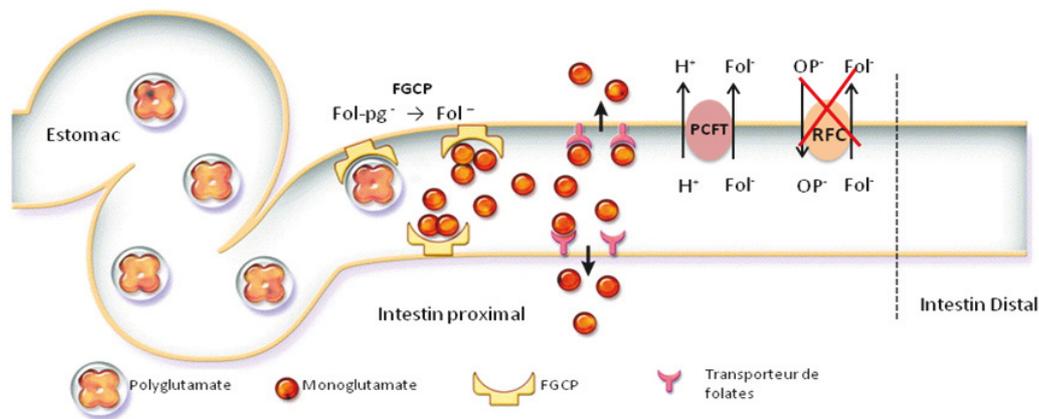


Figure 27 : Absorption intestinale des folates

Les enzymes digestives FGCP clivent les polyglutamates en monoglutamates, absorbables au niveau du jéjunum proximal. Trois transports de folates existent : les FR (transporteurs de folates) qui utilisent un mécanisme d'endocytose, les PCFT qui font intervenir un co-transport H^+ et les RFC qui se basent sur un transport PO_4^{3-} . Ces derniers ne sont pas fonctionnels au niveau intestinal.

FGCP : folylpolyglutamate carboxypeptidase ou γ -glutamyl-hydrolase, PCFT : proton-coupled folates transporter, RFC: reduced folate carriers, Transporteur de folates : folate receptor.

c. Cycle des folates

Les cellules intestinales peuvent transformer une fraction des folates en méthyl-tétrahydrofolates (Me-THF), par réduction (Rosenberg, 1990). Néanmoins, la majeure partie de l'acide folique est transférée en l'état aux cellules hépatiques, qui sont le lieu principal du métabolisme des monoglutamates.

Au sein des cellules hépatiques, l'acide folique (vitamine B9) est réduit en dihydrofolate (DHF) par la dihydrofolate-réductase (DHFR) puis en tétrahydrofolate (THF) par la même enzyme. Le THF peut être catabolisé en polyglutamates (PG) pour être stocké, ou être méthylé pour donner les formes circulantes du folate. Dans ce cas, la sérine hydroxyméthylase (SHMT) transforme un résidu sérine en glycine pour céder un groupement méthylène au THF et former une molécule de 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (5, 10meTHF) (Matthews et al., 1982). Le 5,10meTHF est alors réduit par la 5,10-méthylène-tétrahydrofolate-réductase (MTHFR) pour former le 5-méthyl-tétrahydrofolate (5meTHF) qui est pris en charge par la méthionine synthase (MTR ou MS) dont la vitamine B12 (Cbl, pour cobalamine) est le coenzyme. Cette réaction permet de reconstituer le pool de THF en libérant un groupement méthyle (-CH₃) (**Figures 28 et 29**). La forme Me-THF correspond également à la forme principale de transport et d'absorption pour les cellules périphériques.

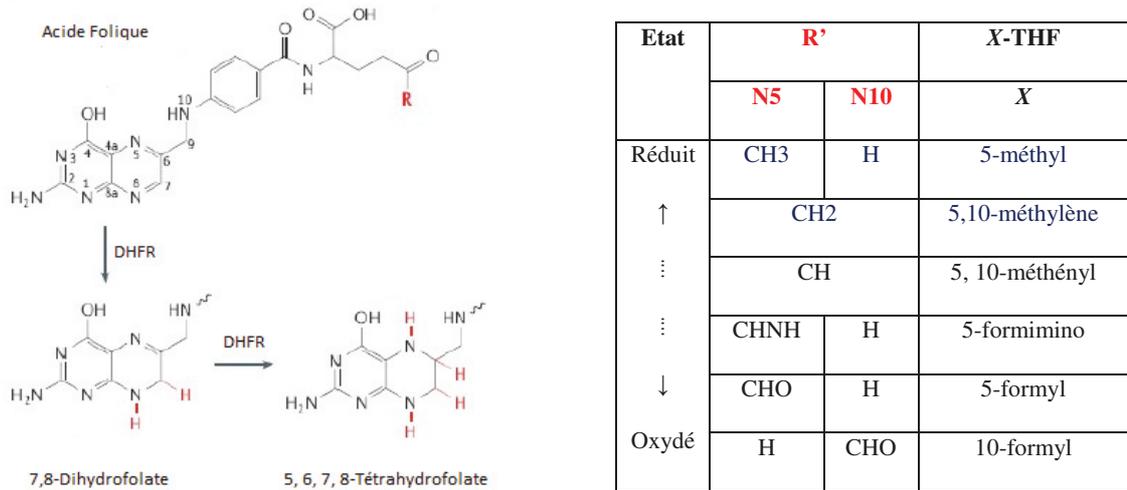


Figure 28 : Structures des formes tétrahydrofolates (THF) dérivées de l'acide folique

Les formes tétrahydrofolates (THF) dérivées de l'acide folique se différencient par leur groupement en N5 et N10. Les formes réduites 5-méthyl-THF et 5,10-méthylène-THF sont les formes biologiquement actives. Il existe également plusieurs dérivés réduits (méthylène-THF, formimino-THF ou formyl-THF).

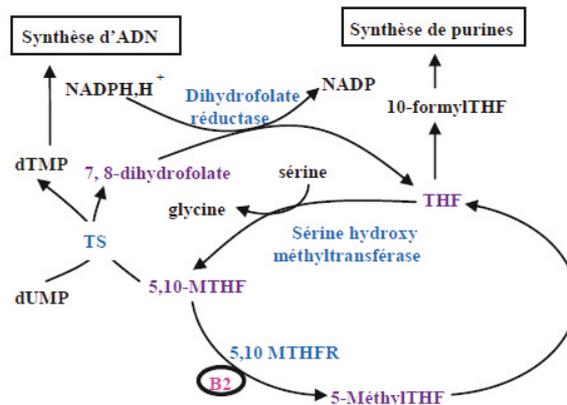


Figure 29 : Cycle des folates (d'après Tchantchou, 2006)

Le métabolisme des folates aboutit à la formation des dérivés THF des folates. La forme méthylée 5-méthylTHF est impliquée dans les réactions de transfert de groupement méthyle. La forme 5,10-méthylèneTHF puis 7.8-dihydrofolate assure la reconstitution du pool de THF. Les formes 5,10-méthylèneTHF et 10-formylTHF contribuent à la synthèse des constituants de l'ADN.

10-formylTHF: 10-formyl tétrahydrofolate, 5-MéthylTHF: 5-méthyl tétrahydrofolate, 5,10-MTHF: 5,10-méthylène tétrahydrofolate, 5,10-MTHFR: 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase, dTMP: déoxythymidine 5'-monophosphate, dUMP: déoxyuridine 5'-monophosphate, NADP: nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate, THF: tétrahydrofolate, TS: thymidylate synthase

La forme active 5-meTHF est libérée dans la circulation et transportée jusqu'aux cellules périphériques sous forme libre (1/3) ou liée à des protéines (2/3). L'albumine et l' α_2 -macroglobuline sont des protéines de faible affinité qui délivrent les folates dans certains tissus préférentiels comme le placenta et les tissus fœtaux. Les « soluble-folate binding proteins » (S-FBP) de haute affinité, présentes en faible quantité, permettraient le transport des folates vers le foie. Dans la majorité des cellules périphériques, des folates receptors (FR) permettent l'internalisation du 5-meTHF. L'acide folique peut pénétrer plus difficilement, avec un taux 6 fois plus faible dans les cellules, et doit subir les deux réactions successives de la DHFR pour donner une molécule de THF. La moitié des apports seront attribués aux mitochondries où ils exerceront une fonction de transfert de radicaux monocarbonés différente de la fraction cytosolique. La fraction du Me-THF non utilisée peut être catabolisée en THF puis en PG par la polyglutamyl synthase (FGPS) (principalement en pentaglutamates) (**Figure 30**).

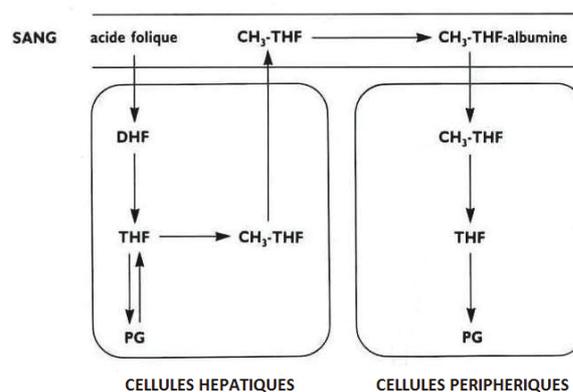


Figure 30 : Synthèse de la distribution hépatique et périphérique des folates et de leurs modifications.

Dans un premier temps l'acide folique absorbé au niveau intestinal est transporté dans le sang vers les cellules hépatiques. Le métabolisme en DHF puis THF peut aboutir à la formation de PG pour stocker une partie des apports ou à la formation de CH₃-THF qui correspond à la forme biologiquement active et à la forme principale de transport. La forme CH₃-THF est libérée dans le sang, où elle est généralement liée à des protéines telles que l'albumine, et est délivrée aux cellules périphériques où le CH₃-THF sera utilisé au niveau du cytoplasme ou de la mitochondrie. La fraction non catabolisée peut également y être transformée en THF puis PG pour être stockée.

CH₃-THF: 5-méthyl tétrahydrofolate, DHF: dihydrofolate, PG: polyglutamates, THF: tétrahydrofolate

La quantité de folates stockée reste toutefois faible (5 à 15mg, soit les besoins pour 4 mois) et ne permet pas de subvenir aux besoins accrus dans certaines conditions, comme au cours de la grossesse. La concentration en folates plasmatiques est de 5 à 15µg/L, bien en deçà des valeurs érythrocytaires comprises entre 150 et 450µg/L de globules rouges. Dans le liquide céphalorachidien le taux est compris entre 45 et 60µg/L.

Quotidiennement, une faible fraction de folates est éliminée par voie urinaire : 1 à 10µg sont excrétés sous forme de métabolites (ptéridine et acide benzoylglutamique). La majeure partie des folates sont réabsorbés au niveau des tubules rénaux. Quant aux fécès, ils contiennent 20% de folates alimentaires non absorbés, la fraction de folates produite par la flore intestinale et la fraction provenant de l'excrétion biliaire.

d. Carences en vitamines B9

Les causes d'une carence en folates peuvent être variées. Une malabsorption intestinale peut avoir lieu dans le cadre du vieillissement, de résections intestinales ou de maladies inflammatoires comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les interactions médicamenteuses peuvent induire un défaut d'absorption ou de métabolisme des folates ; c'est le cas notamment de certains traitements de chimiothérapie (méthotrexate, 5-fluoro-uracil), de traitements pour des pathologies comme l'épilepsie (anticonvulsivants), de traitements hormonaux (pilule contraceptive), ou dans certaines pathologies comme l'alcoolisme. Certaines périodes de la vie nécessitent que les apports en vitamines B9 soient augmentés : lors de pathologies ou d'évènements impliquant une stimulation de l'érythropoïèse (leucémie, hémorragie ou hémolyse, ...), chez les personnes âgées (malabsorption digestive), ou chez la femme enceinte ou allaitante sujette à une augmentation du métabolisme (2 à 3mg/jours nécessaires au cours du développement) (**Tableau 2**).

Au final, 10% à 20% de la population mondiale serait sujette à une carence. A ce jour, l'OMS classe les carences en vitamines B en priorité II.

Type	Cause	Exemple
Malabsorption	Inflammation	Maladie inflammatoire chronique (MICI)
	Acte chirurgical	Résection intestinale
Métabolique	Interaction médicamenteuse	Chimiothérapie, pilule contraceptive
	Addiction	Alcoolisme
	Polymorphisme génétique	DHFR
Déficit des apports	Régimes	Trouble du comportement alimentaire
	Destruction	Cuisson excessive
Augmentation des pertes	Traumatismes	Hémorragies
	Pathologies	Leucémie
Augmentation des besoins	Grossesse	Développement foetal et lactation
	Vieillesse	Malabsorption, polymédication

Tableau 2 : Synthèse non exhaustive des causes de déficience en vitamine B9

2. La vitamine B12, ou cobalamine

a. Structure, sources et besoins

La vitamine B12 (cobalamine, Cbl) est une molécule constituée d'un noyau corrine tétrapyrrolique à cobalt lié à un groupement benzimidazole-ribose-phosphate (**Figure 31**). Les différents dérivés de la cobalamine sont définis par le groupement lié au cobalt. Les deux formes circulantes, cyanocobalamine et hydroxycobalamine, sont caractérisées respectivement par un groupement cyanure et hydroxyle. La forme glutathionylcobalamine constitue une forme intermédiaire tandis que les formes méthylcobalamine et adenosylcobalamine représentent les formes coenzymes actives respectivement caractérisées par un groupement méthyle et un groupement 5'desoxyadenosyle.

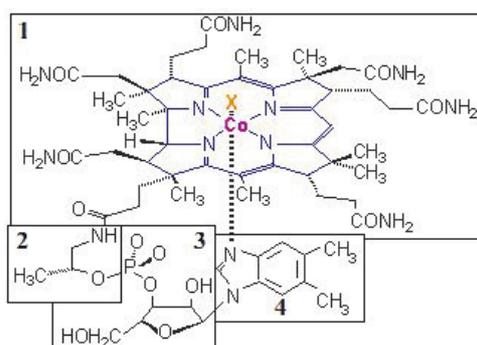


Figure 31 : Structure de la cobalamine

La cobalamine est une structure constituée d'un noyau corrine tétrapyrole à cobalt (1) associé à un groupement benzimidazole-ribose-phosphate composé d'un groupement 1-amino-propanol-2 (2), d'un ribose-3'-phosphate (3) et d'un 5,6-diméthylbenzimidazole (4).

La cobalamine est uniquement synthétisée par les micro-organismes, dont les bactéries de la flore intestinale, notamment chez les ruminants. Les faibles quantités nécessaires par jour (2µg/jour) ne peuvent être obtenues qu'à partir d'aliments d'origine animale : abats, poissons, œufs et produits laitiers (Stabler et Allen, 2004, O'Leary et Samman, 2010) (Tableau 3).

Individus	B12 - ANC (µg/jour)
Nourrisson	0,5
Enfant (1 à 12 ans)	0.8 - 1.9
Adolescent (13 à 19 ans)	2.4
Homme adulte	2.4
Femme adulte	2.4
Femme enceinte	2.6
Femme allaitante	2.8
Personne âgée (> 75 ans)	3

Tableau 3 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamineB12 (AFSSA 2001)

b. Absorption et métabolisme de la cobalamine

L'acidité gastrique et les enzymes digestives (gastrine et pepsine) permettent de libérer les molécules de cobalamine des protéines auxquelles elles sont couplées (Schade et Schilling, 1967). Une fois libres, elles sont directement prises en charge par des glycoprotéines de transport, les haptocorrines (transcobalamines I et III) et le facteur intrinsèque (FI), pour être transportées jusqu'au duodénum (Fedosov, 2012, Nielsen et al., 2012, Nicolas et Guéant 1995). A ce niveau du transit, le pH acide est neutralisé, ce qui favorise la libération de la vitamine B12 en diminuant l'affinité de l'haptocorrine (Allen et al., 1978), qui s'accompagne d'une dégradation partielle de l'haptocorrine par les protéases pancréatiques (Russell-Jones et Alpers, 1999, Marcoullis et al., 1986). La cobalamine est alors couplée au FI, résistant à la protéolyse (Nicolas et Guéant 1994, Guéant et al., 1990). C'est au niveau de l'iléon distal que le complexe Cbl-FI est absorbé par les cellules entérocytaires par fixation à la cubiline qui en est un récepteur spécifique (Guéant et al., 1988, Seetharam et al., 1988) dont amnionless facilite l'internalisation (Pedersen et al., 2010). Les deux molécules sont alors dissociées et le FI est dégradé pour être ensuite recyclé (Seetharam et al., 1982) (**Figure 32**).

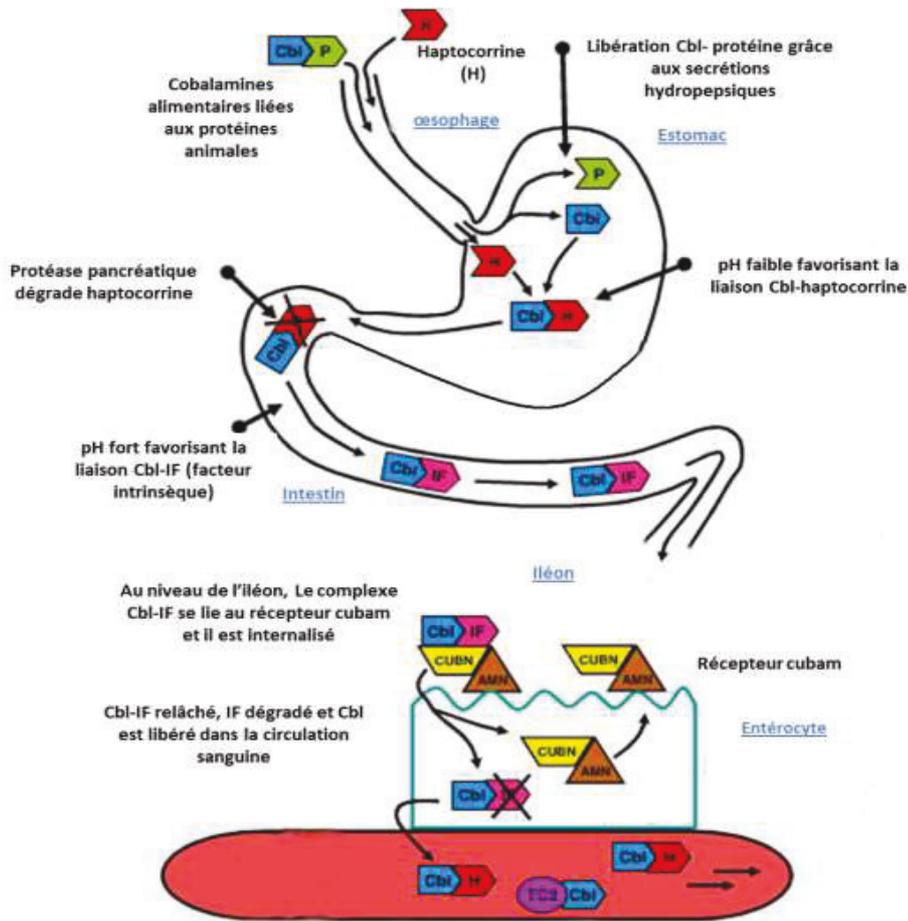


Figure 32 : Absorption intestinale et distribution de la cobalamine (modifié d'après Tanner et al, 2012)

Les enzymes digestives clivent la liaison cobalamine-protéine (Cbl-P). Dans un premier temps, la cobalamine est couplée à l'haptocorrine (H) jusqu'au jéjunum où la liaison est rompue. Elle est ensuite couplée au facteur intrinsèque (IF) jusqu'à son absorption au niveau des cellules iléales distales par le complexe cubam (association du récepteur cubiline à amnionless : CUBN-AMN). Dans les entérocytes, le complexe cubam est dissocié et recyclé tandis que l'IF est dégradé. La cobalamine sera transportée vers les cellules périphériques par le sang sous forme liée à l'haptocorrine ou à la transcobalamine II (TCII).

c. Métabolisme de la cobalamine

La cobalamine peut alors être métabolisée dans le cytosol en méthylcobalamine (Me-Cbl) (Kapadia, 1995) ou dans les mitochondries en adénosylcobalamine (Ado-Cbl) (Yamanishi et al., 2005, Kolhouse et Allen, 1977). Elle peut également être distribuée aux cellules périphériques ; elle est alors prise en charge par la transcobalamine-II (TC-II, dénommée apo-TCII sous forme libre ou holo-TCII une fois couplée). Elle passe dans la circulation sanguine et est délivrée aux différents organes via le récepteur à la transcobalamine CD320 (Jiang et al, 2013, Quadros et Sequeira, 2013, Nielsen et al., 2012, Quadros et al., 2009, Cho et al, 2008) dans la plupart des tissus ou via le récepteur mégaline dans le rein. Elle sera dissociée de la TC-II sous la forme hydroxocobalamine et passera du lysosome au cytoplasme par un processus impliquant les protéines limb region 1 (LMBR1) domain containing 1 (LMBD1) et ATP-binding cassette sub-family D member 4 (ABCD4) (Coelho et al., 2012, Rutsch et al., 2009) afin d'être métabolisée en méthyl- ou adénosylcobalamine *in situ* ou stockée (cas des cellules hépatiques) tandis que la TC-II sera dégradée dans le lysosome (Lildballe et al., 2012). La B12 non utilisée est à nouveau liée à la TC-II et mise en circulation sanguine ou dans les fluides extracellulaires par la multidrug resistance protein 1 (MRP1) ou ATP-binding cassette, sub-family C (ABCC1) (Beedholm-Ebsen et al., 2010) (**Figure 33**).

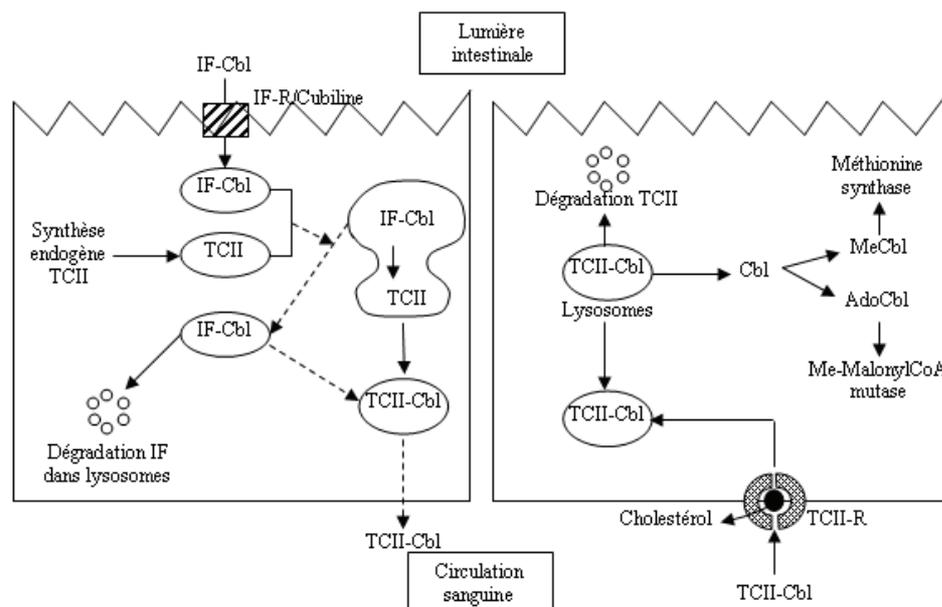


Figure 33 : Synthèse de la distribution hépatique et périphérique de la cobalamine et de son utilisation (Adapté de Seetharam et al., 1999).

Dans les cellules intestinales la Cbl est libérée de l'IF. Elle peut alors être libérée dans la circulation sanguine en association à la TCII. Dans les cellules périphériques, l'absorption de la Cbl-TCII et la dégradation de TCII permet la libération de la Cbl. Elle sera utilisée par la méthionine synthase sous forme MeCbl ou par la Me-MalonylCoA mutase sous forme AdoCbl.

Cbl : cobalamine, *IF* : facteur intrinsèque, *TCII* : transcobalamine II, *MeCbl* : méthylcobalamine, *AdoCbl* : adénosylcobalamine, *Me-MalonylCoA mutase* : méthylmalonylCoA mutase

Le stockage hépatique de la cobalamine représente 2 à 3mg, c'est-à-dire environ 50% du stock, ce qui correspond aux besoins de 2 à 5 ans. Le taux moyen de cobalamine plasmatique est de 200 à 1000pg/mL sous forme d'hydroxycobalamine couplée à la TC-II (Seetharam et Li, 2000, Seetharam et al., 1999, Nicolas et Guéant, 1994).

Les pertes en cobalamines sont très faibles puisque la présence d'un cycle entéro-hépatique permet la réabsorption de l'excès de cobalamine excrété dans la bile. L'excrétion quotidienne est de 2 à μg . L'excrétion urinaire est minime puisqu'elle représente moins de $0.25\mu\text{g}/\text{jour}$. La fraction principale est concentrée dans les fèces, qui contiennent une fraction biliaire et la production de la flore intestinale.

d. Carences en vitamines B12

Les apports en vitamine B12 proviennent entièrement de l'alimentation et les besoins en cobalamine augmentent lors des périodes de forte activité métabolique (grossesse et allaitement), de stimulation de l'érythropoïèse, ainsi qu'avec le vieillissement. Le manque d'apport peut être à l'origine d'une carence, notamment chez les végétariens et les végétaliens ainsi que dans de nombreuses situations pathologiques qui influencent le taux de cobalamine absorbable ou les capacités d'absorption (**Tableau 4**).

Type	Cause	Exemple
Malabsorption	Inflammation ¹	Maladie inflammatoire chronique (MICI)
	Acte chirurgical ²	Gastrectomies, résections intestinales distales
	Infection ³	Bactérie, parasite
	Polymorphisme génétique ⁴	FI, TCII, Cubiline, Amnionless
Métabolique	Addiction ⁵	Alcoolisme
Déficit des apports	Régimes	Végétariens, végétaliens
Augmentation des pertes	Traumatismes	Hémorragies
	Pathologies	Leucémie
Augmentation des besoins	Grossesse	Développement fœtal et lactation
	Vieillesse ⁶	Malabsorption : hypochlorhydrie, achlorhydrie

Tableau 4 : Synthèse non exhaustive des causes de déficience en vitamine B12

¹ Akbulut et al., 2010, Headstrom et al., 2008, ² Carmel, 2000, ³ Carmel et al., 2001, Stabler et Allen, 2004, ⁴ Gräsbeck et al., 1960, Fyfe et al., 2013, Tanner et al., 2004, Cylwik et Chrostek, 2011, ⁵ Cylwik et Chrostek, 2011, ⁶ Andrès et al., 2004.

On peut distinguer plusieurs degrés de gravité de la carence en vitamine B12. Les deux premiers stades sont relativement bénins : le stade I est associé à une faible teneur en holoTC-II (<60pg/mL), le stade II est une association d'un taux faible d'holoTC-II (<40pg/mL) et

d'une carence faible en B12 (<300pg/mL). Les deux stades suivants ont un caractère pathologique : le stade III correspond à des taux faibles de d'holoTC-II et de B12(<40pg/mL et <200 respectivement) et s'accompagne d'hyperhomocystéinémie et hyperhomocystéinurie, le stade IV présente les même paramètres que le stade III mais associe une anémie mégaloblastique et macrocytaire ainsi qu'un phénomène de démyélinisation du système nerveux central et périphérique contribuant à la survenue de neuropathies et d'une dégénérescence des fibres nerveuses (**Tableau 5**).

Stade	holoTC-II (pg/mL)	Cobalamine (pg/mL)	Symptomatologie
I	< 60	–	–
II	< 40	< 300	–
III	< 40	< 200	Hyperhomocystéinémie Hyperhomocystéinurie
IV	< 40	< 200	Hyperhomocystéinémie Hyperhomocystéinurie Anémie mégaloblastique et macrocytaire Démyélinisation du SNC et SNP : Neuropathologies Dégénérescences de fibres nerveuses

Tableau 5 : Table des profils de carence en vitamine B12

3. La vitamine B6, ou pyridoxine

a. Structure, sources et besoins

Le terme pyridoxine regroupe l'ensemble des formes de la vitamine B6 : la pyridoxine (PN), le pyridoxal (PL), la pyridoxamine (PM) et leurs formes phosphorylées (-5'-phosphate, PNP/PLP/PMP) (**Figure 34**). La forme active impliquée dans le métabolisme est la PLP.

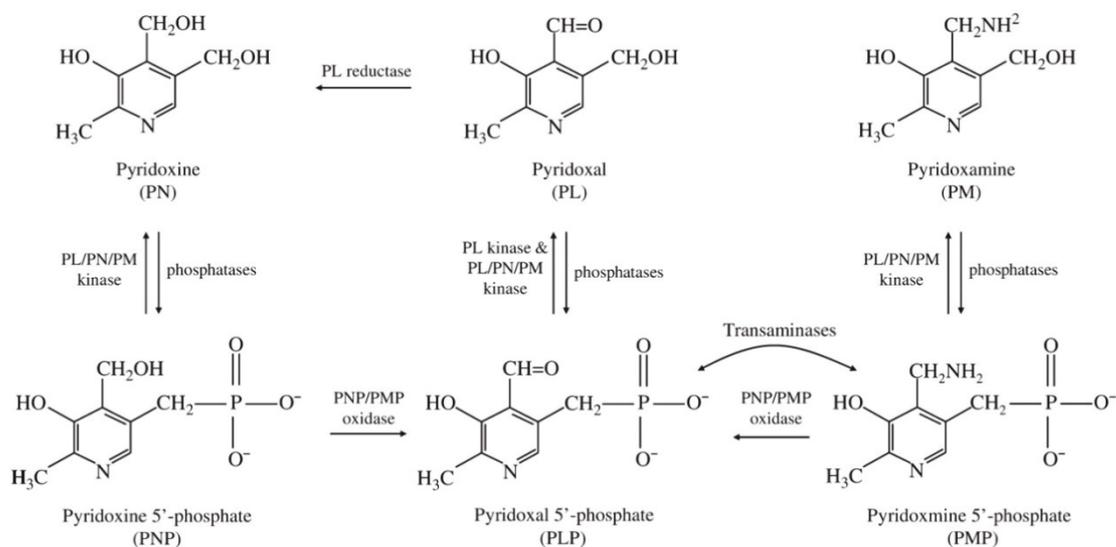


Figure 34 : Structures des formes de vitamine B6 et de leurs dérivés phosphorylés (adapté de Gonzalez et al., 2007)

La vitamine B6 existe sous forme pyridoxine, pyridoxal ou pyridoxamine ainsi que sous leurs formes dérivées phosphorylées (-5'-phosphate). Les formes phosphates sont les dérivés biologiquement actifs.

La vitamine B6 participe au catabolisme de l'homocystéine qui représente l'un des métabolites principal dérivé du cycle des folates et de la méthionine.

On la retrouve principalement dans les aliments d'origine animale (viandes blanches, foie, poisson) sous forme PLP et PMP ainsi que dans certains féculents (pois chiche) ou fruits (banane) sous forme PNP. Les besoins quotidiens sont de 1.3mg et sont largement couverts par les apports alimentaires normaux. De la même manière que les vitamines B9 et B12, les besoins sont augmentés avec les périodes à forte activité métabolique comme la grossesse ou lors du vieillissement (**Tableau 6**).

Individus	B6 - ANC (mg/jour)
Nourrisson	0.3
Enfant (1 à 12 ans)	0.6 - 1.3
Adolescent (13 à 19 ans)	1.6 – 1.8
Homme adulte	1.8
Femme adulte	1.5
Femme enceinte	2
Femme allaitante	2
Personne âgée (> 75 ans)	2.2

Tableau 6 : Apports nutritionnels conseillés (ANC) en vitamine B6 (AFSSA 2001)

b. Absorption et métabolisme de la pyridoxine

Dans l'intestin grêle le PLP et le PMP sont pris en charge par une phosphatase. Leur hydrolyse en PL et PM permet leur absorption par les entérocytes selon un mécanisme de diffusion passive non saturable (Guilland et al., 1992). Les molécules de PL sont métabolisées dans le foie par la pyridoxal kinase de sorte à être libérées dans le sang sous la forme active PLP. De rares tissus (foie, cerveau, érythrocytes) ont la capacité de synthétiser le PLP à partir de PN.

c. Carences en vitamines B6

La carence en vitamine B6 est principalement restreinte à quelques cas particuliers, l'alimentation permettant amplement de combler les besoins en pyridoxine. Il convient néanmoins de rester vigilant dans le cadre d'une grossesse ou lors de la prise de certains médicaments comme la pilule contraceptive, les corticoïdes ou l'isoniazide (anti-tuberculeux) ainsi que dans les états pathologiques comme l'alcoolisme chronique.

IV. Cycle l'homocystéine

Le métabolisme des monocarbone est basé sur l'action conjointe du cycle des folates et celui de l'homocystéine. Leur activité est dépendante de la présence de folates (vitamine B9) et de cobalamine (vitamine B12) qui agissent en synergie, puisque le transfert de méthyle en provenance du folate nécessite la présence de la vitamine B12 (Oltean et Banerjee, 2003).

1. Cycle de l'homocystéine (ou cycle de la méthionine)

Le méthyle cédé par le cycle des folates est incorporé à une molécule d'homocystéine (Hcy), par la méthionine synthase (MS ou MTR) en présence de vitamine B12, et forme une molécule de méthionine (Met) (Scott et al., 1998). La Met est transformée en S-adenosyl-méthionine (SAM) par la méthionine-adenosyl-transférase (MAT) (Mudd et cantoni, 1958). Lors de l'action des méthyltransférases sur la SAM, le groupement méthyle est ajouté à différents substrats (ADN, protéines, lipides...) (Bertolo et McBreaity, 2013, Blom et al., 2006, Wilson et al., 2012) ce qui définit la SAM comme donneur universel de groupements méthyles. La libération du méthyle aboutit à la formation d'une S-adenosyl-homocystéine (SAH) (Hoffman et al., 1980) qui est transformée par la S-adenosyl-homocysteine hydrolase (SHH ou SAHH) (Halsted et al., 2002) en Hcy, au cours de la seule réaction réversible du métabolisme (**Figure 35**).

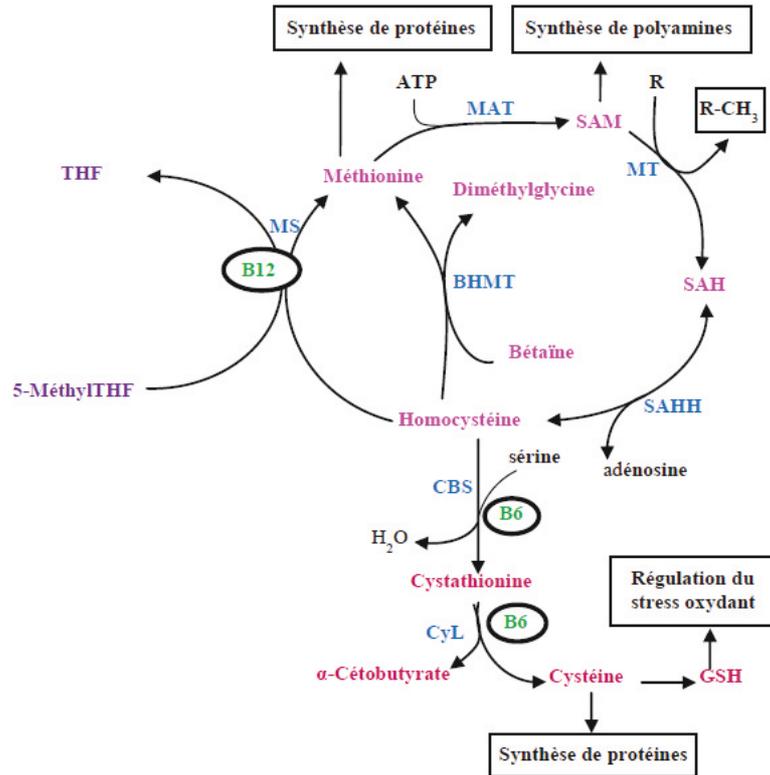


Figure 35 : Cycle de la méthionine (d'après Tchantchou, 2006)

Le cycle de la méthionine nécessite un transfert de groupement méthyle entre le 5-méthylTHF du cycle des folates et l'homocystéine du cycle de la méthionine. La réaction fait intervenir la MS et son cofacteur la vitamine B12. La méthionine est convertie en donneur universel de groupement méthyle SAM par la MAT. La SAM cède son groupement à différents substrats via des MT. La SAH ainsi formée est hydrolysée en homocystéine par la SAHH. L'homocystéine peut également être convertie en méthionine par la BHMT indépendamment de la B12 ou en cystathionine par la CBS et son cofacteur la vitamine B6.

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

2. L'homocystéine

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré, non incorporé dans les protéines, dont l'accumulation est toxique pour la cellule. C'est un homologue de la cystéine qui diffère par la présence d'un méthylène. Découverte en 1932 par Butz et Du Vigneaud (Selhub, 1999) elle est suspectée d'être impliquée dans certaines pathologies dès les années 1960 lorsque Carson observe un lien entre hyperhomocystéinurie et déficit mental (Carson et al, 1962).

L'homocystéine est un thiol à groupement sulfhydrile libre échangeable avec d'autres groupements thiols et peut être déclinée sous forme de nombreux dérivés, principalement par création d'un pont disulfure entre une molécule homocystéine et une autre molécule. L'homocystine dérive de la création d'un pont disulfure entre deux molécules d'homocystéine ; les bisulfures mixtes (Homocystéine-protéine ou Homocystéine-cystéine) dérivent de la liaison entre une molécule d'homocystéine et une protéine ou une cystéine (Jacobsen, 1998, Refsum et al., 1998). La fixation aux protéines se fait en compétition avec la cystéine. L'homocystéine peut aussi être métabolisée, principalement en sulfates (après transformation en cystathionine puis cystéine), en acide homocystéique ou acide homocystéine sulfinique par oxydation. Plus rarement, l'homocystéine peut être transaminée en acide α -céto- γ -méthylthiobutyrique (**Figure 36**).

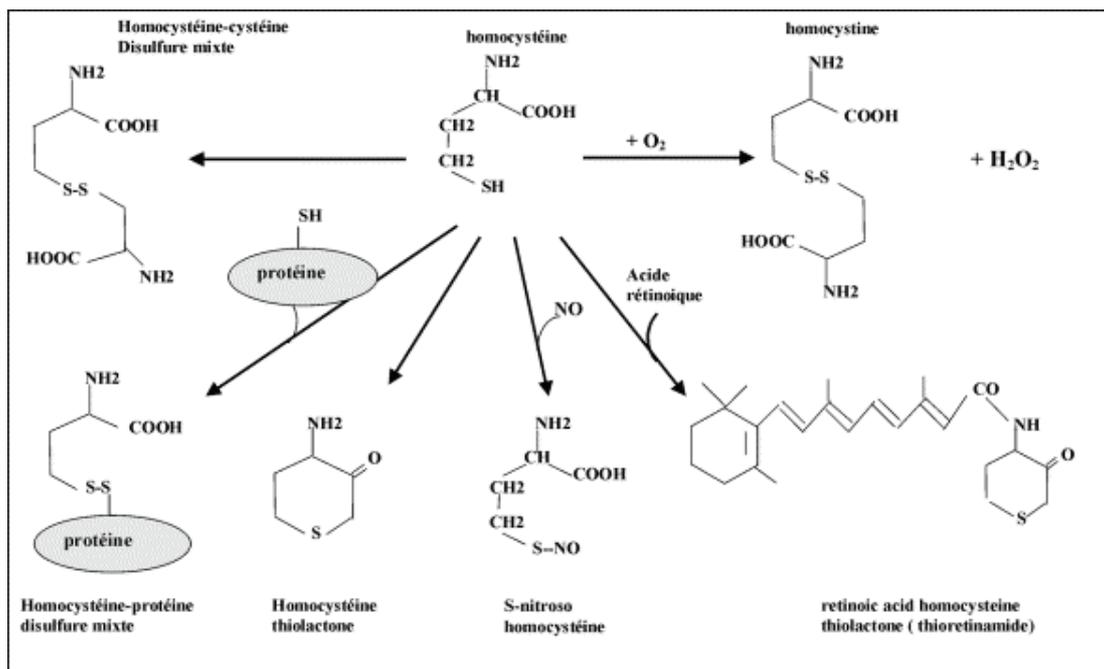


Figure 36 : Structures des dérivés de l'homocystéine (d'après Guillaud et al., 2003)

L'homocystéine libre est une fraction minime dans l'organisme. Elle est principalement présente sous forme de disulfures mixtes (homocystine ou homocystéine-cystéine) ou liée à des protéines. Elle est également présente de manière mineure sous forme d'homocystéine thiolactone cyclique, pouvant être associée à d'autres molécules. D'autres formes existent telles que les formes nitrosylées.

La dénomination homocystéine représente généralement l'homocystéine totale, soit l'ensemble des formes citées précédemment. Dans le plasma, la fraction libre d'homocystéine thiol est minime puisqu'elle ne représente que 1 à 2% de l'homocystéine totale (McCully et Wilson 1975, Mudd et al 2000). Les 98 à 99% restant se présentent sous forme disulfures, disulfures mixtes libres (homocystéine-homocystéine, homocystéine-cystéine) ou majoritairement (80 à 90%) sous forme de disulfures mixtes liées à des protéines (Mudd et al., 2000) par création de ponts disulfures (S-homocystéinylation) (Perna et al., 2006) ou de liaisons amide (N-homocystéinylation) (Jakubowski et al., 2006). Cette fraction liée aux protéines implique principalement l'hémoglobine (75 %) et l'albumine (22%), mais également un certain nombre d'autres protéines (Lim et al., 2003 ; Majors et al., 2002). La S-thiolation est associée à des dommages oxydatifs (Di Simplicio et al., 2003 ; Giustarini et al., 2012), qui peuvent être liés à l'altération de la fonction des protéines (Hajjar et al., 1998 ; Majors et al., 2002 ; Undas et al., 2001). Sa toxicité est tout de même moins marquée que

celle de l'homocystéine ou des protéines N-homocystéinylées (Rodriguez-Esparragon et al., 2012), probablement en raison du fait que la réaction est réversible (Perna et al., 2006). A l'inverse, la réaction de N-homocystéinylation est à caractère irréversible. Elle conduit à des modifications structurales pouvant avoir de nombreuses conséquences : réduction de leur activité, agrégation (Khazaei et al., 2012 ; Khodadadi et al., 2012 ; Stroylova et al., 2011), sensibilité aux dommages oxydatifs (Sibrian-Vazquez et al., 2010), toxicité (Paoli et al., 2010), immunogénicité (Jakubowski et al., 2005) ou dégradation prématurée (Ferretti et al., 2010 ; Sibrian-Vazquez et al., 2010). L'homocystéine peut de manière mineure (0.3%) être présente sous forme de thioester cyclique, l'homocystéine thiolactone (Jakubowski 2004, Jakubowski 1997). Cette forme peut devenir prédominante (10 à 20 %) lors d'altération du métabolisme de la méthionine et semble constituer une forme encore plus toxique que l'homocystéine. En effet, l'homocystéine thiolactone dispose d'une capacité de réactivité pour former les liaisons amides, mise en jeu dans les réactions de N-homocystéinylation des protéines (Jakubowski et al., 2000 ; Jakubowski, 2000).

Le taux plasmatique en homocystéine totale est généralement compris entre 5 et 15 μ mol/L (Roblin et al., 2007a, Mudd 2000). Dès lors que ces taux sont dépassés, on parle d'hyperhomocystéinémie, qui peut-être plus ou moins sévère. On parle d'hyperhomocystéinémie modérée jusque 25 μ mol/L, intermédiaire de 25 à 50 μ mol/L et sévère au-delà de 50 μ mol/L. En réalité, les dosages plasmatiques ne prennent pas en compte les formes N-homocystéinylées et thiolactones car la technique repose sur le dosage de l'homocystéine libre après rupture des ponts disulfures (**Tableau 7**).

Catégorie	Hcy plasmatique (μ mol/L)
Normal	5 - 15
Souhaitable	10
Hyperhomocystéinémie modérée	16 - 25
Hyperhomocystéinémie intermédiaire	26 - 50
Hyperhomocystéinémie sévère	> 50

Tableau 7 : Table des profils physiologique et pathologiques de l'homocystéinémie

3. Voies d'élimination de l'homocystéine

Le métabolisme des monocarbones permet la régulation de la teneur en homocystéine puisqu'elle peut être le substrat de différentes enzymes favorisant son catabolisme, ce qui assure le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Sa régulation fait intervenir deux voies ubiquitaires, dépendantes de la méthionine-synthase (MTR) et de la cystathionine- β -synthase (CBS) ainsi qu'une voie alternative qui permet la prise en charge de l'homocystéine indépendamment des folates et de la cobalamine. Cette voie qui fait intervenir la BHMT (bétaine homocystéine méthyltransférase) est absente dans le cerveau (**Figure 37**).

a. La voie de reméthylation (MTR-dépendante)

La voie de reméthylation correspond à la réaction de couplage du cycle des folates et de l'homocystéine. A ce niveau, la B9 et la B12 sont indispensables. La présence du 5meTHF permet le transfert d'un groupement méthyle à la MTR, qui avec la cobalamine assure la reméthylation de l'homocystéine en méthionine (Tchantchou 2006) et la reformation de Cbl-MTR de sorte à accepter un nouveau groupement méthyle (Leclerc et al., 1998, Oltean et Banerjee, 2003). L'étape se déroule selon trois réactions distinctes de transfert de méthyle assurant trois fonctions physiologiques indispensables : la régénération du co-substrat THF, la synthèse de méthionine et l'élimination de l'homocystéine. Elles se déroulent dans des domaines de liaisons distincts de la MTR qui assurent quatre fonctions particulières : le domaine de liaison et d'activation du 5meTHF, le domaine C-terminal de liaison à la SAM indispensable à la réduction de la cobalamine, le domaine N-terminal de liaison à l'homocystéine et le domaine liant la cobalamine (Banerjee et al., 1989, Ludwig et Matthews, 1997). Cette voie représente la continuité du cycle de transfert de groupement méthyle. L'hydrolyse constante de la SAH et la reméthylation de l'homocystéine assure le potentiel de méthylation cellulaire (James et al., 2002), par création de SAM et la régulation de l'index de méthylation SAM/SAH (**Figure 37**).

Chez les mammifères, cette voie est ubiquitaire mais son expression n'est pas équivalente dans tous les tissus. La MTR est fortement exprimée dans des organes tels que le cœur ou le pancréas, moyennement exprimée dans le cerveau ou le placenta, et faiblement

exprimée dans des organes comme le foie ou les poumons (Chen et al., 1997, Matthews et al., 2001).

b. La voie de transsulfuration (CBS-dépendante)

La voie de transsulfuration est la seule voie de recyclage de l'homocystéine ayant un caractère irréversible. La cystathionine- β -synthase combine une molécule d'homocystéine avec une molécule de sérine pour former une molécule de cystathionine. Elle nécessite la présence de son cofacteur, la vitamine B6, sous sa forme active pyrodoxal 5'-phosphate (PLP). La cystathionine est prise en charge par la γ -cystathionase (ou Cystathionine γ -lyase), elle aussi dépendante de la vitamine B6, qui l'hydrolyse en cystéine et α -cétobutyrate. La cystéine sera notamment le précurseur du glutathion qui contribue au maintien du statut redox cellulaire par son action anti-oxydante (**Figure 37**).

Cette voie est principalement exprimée dans les tissus nécessitant une forte concentration en glutathion comme le foie, le cerveau (Dringen et Hamprecht, 1999) mais aussi les reins, les ovaires et le muscle ainsi que pendant l'embryogenèse précoce dans le système nerveux et le cœur (Quere et al., 1999). Elle est principalement mise en jeu lorsque la reméthylation de l'homocystéine n'est plus assurée et que l'excrétion urinaire est insuffisante pour empêcher son accumulation plasmatique ; notamment lors de carence en vitamines B9 et B12.

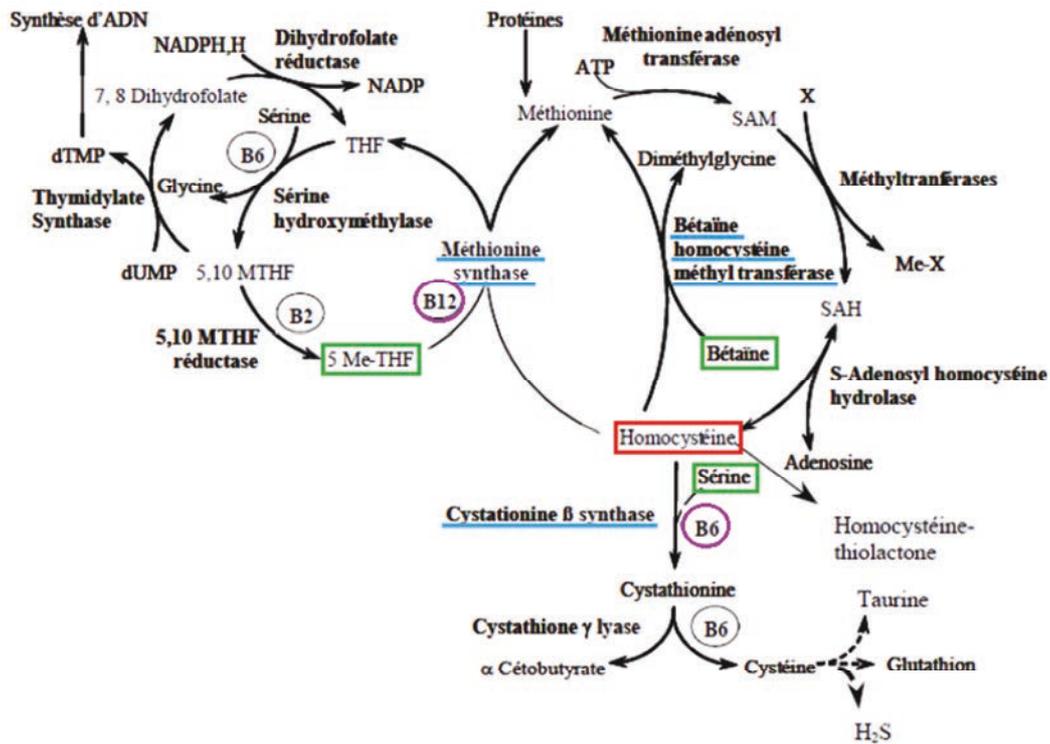


Figure 37 : Cycle des monocarbone et régulation de l'homocystéinémie

Le cycle des monocarbone est indispensable aux réactions de méthylation mais il constitue également un moyen d'éliminer l'homocystéine dont l'accumulation est toxique pour les cellules. Le catabolisme de l'homocystéine fait intervenir 3 voies enzymatiques : celles de la méthionine synthase et de la bétaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT) qui métabolisent l'homocystéine en méthionine et celle de la cystathionine-β-synthase qui la transforme en cystathionine. La voie de la BHMT n'est pas présente dans le cerveau.

DHF : Dihydrofolate, dTMP : désoxythymidine monophosphate, dUMP : désoxyuracile monophosphate, FAD : Flavine-Adénosine dinucléotide, Me-THF : Méthyl-THF, MTHF : Méthylène-THF, NADP : Nicotinamide-Adénine-dinucléotide phosphate, SAH : S-Adénosylhomocystéine, SAM : S-Adénosylméthionine, THF : Tétrahydrofolate

4. Régulation des voies d'élimination de l'homocystéine

Le métabolisme des monocarbone est directement dépendant de l'apport nutritionnel en donneurs de groupements méthyles. Ils sont les éléments clés du potentiel de synthèse de méthionine, qui est corrélé au potentiel de méthylation cellulaire, ainsi qu'au potentiel d'élimination de l'homocystéine. Lorsque la synthèse de méthionine est suffisante, l'homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant qu'elle ne soit catabolisée par la voie de transsulfuration. Si la synthèse de méthionine est insuffisante l'équilibre penche en faveur des voies de reméthylation afin d'assurer un taux de méthionine adéquat. En condition d'apport trop important en méthionine, l'équilibre favorise la voie de catabolisme de l'homocystéine CBS-dépendante afin d'éviter une surcharge d'homocystéine. Dans ce contexte, la cellule possède la capacité de réguler les voies principalement impliquées dans la régulation du taux d'homocystéine (**Figure 38**).

D'une part, la SAM présente la capacité d'inhiber la MTHFR et d'activer la CBS (Mato et al., 1997, Finkelstein, 2007), favorisant la voie de dégradation en limitant la synthèse de 5meTHF. La SAH ne peut pas modifier l'activité MTHFR mais peut moduler l'effet de la SAM par compétition sur son site de liaison (Kutzbach et Stokstad 1971). Ainsi le ratio SAM/SAH régule l'activité MTHFR. La SAM peut cependant lier les DNMTs et inhiber la réaction catalytique impliquée dans les réactions de transméthylation (Deguchi et Barchas, 1971). D'autre part, la synthèse de SAM peut être régulée selon les quantités de méthionine intracellulaire, par l'existence de 3 isoformes MAT ayant une affinité différente pour la SAM. MAT1 et 3 de haute affinité, entrent en jeu dans les conditions physiologiques et ne sont exprimées que dans le foie adulte, tandis que MAT2 de plus faible affinité n'intervient qu'en cas d'apports élevés en méthionine ; elle est présente dans pratiquement tous les autres tissus (Chamberlin et al., 2000, Mato et al., 1997). L'utilisation de la SAM est définie par une réaction qui fait intervenir la glycine-N-méthyltransférase (GNMT), abondamment présente dans le foie. Cette enzyme transfère le groupement méthyle de la SAM à une glycine de sorte à former une méthylglycine. La GNMT a la particularité d'être inhibée par le 5meTHF, ce qui implique les folates dans la régulation du taux intracellulaire de SAM. Dans le cadre de forts apports en méthionine, la MAT2 est favorisée de sorte à métaboliser rapidement la méthionine en SAM, ce qui induit une inhibition de la MTHFR et une inhibition de la synthèse de 5meTHF qui favorise l'activation de la GNMT et de la CBS. Dans le cas

contraire, la faible teneur en méthionine ne permet pas d'avoir un taux suffisant de SAM pour inhiber MTHFR, la 5meTHF augmente et la GNMT est inhibée. La diminution du taux de 5meTHF est à l'origine d'une diminution de l'activité enzymatique MTR (Finkelstein et al., 1998). La voie de reméthylation est donc favorisée dans le cadre d'un taux de SAM insuffisant pour inhiber la GNMT (**Figure 38**).

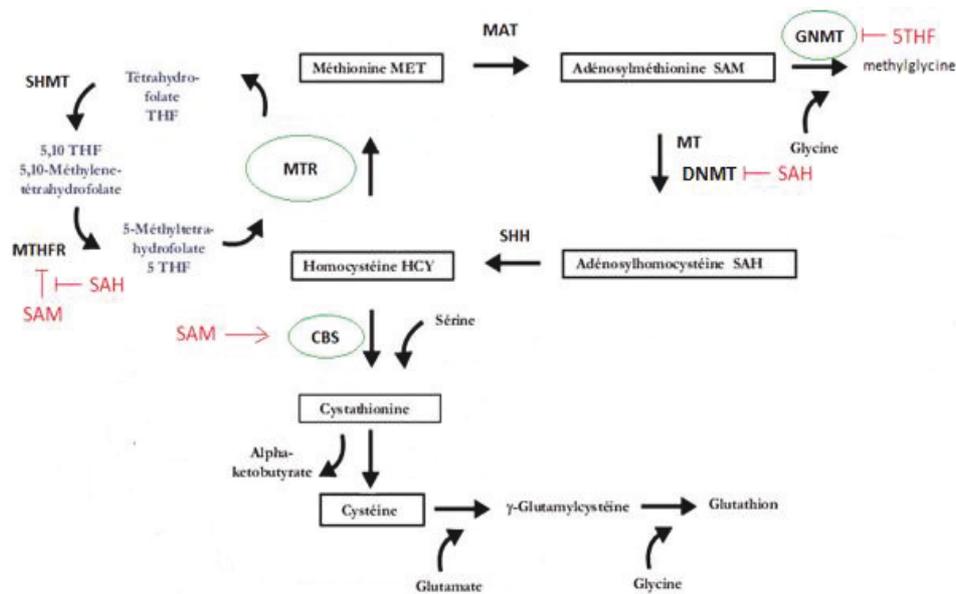


Figure 38 : Régulation de l'homocystéine

Plusieurs métabolites du cycle des monocarbone sont susceptibles de réguler les différentes réactions enzymatiques du cycle. La SAM peut inhiber l'activité MTHFR tout en favorisant l'activité CBS pour favoriser l'élimination de l'homocystéine. La SAM peut quant à elle moduler l'effet répresseur de la SAM sur MTHFR et réprimer les mécanismes de méthylation qui impliquent les DNMT. Le taux de SAM/SAH est donc un facteur important dans la régulation de l'activité MTHFR. Les isoformes MAT interviennent également dans la régulation du cycle en contrôlant la réaction qui aboutit à la formation de SAM. Le taux de SAM est également modulé par l'effet inhibiteur du 5THF sur le GNMT de sorte à favoriser la présence de SAM dans la cellule.

5THF : 5-méthyl tétrahydrofolate, CBS : cystathionine- β -synthase, DNMT : DNA methyltransferase
 GNMT : glycine-N-methyltransferase, MAT : methionineadenosyl transférase, MT : methyl transférase, MTHFR : methyl tétrahydrofolate réductase, MTR (ou MS) : méthionine synthase, SAM : S-adenosylméthionine, SAH : S-adenosylhomocystéine, SHH : S-adenosyl-homocysteine hydrolase, SHMT : serine hydroxy-methyltransferase

5. Hyperhomocystéinémie et facteurs influençant le cycle des monocarbones

Dès lors que l'une des voies de régulation est affectée ou fait défaut, une hyperhomocystéinémie peut apparaître. Différents facteurs peuvent être à l'origine ou contribuer à cette dérégulation.

a. Facteurs nutritionnels

Les apports en vitamines B9, B12 et B6 sont corrélés au taux d'homocystéine plasmatique. Deux tiers des hyperhomocystéinémies modérées sont en lien avec un déficit nutritionnel en ces vitamines, particulièrement chez les personnes âgées (Selhub et al., 1993). Avec l'âge, la vitamine B12 plasmatique est plus déterminante du taux d'homocystéine que la vitamine B9 puisque 5% de la population de plus de 65 ans serait sujette à une carence en B12 et jusqu'à 20% au-delà de 80 ans (Clarke et al., 2004).

b. Facteurs génétiques

Un certain nombre de défauts affectant l'expression de gènes codant des enzymes du cycle des monocarbones sont désormais connus.

La plupart de ces anomalies concernent le gène de la MTHFR (Selhub, 1999), constituée de 11 exons en 1p36.3 (Goyette et al., 1998) et pour lequel plus de soixante polymorphismes ont été identifiés (Martin et al. 2006).

Le plus commun est MTHFR C677T (substitution d'une cytidine par une thymidine) sur l'exon 4 (position 677) qui correspond au remplacement d'une valine par une alanine (Frosst et al., 1995). Il est responsable d'une diminution de l'activité enzymatique par altération du domaine catalytique (Weisberg et al., 1998). Ce polymorphisme pourrait induire une élévation du taux d'homocystéine selon le statut en vitamine B9 et le statut allélique. L'activité MTHFR est réduite de 30 à 40% chez les hétérozygotes et de 60 à 70% chez les homozygotes (Frosst et al., 1995, Sohn et al., 2004, Weisberg et al., 2001). Pour des taux élevés de folates il ne

semble pas y avoir de corrélation entre mutation MTHFR et homocystéinémie, par contre en cas de taux faibles en folates les homozygotes présentent une hyperhomocystéinémie (Jacques et al., 1996, Stover 2011).

Le second polymorphisme le plus répandu est MTHFR A1298C (substitution adénine-cytidine) sur l'exon 7 (position 1298) qui correspond au remplacement d'une alanine par un glutamate altérant une partie du domaine régulateur. Ce polymorphisme n'induirait pas d'élévation d'homocystéine. Ces mutations autosomales récessives ont une fréquence allélique similaire 10-13% d'homozygotes et 50% d'hétérozygotes chez les caucasiens et les asiatiques (Brattstrom et al., 1998, Gudnason et al., 1998), tandis qu'elles ont une incidence très faible dans les populations américaines et africaines (McAndrew et al., 1996, Franco et al., 1998).

Le gène MTR, localisé en 1q43 (Li et al., 1996), constitué de 33 exons (Watkins et al., 2002), peut être le plus souvent sujet à une mutation MTR A2756G (adénosine-guanosine) sur l'exon 8 (position 2756) qui correspond au remplacement d'un acide aspartique en glycine. La mutation altère une région qui semble impliquée dans la liaison d'agent réducteur de son cofacteur (Chen et al., 1997b). Dans ce cas, la corrélation entre mutation et homocystéinémie est discutée (Jacques et al., 2003, Yates et Lucock., 2003, Laraqui et al 2007, Bosco et al., 2006). Néanmoins, il semble que ce soit un facteur de risque pour le syndrome de Down (Bosco et al., 2003, Guéant et al., 2003), la schizophrénie (Kempisty et al., 2007), les fentes labio-palatine et les spina bifida (Doolin et al., 2002).

Le gène MTRR, localisé en 5p15, constitué de 15 exons, peut être le plus souvent sujet à une mutation MTRR A66G (adénosine-guanosine) sur l'exon 2 (position 66) qui correspond au remplacement d'une isoleucine par une méthionine (Wilson et al., 1999). La mutation altère le site de fixation de la flavine (Laraqui et al., 2007), qui intervient dans la réduction de la vitamine B12 en association avec le cytochrome P450, en assurant le transfert d'électrons. Cette mutation est associée à des défauts de fermeture du tube neural ainsi qu'à des maladies coronariennes (Guéant-Rodriguez et al., 2003, Guéant-Rodriguez et al., 2005).

Le gène de la CBS présente plus de 150 mutations différentes qui favoriseraient une hyperhomocystéinurie généralement associée à un retard mental, des thromboses ou des anomalies squelettiques (Mudd, 1985). Les mutations les plus fréquentes sont les polymorphismes CBS T833C (thymidine-cytidine, B6-répondant), G919A (guanosine-adénosine, B6-non répondant) et CBS C699T qui correspondent respectivement au remplacement d'une isoleucine par une thréonine et d'une glycine par une sérine (Gaustadnes et al., 2000).

Le gène TCN, codant la transcobalamine-II, présente lui aussi un certain nombre de polymorphismes. Le principal correspond à la mutation TCN C776G (cystéine-guanosine) avec remplacement d'une arginine par une proline (Namour et al., 2001) et qui participerait faiblement à la modification des taux plasmatiques d'homocystéine (Miller et al., 2002). Une homozygotie chez la mère ou l'enfant serait un facteur de risque pour la survenue de spina-bifida et le risque serait d'autant plus important si la mère et l'enfant sont tous les deux homozygotes (Christensen et al., 1999). Dans le cas d'une double mutation TC/MTHFR, l'hyperhomocystéinémie sévère qui pourrait en résulter chez un fœtus augmenterait le risque d'avortement spontané (Zetterberg, 2004).

L'effet du polymorphisme BHMT n'est pas entièrement élucidé. BHMT G742A est associé à un risque de défaut de fermeture du tube neural et à un risque cardiovasculaire. Pourtant certaines études mettent en évidence un rôle protecteur du polymorphisme sur la survie des femmes ayant été atteintes d'un cancer du sein (teng et al 2011) ainsi que sur la survenue de spina bifida (Morin et al ; 2003).

D'autres mutations interviennent, comme celles touchant le « gene proton-coupled folate transport » (Qiu et al., 2006), le gène FOLR1 du « folate receptor » (Cario et al 2009, Perez-Duenas et al 2010), la DHFR (Banka et al 2011, Cario et al 2011) ou la méthylène THF déshydrogénase (Watkins et al 2011). Dans tous les cas, elles semblent associées à différentes manifestations neurologiques, une diminution de la capacité de transport des folates, en particulier à travers la barrière hémato-encéphalique, des anémies mégaloblastiques et une augmentation du taux d'homocystéine et d'acide méthylmalonique.

c. Facteurs externes

En dehors des facteurs nutritionnels ou génétiques, un certain nombre d'autres paramètres peuvent influencer le métabolisme des monocarbones et les taux d'homocystéine.

Des facteurs physiologiques comme l'âge et le sexe semblent modifier les taux d'homocystéine, notamment en raison des effets des hormones sexuelles (Andersson et al., 1992). Certains contextes pathologiques peuvent aboutir à une augmentation des taux d'homocystéine : hypothyroïdie (Hussein et al., 1999), insuffisance rénale (Bostom et al., 1997), polyarthrite rhumatoïde ainsi que certains cancers (De Bree et al., 2002). Des traitements thérapeutiques à effet anti-folique (méthotrexate, carbamazépine et phénytoïne), anti-cobalamine (oxydes nitreux, monoxyde d'azote), anti-vitamine B6 (isoniazide, cyclosérine, procarbazine ou azaribine) (Ueland et Refsum 1989, Ueland et al., 1993) ainsi que la prise de pilule contraceptive ou d'oestrogènes (Ueland et Refsum ; 1989) peut également y contribuer.

Enfin, un certain nombre de comportement addictif (alcool, tabac, café) semblent favoriser les hausses du taux d'homocystéine plasmatique. Il est clairement établi chez les alcoolodépendants un statut hyperhomocystéinémique (Hultberg et al., 1993) associé à un statut vitaminique B6/B9/B12 caractéristique : taux d'homocystéine et B12 augmentés de 50%, PLP réduite de 75%, taux de B9 plasmatique inchangé mais taux érythrocytaire réduit (Cravo et al., 1996 ; Cravo et Camilo 2000).

Certaines interactions peuvent exister et aggraver le statut homocystéinémique d'un individu ; notamment dans le cadre d'une interaction gène-médicament (administration d'un traitement rhumatologique chez un sujet homozygote pour MTHFR C677T) (**Tableau 8**).

Hyperhomocystéinémie	Type	Causes
Modérée	Pathologique	Diabète, cancer, psoriasis, hypothyroïdie
	Mode de vie	Tabac, alcool, café, contraceptifs, carences en vitamine B
	Physiologique	Age, sexe, masse musculaire
	Génétique	Mutation hétérozygote pour la MTHFR ou la CBS
Intermédiaire	Pathologique	Autres
	Mode de vie	Carences en vitamine B
	Génétique	Mutation hétérozygote pour la MTHFR, carence génétique
Sévère	Mode de vie	Carences en vitamine B
	Génétique	Mutation homozygote pour la MTHFR ou la CBS

Tableau 8: Tableau des principaux déterminants d'une hyperhomocystéinémie (adapté de Bottiglieri, 2005, Ueland et al., 1993)

V. Pathologies et carence en donneurs de groupements méthyles

1. Notion de foetal programming

En 1986, Barker et Osmond constatent que les individus qui présentent un petit poids à la naissance sont sujets à une élévation du taux de morbidité ou de mortalité liées à des pathologies cardiovasculaires à l'âge adulte. L'hypothèse de la « programmation foetale » ou « Théorie de Barker » propose que des facteurs environnementaux, notamment les facteurs nutritionnels, au cours du développement pourraient jouer un rôle dans l'augmentation des risques de survenue de pathologies à l'âge adulte (Gabory et al., 2011, Swanson et al., 2009, Barker et al., 2004).

Les vitamines B9 et B12 participent aux régulations épigénétiques et épigénomiques, par le biais de leur rôle dans le cycle des monocarbones. Elles sont indispensables à une

certain nombre de synthèses, telles que la synthèse d'acides aminés (histidine, méthionine, sérine) ou de bases d'acides nucléiques (purines et pyrimidines). Ainsi, une carence est liée à une altération du potentiel de synthèse de l'ADN qui s'accompagne d'un risque accru de mutations ponctuelles et de cassure ADN (Forges et al., 2008, Mattson et Shea, 2003), ce qui peut affecter les phases à forte croissance cellulaire telles que celles impliquées dans le développement. De plus, par leur rôle de donneurs de groupement méthyle, une carence en vitamines B9 et B12 induit un défaut de méthylation de l'ADN, des lipides ou des protéines (James et al., 2002) et peut ainsi modifier l'expression de gènes participant au développement. Enfin, une telle carence est associée à une altération du métabolisme de l'homocystéine (Durand et al., 1996). Cette molécule semble néfaste, notamment au niveau cérébral, en potentialisant des effets cytotoxiques, comme le stress oxydant, le stress métabolique ou le stress lié à la présence de peptides β -amyloïdes (Kruman et al., 2002), ainsi que l'excitotoxicité liée au calcium associé à une sur-activation des récepteurs au glutamate (Kruman et al., 2000). Il est aujourd'hui reconnu qu'une carence en donneurs de méthyles contribue à la survenue de pathologies au cours du développement ainsi que de manière plus tardive, qui touchent notamment le système nerveux central.

2. Pathologies du développement

a. Altération de la fertilité et défauts des processus pré-implantatoires

Une carence en donneurs de méthyles a des effets délétères sur le développement avant même le développement du zygote. La carence induit notamment une diminution du rapport SAM/SAH dans les testicules de rats (Shivapurkar et al., 1983), alors qu'il a été rapporté une augmentation de l'activité méthionine synthase dans les cellules de Leydig (Wallock-Montellius et al., 2007) chez le cochon nain, associée à une diminution du nombre de cellules germinales et une réduction d'œstradiol, de LH et de progestérone. La réduction du taux de vitamines B est associée à des altérations du métabolisme des hormones sexuelles (Evans, 1928) qui influencent la fonction de reproduction. Une réduction de la MTHFR est associée à un faible poids des testicules et à une réduction du nombre de spermatozoïdes chez

la souris (Kelly et al., 2005). Le variant C677T MTHFR serait lié à une infertilité chez l'homme en relation avec une altération de la spermatogénèse induite par la réduction de capacité à synthétiser l'ADN (Bezold et al., 2001). Chez la femelle, la carence en B9 est associée à une altération de la fertilité liée à des défauts de prolifération cellulaire (Twigt et al., 2011). L'augmentation du taux d'homocystéine est en relation avec une diminution du degré de maturation des ovocytes (Szymanski et Kazdepka-Zieminska, 2003). Ainsi, les acteurs du cycle des monocarbones, les variants MTHFR, les variants RFC et la carence en B12, pourraient intervenir dans près de 40% des cas d'infertilité dont la cause n'a pas été identifiée (Sery et al., 2012, Altmae et al., 2010, Pront et al., 2009).

Par ailleurs, une carence en donneurs de méthyles est associée à diverses complications de la grossesse, telles que les défauts de pré-implantation, une pré-éclampsie, les hématomes rétro-placentaires, les retards de croissance in-utero, les accouchements prématurés, les morts fœtales ou prématurées du nourrisson. Au niveau cellulaire, un déséquilibre prolifération/différenciation et apoptose a été incriminé (Kruman et al., 2002, Mattson et al., 2000). En condition de carence en B9 et/ou B12, des progéniteurs neuronaux hippocampiques (H19-7) présentent une réduction de leur capacité de prolifération (Akchiche et al., 2012, Akchiche et al., 2010, Kruman et al., 2005). La carence en B9 réduit les capacités de prolifération des cellules souches en association avec une augmentation de l'apoptose des cellules souches neuronales (Craciunescu et al., 2004, Kruman et al., 2002), tandis que le déficit en B12 réduirait la prolifération tout en induisant la différenciation de cellules neuronales (Battaglia-Hsu et al., 2009). Ces propriétés contribuent à expliquer les problèmes de fertilité ainsi que les avortements spontanés chez les sujets carencés de manière périconceptionnelle (Forges et al., 2007). Les folates sont échangés du sang maternel au sang fœtal par un transport au niveau du placenta (Steegers-Theunissen et al., 1995), ce qui contribue à des concentrations en B9 dans le sang fœtal supérieures à celles du sang maternel (Strelling et al., 1976). Les ovocytes et les embryons pré-implantatoires de mammifères possèdent la quasi-totalité du matériel nécessaire au transport des folates (Matherly et al., 2007) et à l'activité enzymatique du cycle des monocarbones (Ikeda et al., 2012, Benkhalifa et al., 2010, Ikeda et al., 2010, Kwong et al., 2010). La réaction de synthèse de la SAM est déjà présente dans les ovocytes et dans les blastocystes, et une diminution du taux de folates réduit les capacités de prolifération cellulaire pour aboutir à un arrêt du développement avant le stade blastocyttaire en empêchant la transition des différents stades du développement

(O'Neill, 1998, Menezo et al., 1989). L'homocystéine est à l'origine d'un retard du développement des blastocystes dans plusieurs espèces (Ikeda et al., 2010, Monezo et al., 1989). Très tôt lors de la grossesse, l'hyperhomocystéinémie peut contribuer à la survenue d'avortements spontanés (Vanaerts et al., 1994) en perturbant l'implantation par une altération des vaisseaux déciduaux et chorioniques (Wouters et al., 1993). Plus tardivement au cours de la grossesse, elle est associée à un risque accru de pré-éclampsie précoce sévère liée à une altération des cellules endothéliales (Rajkovic et al., 1997, Dekker et al., 1995, Roberts et al., 1989). Les altérations de la vascularisation placentaire et les déséquilibres hormonaux liés aux taux d'homocystéine, pouvant contribuer au syndrome de Stein-Levental (Chakraborty et al., 2013, Ebisch et al., 2007, Forges et al., 2007, Sibai, 1999) sont associés à un risque accru de retard de croissance in-utero (Leeda et al., 1998, Burke et al., 1992).

b. Défauts de fermeture du tube neural

Au cours du développement embryonnaire, la carence en vitamine B9 est particulièrement décrite dans la survenue de pathologie du développement du système nerveux central. Il s'agit principalement de défauts de fermeture du tube neural (DFTN) (Safi et al., 2012, Smithells et al., 1976) qui peuvent se manifester selon différents degrés de gravité : anencéphalie, exencéphalie, encéphalocèle, méningocoele. La présence d'un faible taux de folates est observée chez les nouveau-nés atteints (Brouwer et al., 2000, Mills et al., 1995, Steegers-Theunissen et al., 1994, Czeizel et al., 1992). La carence en folates est aujourd'hui considérée comme l'une des causes majeures de DFTN (Van der Put et Blom, 2000). Parmi les gènes susceptibles d'intervenir dans l'étiologie de la pathologie, un grand nombre d'acteurs du transport des folates et du cycle des monocarbones ont été incriminés (Farkas et al., 2013b, Greene et al., 2009, Boyles et al., 2005). L'hyperhomocystéinémie est associée aux DFTN (Groenen et al., 2004). De nombreux variants génétiques semblent contribuer à l'apparition de DFTN comme le C667T MTHFR (Wenstrom et al., 2000b). La part des variants génétiques semble importante puisque l'homozygotie C677T MTHFR pourrait expliquer 40 à 50% des DFTN qui pourraient être palliés par une supplémentation en folate (Wenstrom et al., 2000b, Lopez-Quesada et al., 2000). L'homocystéine semble altérer l'expression d'un certain nombre de gènes homéotiques responsables de défauts de mise en

place de la moelle épinière (Kobus et al., 2013). De manière globale, la mise en place du squelette semble être altérée en condition de carence et contribue à la survenue de DFTN (Burren et al., 2010, De Castro et al., 2010).

Les DFTN ne se résument pas aux cas de spina bifida, l'altération de la mise en place du système nerveux et du squelette impacte également la formation de la face. Les fentes labio-maxillo-palatines sont les plus décrites dans le contexte d'une carence en donneurs de méthyles. L'hyperhomocystéinémie, les variants polymorphiques MTHFR, MTRR, MTR et BHMT ont été reliés à cette pathologie (Chorna et al., 2011, Hu et al., 2011 Verkleij-Hagoort et al., 2007, Wong et al., 1999, Wilson et al., 1998). Il semble que chez le fœtus le sexe joue un rôle prédominant dans le risque de survenue de fentes en condition d'hyperhomocystéinémie ; les fœtus femelles seraient moins sensibles à l'augmentation du taux d'homocystéine pour ce type de pathologie, ce qui expliquerait que la prévalence soit plus élevée chez les mâles (Kumari et al., 2013). Le rôle de la vitamine B9 est là encore primordial puisqu'une inactivation du gène *Folbp1* (folate binding protein 1) entraîne des DFTN dont des fentes labio-palatines impliquant une anomalie de fermeture fronto-nasale associée à l'absence de l'axe bilatéral pouvant être létales (Tang et al., 2005). La supplémentation en folates semble avoir un effet préventif sur ce type de pathologie (Schubert et Krost, 2006, Krapels et al., 2004, Laurence et al., 1981, Smithells et al., 1980).

c. Supplémentation

Au vu du rôle du métabolisme des folates et de la prévalence des carences dans la population, certaines personnes sont soumises à une complémentation alimentaire. C'est le cas notamment des femmes enceintes pour minimiser les risques associés à une carence sur le développement de l'enfant (Smithells et al., 1976). Une supplémentation périconceptionnelle en folates a montré des effets bénéfiques en tant que traitement préventif des malformations congénitales (Fekete et al., 2012, Moyers et Bailey, 2001) et vis-à-vis d'autres types de pathologies puisqu'elle réduirait les risques d'autisme (Surén et al., 2013). L'OMS recommande l'administration d'une supplémentation en folates dès un mois avant la conception et pendant les trois premiers mois de grossesse (Institut national de prévention et

d'éducation pour la santé, 2007, De-regil et al., 2010). La supplémentation est alors adaptée au profil de la future mère : une femme sans antécédent est dirigée vers une supplémentation à hauteur de 0.4mg/jour, tandis qu'une femme à risque (présentant des antécédents de grossesse à DFTN ou faisant l'objet d'un traitement « anti-folique » de type anti-épileptique ou anti-inflammatoire) sera supplémentée à hauteur de 5mg/jour. Cette pratique réduit considérablement le risque de DFTN, de fentes labio-maxillo-palatine et de malformations cardiaques (Czeizel et Dudas, 1992, Shaw et al., 1994, Werler et al., 1993). Malgré ces recommandations, il apparaît qu'en France les mesures de prévention soient insuffisantes puisque des études épidémiologiques montrent que seulement 40.3% des femmes seraient supplémentées au cours de leur grossesse, dont plus de 50% avant la conception ou au cours du premier mois de grossesse, ce qui correspond pour 24% à une période où celle-ci est efficace pour la prévention des anomalies congénitales (Enquête Nationale Périnatale 2010 : Naissance en 2010 et évolution depuis 2003, Blondel et Kermarrec, 2011). Au niveau cellulaire, la supplémentation stimule la neurogénèse (Zhang et al., 2012, Liu et al., 2010) et la régénération des axones (Iskandar et al., 2010) chez les rongeurs. Par ailleurs, un certain nombre d'études suggèrent un rôle de la vitamine B12 dans les anomalies de développement du système nerveux central, dont les DFTN (Li et Sheng, 2003, Guerra-Shinohara et al., 2002). La réduction du taux de folate plasmatique chez les femme enceintes d'un enfant présentant un spina bifida s'accompagne d'un taux bas de B12 (Groenen et al., 2004, Kirke et al., 1993) bien que seul le taux de folate soit réduit dans les plasmas de ces enfants (Brouwer et al., 2000, Steegers-Theunissen et al., 1994). La carence en vitamine B12 pourrait être suffisante pour augmenter le risque de DFTN (Brouwer, 2000, De Bree et al., 1997, Mills et al., 1996, Czeizel et al., 1992, Smithells et al., 1983). A ce titre, un certain nombre d'experts suggèrent de coupler une supplémentation en B12 à la supplémentation en B9 actuellement préconisée (Brouwer, 2000, Nelen et al.2000, Mills et al., 1996, Czeizel et al., 1992). Ceci semble important au vu du rôle des folates et de la B12 dans les processus de « programmation foetale » (Guéant et al., 2013b) et l'intervention des mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Faulk et Dolinoy, 2011, Gabory et al., 2011).

3. Pathologies de l'adulte

La carence en donneurs de groupements méthyles est également associée à de nombreuses pathologies touchant un grand nombre de systèmes chez l'adulte. Avant 1998, 16 à 20% de la population américaine étaient carencés en folates. De sorte à minimiser les risques, les Etats-Unis ont opté pour une politique de santé publique qui vise à fortifier en vitamines toutes les farines.

a. Risques cardio-vasculaires

L'hyperhomocystéinémie est associée à un certain nombre de risques vasculaires (Wald et al., 1998). Chez le jeune individu, la carence en donneurs de méthyles favoriserait les cardiomyopathies (Garcia et al., 2011) associées à une hypertrophie cardiaque. L'hypertrophie cardiaque joue dans un premier temps un rôle compensatoire pour assurer une fonction cardiaque normale, cependant elle est à long terme délétère et induit une insuffisance cardiaque (Wang et al., 2004). D'autre part, le dysfonctionnement systolique du ventricule gauche associé à l'hypertrophie cardiaque en condition de carence (Guéant-Rodriguez et al., 2007) est corrélé à l'homocystéinémie (Chery et al., 2002). Enfin, la carence en vitamine B est associée à une augmentation du risque d'athérosclérose (Mahalle et al., 2013, Lentz, 2005) et de thrombose (Fryer et al., 1993, Rodgers et Kane, 1986) liée à une augmentation de l'homocystéinémie. Des études de supplémentation en B12 démontrent une réduction des maladies cardiovasculaires chez les patients, suite à une angioplastie coronarienne (Schnyder et al., 2002, Schnyder et al., 2001) associée à une réduction du risque de perturbation vasculaire (Spence et al., 2005). En association avec la vitamine B9, la vitamine B12 améliore le flux sanguin coronaire des patients atteints de coronaropathie. Une méta-analyse de 2002 tendait déjà à démontrer une réduction du risque de maladies cardiaques de 10 à 15% suite à une baisse de 25% du taux plasmatique d'homocystéine (Wald et al, 2002).

b. Diabète

Parmi les troubles métaboliques, le diabète est lui aussi associé aux vitamines B. La carence en vitamine B12 favoriserait l'apparition d'un diabète de type-II (Kumthekar et al., 2012, Nervo et al., 2011, Pflipsen et al., 2009). L'accumulation d'homocystéine serait responsable de modifications structurales au niveau de protéines comme les récepteurs à l'insuline (Najib et Sanchez-Margalet, 2005). Dans le cas du diabète de type-I, ce serait près de 50% des patients qui présenteraient des taux faibles de B12 (Koshy et al., 2012). La supplémentation en vitamine B9 chez les diabétiques de type-II réduit le taux d'homocystéine plasmatique et est associée à un meilleur contrôle de la glycémie (Sudchada et al., 2012).

Ces pathologies sont associées à des risques de maladies cardiovasculaires (Dicker-Brown et al., 2001, Fonseca et al., 2000), d'athérosclérose et d'insuffisance rénale (Wiklund et al., 1996, Araki et al., 1993, DeFronzo et al., 1992). Les néphropathies semblent elles aussi liées au métabolisme des monocarbones (Poirier et al., 2001).

c. Atteintes hépatiques

La carence en donneurs de groupement méthyle intervient dans les dysfonctions hépatiques. Des cas de stéatoses hépatiques s'observent chez des modèles murins mutés pour MTHFR (Siqueira et al., 2011) ou pour CBS (Robert et al., 2005, Namekata et al., 2004) Schwahn et al., 2003). L'hyperhomocystéinémie conduit à une accumulation des acides gras (de Carvalho et al., 2013, Roblin et al., 2007b) responsable du développement d'une stéatose hépatique qui pourrait s'expliquer par un défaut de l'oxydation mitochondriale des acides gras (Pooya et al., 2012). Dans le foie, l'accumulation d'homocystéine est aussi associée à la fibrose, l'inflammation et la nécrose (Tsukamoto et Lu, 2001). Les patients atteints d'alcoolisme chronique, associé à une altération du statut B9/B12 et à une dérégulation du cycle des monocarbones (Morgan et al., 1988, Bonjour et al., 1980) sont donc particulièrement sensibles à ce genre de pathologie.

d. Atteintes osseuses

La carence en vitamines B est associée à une augmentation du risque d'ostéoporose (Dhonukshe-Rutten et al., 2003) liée à la réduction de la densité osseuse (Naharci et al., 2012, Gjesdal et al., 2006). Dans ce contexte, la vitamine B12 a plus particulièrement été reliée à l'ostéoporose (Morris et al., 2005, Tucker et al., 2005), à un risque plus important de fracture (Dhonukshe-Rutten et al., 2005, McLean et al., 2004) et une perte de la masse osseuse chez la femme âgée (Stone et al., 2004). L'homocystéine est particulièrement délétère chez la femme après la ménopause où elle est associée à un risque accru de perte osseuse au niveau de l'os coxal et à des fractures spinales (Kim et al., 2013, El Maghraoui et al., 2012). Depuis 1994, on sait que l'ostéoporose et la densité osseuse peuvent être améliorées chez les patients par une supplémentation en vitamine B12 (Melton et Kochman, 1994).

e. Risques cancéreux

Les polymorphismes de la MS et de la MS-réductase sont associés à des risques de développer différents cancers : adénome, cancer du sein, cancer du côlon (Ding et al., 2013, Suzuki et al., 2008). Des tests de supplémentation ou déplétion en donneurs de méthyles sur des modèles de cancers hépatiques (Christman et al., 1993) mettent en évidence que les conditions d'hypométhylation favorisent l'expression de proto-oncogènes tandis que des points d'hyperméthylation inhibent l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs (Jones et Baylin, 2002). L'accumulation de SAH et l'altération des mécanismes de méthylation auraient aussi un rôle dans la survenue de cancer mammaire en altérant le métabolisme des oestrogènes (Zhu, 2003).

f. Troubles neuropsychiatriques et neurologiques

Chez les adultes, la dépression toucherait 8% de la population, l'anxiété 17% et la schizophrénie pas moins de 1% ; tous troubles confondus, les atteintes neuropsychiatriques toucheraient 20 à 25% de la population européenne. Depuis plusieurs décennies, la carence en vitamine B12 et l'hyperhomocystéinémie ont été associées à des troubles neuropsychiatriques (Lindenbaum et al., 1988). La vitamine B9 semble aussi participer à ce type de pathologies. Une diminution du taux plasmatique en vitamine B9 serait en lien avec la survenue d'un état dépressif (Reynolds et al., 1970), tandis que la supplémentation en folate atténue la dépression (Papakostas et al., 2012, Alpert et al., 2000) en lien avec une restauration des taux d'acide 5-hydroxy-indol-acétique et du métabolite de la sérotonine dans le liquide céphalo-rachidien qui sont altérés en condition de carence (Botez et al., 1982). La réduction de SAM est impliquée dans la pathologie en tant que donneur universel de groupement méthyle, nécessaire à la réaction de méthylation intervenant dans la synthèse de neurotransmetteurs (dopamine, noradrénaline et sérotonine) (Bottiglieri et al., 2012, Bottiglieri et al., 2000), ce qui explique l'effet bénéfique d'un traitement à la SAM (Bottiglieri et al., 1990). L'ensemble des vitamines du groupe B semble impliqué puisqu'une supplémentation en B6 pourrait réduire les symptômes associés à la dépression (Shiloh et al., 2001). Pour certains troubles neurologiques, tels que l'épilepsie, le lien avec la carence n'est pas encore établi, pourtant il semble que ce soit un facteur de risque puisque l'hyperhomocystéinémie est associée à des phénomènes convulsifs (Sprince et al., 1969) et que l'administration d'homocystéine provoque des crises d'épilepsie chez l'animal (Kubova et al., 1995). Enfin, les vitamines B9 et B12 semblent être impliquées dans des pathologies se déclarant très tôt, comme l'autisme (Schmidt et al., 2012, Lowe et al., 1981). La pathologie est associée à des anomalies neurologiques s'accompagnant de déficits fonctionnels. Les taux de B9 et d'homocystéine plasmatiques sont normaux, cependant le liquide céphalo-rachidien présente un taux réduit de folates, qui contribue à une réduction du taux de 5meTHF cérébral. Cette déplétion serait due à la production d'auto-anticorps contre les récepteurs aux folates (FR) qui conduit à un défaut du transport cérébral en folates (Ramaekers et al., 2007). La notion de programmation fœtale est également importante dans cette pathologie puisque dans 23% des cas la mère, le père ou les deux parents sont positifs pour les auto-anticorps ; ce qui pourrait contribuer au développement de la pathologie dans la descendance (Ramaekers et al., 2013). Une

supplémentation en folate a également démontré son efficacité puisqu'en 4 mois un tiers des enfants présentent une amélioration de la communication verbale, l'expression et la réceptivité, l'attention ainsi que pour les comportements stéréotypés (Frye et al., 2013). Les folates interviendraient également dans des pathologies comme la schizophrénie, pour laquelle la carence associée à une hyperhomocystéinémie serait un facteur de risque (Mabrouk et al., 2011, Meier et al., 2010, Susser et al., 1998). Les patients homozygotes C677T MTHFR sont plus sensibles au développement d'un profil schizophrénique (Stover et al., 2011, Regland et al., 1995). Cependant, certains patients présentent un profil plasmatique normal en B9, B12 et homocystéine. Les auto-anticorps seraient également en cause et contribueraient à la déplétion du liquide céphalo-rachidien en 5mTHF. Un certain nombre de voies métaboliques sont altérées ce qui aboutit à un taux réduit de dopamine et de sérotonine. La supplémentation en B9 permet également de stabiliser et d'améliorer la pathologie, notamment en éliminant les hallucinations acoustiques (Ramaekers et al., 2014).

Après la naissance, le polymorphisme C677T MTHFR est associé à un retard mental, des symptômes psychiatriques et une régression psychomotrice (Haworth et al., 1993). Le retard mental et les symptômes psychiatriques sont également observés pour les mutations CBS ou TC-II, alors associées à diverses complications neurologiques comme des convulsions ou des dystonies (Mudd et al., 1985, Thomas et al., 1982). La régression psychomotrice, les convulsions ainsi que les neuropathies sensorielles, les apathies ou les hypotonies pourraient être liées à un défaut de mise en place des gaines de myéline, particulièrement influencée par la B12 (Lovblad et al., 1997, Hall et al., 1990). Les variants polymorphiques des gènes du cycle des monocarbone joueraient également un rôle dans le risque de Trisomie 21 (Zampieri et al., 2012). Le polymorphisme C677T MTHFR et les variants hétérozygotes A2756G/A66G MTR sont associés à un risque accru de porter un enfant atteint de cette maladie.

4. Pathologies neurodégénératives

De manière générale, le vieillissement est associé à la survenue de maladies neurodégénératives par l'augmentation physiologique d'un certain nombre de paramètres constituant des facteurs de risque (excitotoxicité, augmentation de l'homocystéine, stress

oxydant, dommages ADN et apoptose) (Kronenberg et al, 2009). Une baisse de la vitamine B12 et une augmentation de l'homocystéine avec l'âge sont associées à une atrophie cérébrale liée à une perte neuronale, à une dégénérescence des gaines de myéline ainsi qu'à une dilatation ventriculaire et des lésions vasculaires (Inada et al., 1982) qui contribuent à la survenue d'une démence sénile. L'augmentation de l'espérance de vie est aujourd'hui associée à la recrudescence de certaines pathologies, comme les démences séniles et les déficits cognitifs, qui deviennent des problèmes de santé publique majeurs (Smith, 2008). Les déséquilibres concernant les vitamines B et l'homocystéine sont associés à ce type de pathologies (Herrman et Obeid, 2011). Une prise en charge en début de carence permettrait de prévenir ou de retarder l'apparition des troubles cognitifs chez le sujet âgé (Martin et al., 1992). L'atrophie cérébrale peut être également ralentie et les performances cognitives améliorées chez les patients présentant des troubles légers de la mémoire par une supplémentation en vitamines B (Smith et al., 2010) et une diminution de seulement 3µM de l'homocystéinémie réduirait les risques de démence de 20% (Wald et al., 2011).

a. Paralyse supranucléaire progressive et sclérose en plaque

La carence en B12 et l'hyperhomocystéinémie associée sont des facteurs déterminants de la paralyse supranucléaire progressive et de la sclérose latérale (Levin et al., 2010) pour laquelle, selon certaines études, le taux d'homocystéine peut être directement lié à la vitesse de progression de la maladie (Zoccolella et al., 2008). La carence en vitamine B12 est aussi associée à la sclérose en plaque où la réaction inflammatoire chronique et la régénération des gaines de myéline pourraient augmenter les besoins en B12 (Reynolds, 1992). Pour cette pathologie, le lien avec l'hyperhomocystéinémie n'est pas admis puisque les avis sont pour le moment contradictoires (Russo et al., 2008, Teunissen et al., 2008).

b. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est également liée au cycle des monocarbones. Des modèles de séquestrations de la vitamine B12 dans la substance noire des rats conduit à un phénotype « Parkinson-like » (Orozco-Barrios et al., 2009) associé à un déséquilibre entre prolifération/différenciation cellulaire et à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (Battaglia-Hsu et al., 2009). La carence favoriserait la perte des neurones dopaminergiques par cytotoxicité de la roténone et du fer (Duan et al., 2002) et par accumulation d'homocystéine (Qureshi et al., 2008). Il a été documenté que les patients parkinsoniens présentent des taux élevés d'acide méthyl-malonique (MMA) (Levin et al., 2010, Toth et al., 2010) et d'homocystéine (Heider et al., 2004, Blandini et al., 2001, Yasui et al., 2000, Kuhn et al., 1998, Allain et al., 1995). Les sujets hyperhomocystéinémiques sont plus sensibles à la dépression et échouent aux tests neuropsychométriques, ce qui n'est pas observé chez les patients avec une homocystéinémie normale (O'Suilleabhain et al., 2004). Or, l'accumulation d'homocystéine est favorisée par la consommation accrue en SAM par l'activité COMT impliquée dans le métabolisme de la L-dopa utilisée pour le traitement de la pathologie (Miller et al., 2003, Blandini et al., 2001, Liu et al., 2000, Muller et al., 1999, Miller et al., 1997), ce qui évoque un effet potentiellement délétère du traitement sur la maladie. De plus, le polymorphisme C677T de MTHFR lié à une hyperhomocystéinémie (Yasui et al., 2000) interviendrait dans la pathologie avec un certain nombre d'autres polymorphismes (Bialecka et al., 2012, Fong et al., 2011). La diminution du rapport SAM/SAH induisant une augmentation du taux d'homocystéine est elle aussi directement impliquée dans la pathologie parkinsonienne (Kaut et al., 2012, Obeid et al., 2009). La SAM est diminuée tandis que la SAH s'accumule (Panza et al., 2009). La SAM agirait sur l'activité GST, dont la présence est réduite dans la pathologie, et le stress oxydant submergerait le potentiel d'élimination des radicaux libre (Lièvre et al., 2001).

c. Maladie d'Alzheimer

Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont fréquemment sujets à une carence en vitamine B12 (Cole et Prchal, 1984). Les patients présentant un déclin cognitif associent une diminution plasmatique de B12 (Clarke et al., 2007, Karnaze et Carmel, 1987) et une augmentation d'homocystéine (Miller, 1999, Clarke et al., 1998, Gottfries et al., 1998, McCaddon et al., 1998), avant même la déclaration de la maladie (Joosten et al., 1997). La vitamine B9 est elle aussi mise en jeu puisque les patients présentent des taux céphalo-rachidiens réduits (Serot et al., 2001). La B9 semble d'autant plus impliquée qu'il a été constaté que sa carence induit des défauts de neurogenèse et de plasticité synaptique dans l'hippocampe de souris, associés à une agrégation de type amyloïde au niveau de la vascularisation cérébrale (Zhuo et al., 2010). La SAM et la MAT sont également réduites (Bottiglieri et al., 1990). L'hyperhomocystéinémie est considérée comme l'un des facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer (Ray et al., 2013, Czapski et al., 2012, Zhang et al., 2008a, Seshadri et al., 2002, Kruman et al., 2002, Clarke et al., 1998) et est associée à la présence de déficits cognitifs (Clarke et al., 1998, McCaddon et al., 1998) ; l'homocystéine potentialise l'effet neurotoxique des peptides β -amyloïdes dans des cellules hippocampiques de souris (Kruman et al., 2002, White et al., 2001, Hasegawa et al., 2005). Toutefois, à ce jour, la question demeure ouverte quant au fait de savoir si le taux d'homocystéine est un biomarqueur de la maladie ou un facteur causal (Farkas et al., 2013a, Zhuo et al., 2011). Un régime pauvre en donneurs de méthyles favorise l'augmentation du taux d'homocystéine (Farkas et al., 2013a). Cependant, l'altération du métabolisme de l'homocystéine pourrait être un facteur en faveur de la formation de plaque amyloïdes (White et al., 2001). Selon certains auteurs, elle pourrait alors être utilisée comme marqueur de dépistage précoce pour la maladie (De Jager et al., 2012, Snowdon et al., 2000, Lehmann et al., 1999, Clarke et al., 1998). Certains polymorphismes des enzymes du métabolisme des monocarbones ont été reliés à la maladie, notamment le variant MTHFR C677T (Fernandez et al., 2005, Anello et al., 2004). La supplémentation en folates semble aujourd'hui avoir un effet préventif sur la production d'agrégats amyloïdes (Ho et al., 2003) ; l'association B9/B12 semble prévenir l'atrophie de la substance grise et le déficit cognitif, tandis que la bétaine aurait elle aussi un effet bénéfique sur le déclin cognitif.

Un grand nombre de mécanismes ont été proposés concernant le rôle de l'homocystéine dans la pathologie (Zhuo et al., 2011). L'altération des mécanismes de déméthylation et désacétylation pourraient intervenir (Vadnal et al., 2012), d'autant que le taux de SAM est abaissé dans le LCR de patients. Le stress oxydant et le stress du réticulum endoplasmique constituent une piste complémentaire (Cankurtaran et al., 2013, Kim et al., 2008, Tchanchou et al., 2008). L'excitotoxicité liée aux récepteurs NMDA et à l'altération de l'homéostasie calcique semble aussi impliquée (Growdon et al., 2001). L'augmentation de protéines cytotoxiques est l'un des mécanismes privilégiés à l'heure actuelle. L'augmentation de la protéine Tau phosphorylée est reconnue (Zhang et al., 2008a). Un certain nombre de données concernant l'élévation du taux de peptides β -amyloïdes sont aujourd'hui disponibles (Hasegawa et al., 2005). On y trouve la contribution de la N-homocystéinylation des protéines β -amyloïdes dans l'agrégation et la toxicité du peptide (Khodadadi et al., 2012) qui irait jusqu'à l'acquisition d'un caractère amyloïdogène par un certain nombre de protéines possédant cette modification (Stroylova et al., 2012, Stroylova et al., 2011, Paoli et al., 2010). Parmi les nombreuses pistes médiées par l'homocystéine, il semble qu'un effet délétère sur les vaisseaux cérébraux contribue à accentuer l'effet neurodégénératif de la pathologie (Candito et al., 1997).

**OBJECTIFS
DE RECHERCHE**

La recherche a établi un lien fort entre la survenue d'anomalies du développement in utero et le déficit maternel en vitamines B9 et/ou B12. L'hyperhomocystéinémie et les défauts de synthèse/méthylation de l'ADN, en lien avec une telle carence, sont des facteurs de risque pour de nombreuses pathologies, notamment au niveau cérébral. Depuis quelques années, les microARNs non-codants sont présentés comme des acteurs clés de la régulation post-transcriptionnelle. Leur implication dans la régulation du développement et de la maturation cérébrale (différenciation, sélection et synaptogenèse) est aujourd'hui établie. Cependant, aucune relation entre carence précoce en donneurs de méthyles, microARNs et anomalies du développement n'avait été établie jusqu'alors.

Une supplémentation en vitamine B9 est fortement recommandée chez la femme enceinte par les autorités en santé publique. Les études portant sur cette pratique ont démontré son efficacité dans la prévention des anomalies du développement, en particulier en limitant la survenue de défauts de fermeture du tube neural. La supplémentation est proposée un mois avant la conception et jusqu'à la fin du premier trimestre de grossesse, qui couvre les étapes de mise en place des structures cérébrales. Toutefois, le neurodéveloppement se poursuit par des phases importantes de maturation cérébrale post-natales. Bien que la période périnatale soit cruciale pour le développement et la maturation fonctionnelle cérébrale, les effets potentiels d'une supplémentation en vitamine B9 à des stades tardifs du développement n'avaient jamais été étudiés.

L'objectif de notre projet était de définir les conséquences d'une carence gestationnelle précoce en donneurs de groupements méthyles sur le neurodéveloppement chez le rat, d'étudier les mécanismes épigénétiques qui pourraient contribuer aux anomalies du développement, et d'évaluer les effets d'une supplémentation périnatale (dernier tiers de la gestation et trois premières semaines post-natales) en folates sur la maturation cérébrale anténatale et post-natale. L'étude est basée sur un modèle in vivo de rats carencés en périodes périconceptionnelle et gestationnelle en vitamines B9 et B12 (Blaise et al., 2007) ainsi que sur un modèle in vitro de progéniteurs neuronaux hippocampiques H19-7/IGF-IR carencés en vitamine B9 (Akchiche et al., 2010).

MATERIELS ET METHODES

NB : Les anticorps et les compositions des solutions utilisées sont respectivement listés dans les annexes I et II.

I. Modèle animal

1. Entretien et alimentation

Fiche technique 1

L'étude est effectuée sur un modèle de Rats Wistar (Wistar Han IGS Rat, Charles River, l'Arbresle, France). Les expérimentations sont réalisées en accord avec les consignes du « Guide for the care and use of laboratory animals » (NIH, MD, 1985) et ont été approuvées par le Comité d'Ethique de l'Université de Lorraine. Les animaux sont acclimatés puis entretenus en stabulation dans une animalerie agréée (N° d'agrément : A5454722).

2. Alimentation

Fiche technique 1

Au cours de l'acclimatation, les animaux disposent d'un régime standard (A04 C, Maintenance Diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France). Un mois avant leur mise en accouplement, les femelles témoins sont maintenues sous le régime d'entretien tandis que les femelles destinées à suivre un régime carencé en donneurs de méthyles disposent d'un régime déplété en vitamine B12, folates et appauvri en choline (Low B C 821086, Special Diet Service, Saint-Gratien, France) (Blaise et al., 2009, Blaise et al., 2007a, Blaise et al., 2007b). Le taux de méthionine (~ 0.4%) est similaire dans les deux régimes (**Figure 39**).

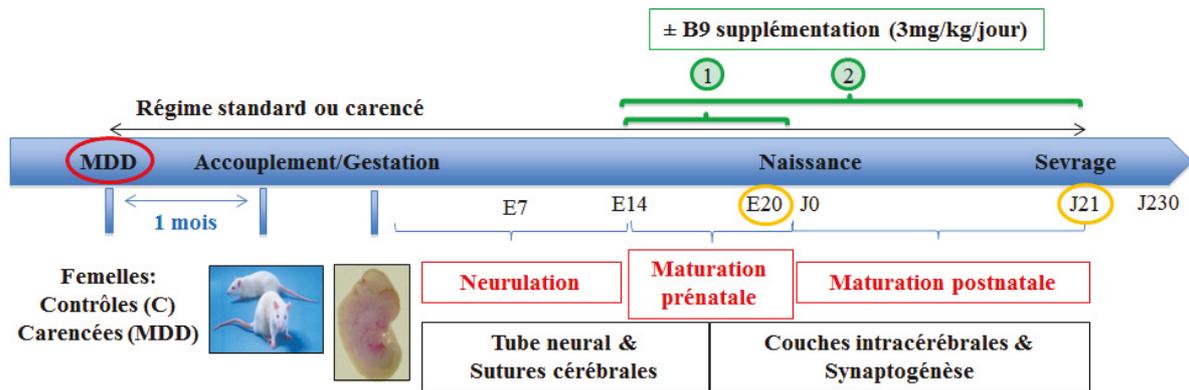


Figure 39 : Protocole animal élaboré au laboratoire pour l'étude des conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles

Les rats Wistar étudiés au 20^{ème} jour embryonnaire (E20) ou au 21^{ème} jour post-natal (J21) sont obtenus à partir d'un protocole de carence nutritionnelle chez la mère. Un mois avant la mise en accouplement, les femelles des groupes carencés sont nourries avec un régime dépourvu de B9, B12 et appauvri en choline, tandis que les femelles du groupe contrôle sont nourries avec un régime standard. Les groupes supplémentés sont traités avec une solution d'acide folique (3mg/kg/jour) pendant les 7 derniers jours de gestation et jusqu'à la date du sevrage (J21).

3. Reproduction

Fiche technique 1

Chaque matin, un frottis vaginal est effectué et observé au microscope optique à contraste de phase pour évaluer la présence ou non de spermatozoïdes, dont la présence est définie comme suffisante pour considérer que l'accouplement a été efficace.

Dans les 24 heures après la parturition, les portées sont réduites à dix individus de sorte à standardiser l'étude.

4. Supplémentation

Fiche technique 2

La solution de vitamine B9 (3mg/kg/jour) sous sa forme synthétique acide folique (F8758, Sigma-Aldrich) est mélangée au véhicule, du lait concentré (Régilait®). Les femelles supplémentées reçoivent quotidiennement per os un volume final de 1mL de véhicule ou de mélange véhicule-B9. La supplémentation est administrée du 13^{ème} jour de gestation (E13) au 20^{ème} jour de gestation (E20) pour le protocole embryonnaire ou du 13^{ème} jour de gestation (E13) au 21^{ème} jour post-natal (J21), date de sevrage, pour le protocole juvénile (**Figure 39**).

5. Prélèvements sanguins et tissulaires

Fiche technique 3

Selon le protocole, les individus sont mis à mort à E9, E13, E16, E20 ou J21 par excès d'isofluorane (B506, Forane®, Abbott). Un échantillon sanguin de la femelle et des ratons sont récupérés dans des tubes héparinés (Venosafe® Plastic Tubes, Terumo Europe) après décapitation. Pour les embryons, le prélèvement s'effectue directement dans les cornes utérines ; à ce stade leur taille ne permet pas de prélèvements sanguins.

Pour les analyses biochimiques, le cervelet, le tronc cérébral, l'hypothalamus, le striatum, l'hippocampe et le cortex sont rapidement microdissequés à partir du demi-cerveau gauche. Pour les études immunochimiques, les demi-cerveaux droits sont immédiatement fixés et inclus en paraffine ou congelés dans du méthylbutane. Les cerveaux en paraffine sont coupés au microtome en tranches sagittales de 12µm d'épaisseur tandis que les cerveaux J21 congelés sont coupés au cryostat.

Pour des études complémentaires en comportement, des rats J21 ont été conservés jusqu'à J230. A partir de J21, ils reçoivent une alimentation standard non carencée et sont séparés de la mère pour être hébergés en stabulation. Les procédés appliqués pour la mise à mort et le prélèvement des organes sont identiques à ceux mis en place pour les J21.

6. Analyses morphométriques et histopathologiques

Dans notre modèle, la carence en donneurs de méthyles est associée à un ensemble de défauts du développement. Au moment des prélèvements, les individus sont photographiés et pesés, de sorte à mettre en évidence des retards de croissance. Le taux d'anomalies du développement est évalué par la recherche dans les cornes utérines d'avortons, par la présence d'individus mort-nés ou sacrifiés par la mère après parturition. Une observation anatomique des individus est effectuée de sorte à lister les différentes anomalies (siamois, syndactylies, queue « twistée »).

Fiche technique 4

Les observations morphométriques sont approfondies par l'étude des squelettes. Au cours du développement, la maturation du squelette passe par la transformation du cartilage en os. Il est possible d'évaluer les stades de l'ossification par coloration. L'étude du nombre et de la taille des points cartilagineux permet de mettre en évidence des anomalies de développement, comme les retards de croissance, les retards d'ossification ou les spina bifida (fusion des vertèbres et ouverture du canal vertébral). La procédure est adaptée de Wallin (Wallin et al., 1994). Elle nécessite un dépeçage et une éviscération complète des animaux suivis d'une déshydratation dans l'éthanol 95%. Le cartilage est spécifiquement marqué par le bleu alcian tandis que l'os est spécifiquement marqué par le rouge alizarine. Les échantillons sont libérés des tissus résiduels et stockés à 4°C dans une solution de glycérol 87%. La taille des fémurs est mesurée à l'aide du « Cell® Software » (Olympus).

Après prélèvement, les cerveaux sont eux aussi photographiés et pesés. Une évaluation morphologique est réalisée grâce à un microscope BX51 WI (Olympus, Rungis) couplé à une caméra ProgRes MF cool (Jenoptik, Jena) après un marquage des noyaux cellulaires à la thionine (Sigma Aldrich) ou au DAPI (Calbiochem, VWR International). Le calcul de l'épaisseur des couches intracérébrales d'intérêts est réalisé à l'aide du « Cell® Software » (Olympus).

Fiche technique 5

La présence d'apoptose est spécifiquement mise en évidence sur tissus ou cellules par la méthode Apostain (Frankfurt et al., 2001). Un anticorps monoclonal contre l'ADN simple-brin (F7-26 anti-ADNsb/Apostain®, AbCys SA) dilué dans de la BSA (Bovin Serum

Albumin, Sigma-Aldrich) est utilisé en condition dénaturante (Blaise et al., 2007, Akchiche et al., 2012). Parallèlement, l'apoptose est mesurée de manière additionnelle en utilisant l'ApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon International, Millipore) basé sur les tests de TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) qui marque les cellules apoptotiques en modifiant l'ADN (ajout de nucléotides directement marqués par une fluorescéine) par l'utilisation d'une terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT).

II. Modèle cellulaire

1. Souche et entretien

La lignée H19-7/IGF-IR (ATCC® CRL-2526™, lot 3507480) de progéniteurs neuronaux a été immortalisée à partir d'hippocampe embryonnaires de rats Holtzman à E17 par vecteur ADN rétroviral SV40 (tsA58 Simian Virus 40 large T antigen) portant une mutation thermosensible, exprimant le « human type-I Insulin-like Growth Factor Receptor » (IGF-IR) (Eves et al., 1992).

La lignée n'exprime pas l'antigène T SV40 à un niveau détectable mais exprime la protéine IGF-IR, qui active deux signalisations contradictoires (prolifération cellulaire ou différenciation) selon les conditions de culture. La croissance des H19-7 se fait à la température permissive de 33°C en présence de sérum. La différenciation en phénotype neuronal (extension des neurites et augmentation de l'expression de NF68) s'effectue par induction à la température non-permissive de 39°C, en présence de supplément N2 correspondant à un cocktail de facteurs de croissance (**Figure 40**).

Fiches techniques 6 & 7

Avant la décongélation des cellules, les flasques et boîtes de Pétri (Corning Falcon, Dutcher) utilisées pour la culture sont préalablement traitées avec une solution stérile de poly-L-lysine. Le passage de la lignée s'effectue à 95% de confluence selon un ratio 1:3 à 1:4 par traitement trypsine-EDTA 0.05% (T3924, Sigma-Aldrich). Les cellules perdent rapidement leur phénotype neuronal (Passage 14), une fraction des cellules est régulièrement recongelée dans

un milieu cryoprotecteur 10% DMSO (B8231, Fisher), 35% SVF (S1800 DUTSCHER), 55% DMEM (D6046, Sigma-Aldrich).

2. Milieux de culture

Fiche technique 8

En condition de prolifération, les cellules sont entretenues dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (DMEM D6046, Sigma-Aldrich) complété avec du SVF, un mélange pénicilline/streptomycine (P4333, Sigma-Aldrich), de la L-glutamine (G7513, Sigma-Aldrich) et du pyruvate de sodium (S8636, Sigma-Aldrich), et normalisé à 4.5g/L de glucose (G8769, Sigma-Aldrich) (Akchiche et al., 2010, Akchiche et al. 2012). La sélection est réalisée en présence de puromycine (P8833, Sigma-Aldrich) et de G418 (A1720, Sigma-Aldrich). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 33°C en atmosphère humide 5% CO₂/95% air.

Comme le milieu standard ne contient pas de vitamine B12, la carence est induite par l'utilisation d'un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose (D2429, Sigma Aldrich) déplété en vitamine B9, 24h avant l'induction de la différenciation. Le milieu est dilué, tamponné avec du bicarbonate de sodium (S8761, Sigma-Aldrich) et normalisé à 2mM de L-glutamine. Il est complété de la même manière que le milieu non carencé de sorte à ce que sa composition reste similaire.

Lors de la mise en différenciation, les milieux non carencés et carencés sont réalisés à partir des mêmes constituants. Le taux de SVF et le pyruvate de sodium sont abaissés. Le taux de G418 est augmenté et le complément N2 est ajouté (composé de transferrine, progestérone, putrescine et sodium sélénite) (17502-048, Life Technologies). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 39°C en atmosphère humide 5% CO₂/95% air pour une durée de 1h à 13h (**Figure 40**).

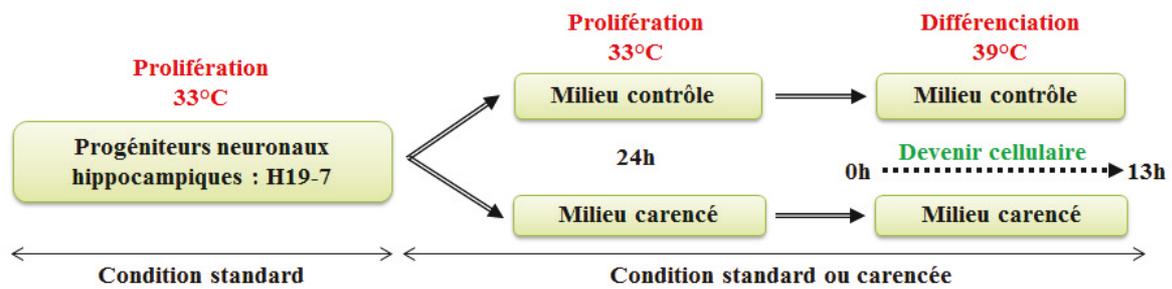


Figure 40 : Protocole cellulaire utilisé au laboratoire pour l'étude des conséquences d'une carence en donneurs de méthyles

La mise en culture des cellules H19-7 IGF-IR s'effectue dans un milieu DMEM 4.5g/L de glucose standard pendant un minimum de 24h, dans un incubateur à 33°C avec 5% CO₂ et une atmosphère humide. Le tapis cellulaire destiné à la carence est cultivé dans du DMEM 4.5g de glucose déplété en folates pendant les 24h suivantes dans les mêmes conditions d'incubation. Par la suite, l'induction de la différenciation est réalisée dans un milieu DMEM 4.5g/L glucose standard ou déplété en B9 et enrichi en N2 et appauvri en SVF, dans un incubateur à 39°C avec 5% CO₂ et une atmosphère humide.

3. Viabilité cellulaire

Fiche technique 9

La viabilité cellulaire est évaluée en mesurant l'ATP intracellulaire avec le kit ATP-Lite, CellTiter-GloLuminescent Cell viability assay (Promega) grâce à un lecteur de plaques Victor3 (Wallac Multilabel, Perkin Elmer). Le test repose sur une méthode de titration de l'ATP intracellulaire grâce à sa bioluminescence naturelle, après lyse cellulaire. La présence d'ATP témoigne d'une activité métabolique dans les cellules viables; une diminution de la production met en évidence une mort cellulaire.

Le potentiel de membrane mitochondrial est évalué avec le MitoCapture Apoptosis Detection kit (Calbiochem, VWR International) qui utilise des sondes cationiques fluorescentes, à l'aide d'un microscope BX51WI (Olympus, Rungis) (Akchiche et al. 2010).

4. Traitement par siARN

Fiche technique 10

Pour valider l'implication des miRNAs d'intérêt dans nos modèles, l'expression de miR-124a, let-7a, miR-34a dans les cellules hippocampiques a été réduite par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA). Les duplex d'oligonucléotides de la gamme *mirVana*TM miRNA Inhibitors(4464084, Ambion, Applied biosystems) dont la séquence sens (5'-3') est dirigée contre les ARNs de rats hsa-miR-124-3p (UAAGGCACGCGGUGAAUGCC), hsa-let-7a-5p (UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU) et hsa-miR-34a-5p (UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU) et le *mirVana*TM miRNA Inhibitor, Negative Control #1 (4464076, Ambion, Life technologies) sont utilisés pour évaluer l'effet de l'inhibition expérimentale des microARNs.

Les duplex siRNA sont transfectés avec de la Lipofectamine RNAiMax (13778-150, Invitrogène, Life technologies). Chaque composé est préalablement dilué dans de l'opti-MEM (31985-062, Gibco, Life technologies). Après différenciation, les cellules sont récupérées pour une analyse ARN ou protéique.

5. Récupération des échantillons

Fiche technique 11

Pour une utilisation en ADN ou ARN en biologie moléculaire, les cellules sont trypsinées et stockées à -80°C. Pour une utilisation en protéines les cellules sont récupérées par grattage, extraites et stockées à -80°C. Pour une utilisation en protéines ou ARN en immunochimie et hybridation in situ les cellules sont fixées au PFA 4% et stockées à 4°C.

III. Dosages métaboliques

Fiche technique 12

Les dosages biochimiques sont réalisés sur des plasmas non traités ou acidifiés pour certains métabolites comme l'homocystéine, la SAM et la SAH. L'extraction est effectuée dans un tampon hypotonique (PBS 0.1%, 2% d'inhibiteurs de protéases) (Protease Inhibitor Cocktail for mammalian tissues, Sigma-Aldrich). La lyse est réalisée à l'aide d'un sonicateur à sonde (Cell sonifier disruptor, Branson®). L'homocystéine nécessite une étape de traitement au DTT (Sigma-Aldrich) pour rompre les liaisons aux protéines. Le surnageant récupéré par centrifugation de 30min à 20000g à 4°C est dosé par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (BCA Protein Assay® Reagent Pierce) pour en définir la concentration en protéines (Smith et al., 1985).

Fiche technique 13

Les concentrations en vitamines B9 et B12 plasmatiques sont déterminées en mesurant le taux de marquage aux isotopes radioactifs en utilisant le kit simulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals) et un compteur gamma à doubles canaux (Fluostar Galaxy, BMG Lab Technologies) (Compteur COBRA-IIrTM autogamma, Cobalt 57 10.000-25.000 coups/min, Iode 125 : 15.000-35.000 coups/min, Packard) (Chery et al., 2002).

Fiches techniques 14

Les concentrations en homocystéine, acide méthylmalonique, acide succinique, méthionine, SAM et SAH sur des plasmas acidifiés sont mesurées par chromatographie liquide (Acquity UPLC system, Waters : Injecteur AS100, TSP / Pompe à haute pression, Spectra System, P1000XR, TSP / colonne HSST3 1,8µm 2,1 x 50 mm, Waters) couplée à de la spectrométrie de masse (Api 4000 Qtrap, Applied biosystems) (Ducros et al., 2006, Delabar et al., 1999). L'acquisition permet un suivi des transitions: 136.1/90.1 (HCY), 140.1/94.1 (HCY-d4), 149.8/ 103.6 (Met), 153.1/107.1 (Met-d3), 399.2/ 250.1 (SAM), 402.2/ 250.3 (SAM-d3), 385.2/ 136.1 (SAH), 390.2/ 136.0 (13C5-SAH) en mode positif et 116.9/72.9 (MMA et acide succinique), 119.9/ 75.9 (MMA-d3), 120.9/ 76.9 (acide succinique-d4) en mode négatif. La

quantification est réalisée à l'aide des courbes étalons avec une correction par rapport aux standards internes.

IV. Etudes de l'expression génique et ARNs

Fiche technique 15

Tous les ADN et ARN utilisés pour les expérimentations sont sujets à un contrôle qualité.

1. Méthylation globale de l'ADN

Fiches techniques 16 & 17

L'extraction des ADN est réalisée avec le QIAamp® DNA Mini extraction kit (Qiagen). Le kit est conçu et optimisé pour extraire les ADN totaux. L'ADN purifié mesure jusqu'à 50kb avec une présence majoritaire des fragments à 20-30kb. Cette longueur d'ADN est facilement dénaturée durant les cycles thermiques pour une amplification à haute efficacité.

La méthylation globale de l'ADN est mesurée sur les tissus cérébraux et sur les cellules en culture par l'utilisation du Methylamp Global DNA Methylation Quantification Kit (Epigentek, Euromedex) (Wang et al., 2012). La fraction méthylée est reconnue par un anticorps 5-méthylcytosine et quantifiée par une réaction de type Elisa.

2. RT² Profiler PCR array

Fiches techniques 18 & 19

Le RNeasy® Plus mini kit est utilisé pour extraire les ARN à partir de cellules. Le RNeasy® Lipid Tissue Mini kit est utilisé pour extraire les ARN à partir de tissus riches en lipide comme le cerveau. Avec ces deux kits, tous les ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides sont isolés (les small ncRNA, les tARN et les rARN 5S, 5,8S sont exclus). L'analyse quantitative de l'expression des ARNm est réalisée sur un panel de 84 gènes associés aux

voies de la neurogenèse et des cellules souches neuronales - « Rat Neurogenesis and Neural Stem Cells » ou aux miRNAs let-7a et miR-34a (cibles validées expérimentalement ou prédites par bioinformatique) – « Rat microRNA targets » par l'utilisation de plaques 96 puits RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen). Les échantillons sont testés en triplicats sur des plaques indépendantes. Selon les indications du fournisseur, l'ARN est reverse-transcrit en utilisant le RT² First Strand Kit® dans un iCycler (Bio-Rad). Les « RT² Assays primer qPCR » correspondent à des amorces pour PCR quantitative expérimentalement testées et optimisées, préalablement fixées dans une plaque 96 puits contenant 84 gènes d'intérêt, 5 gènes de référence, 1 puits de contrôle de contamination par l'ADNg et des contrôles d'efficacité (3 de RT / 3 de PCR). La réaction se déroule dans un Step One Plus Real-Time PCR System (Applied biosystems). L'analyse des 84 gènes est réalisée sur le logiciel « SABiosciences PCR Array Data Analysis Template ».

3. qRT-PCR SYBR-Green

Fiches techniques 18 & 20

Les ARNs totaux sont extraits à l'aide du RNeasy® Plus Mini kit ou du RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). La RT est réalisée en utilisant le Quantitect® Reverse Transcription Kit sur un iCycler (Bio-Rad) et est optimisée pour 10pg à 1µg d'ARN. La PCR est effectuée sur un Step One Plus Real-Time PCR System (Applied biosystems) à l'aide du kit Quantitect™ SYBR® Green PCR pour amplifier, à l'aide d'amorces spécifiques, les fragments d'ADNc de l'ARN d'intérêt. L'amplification des ADNc est réalisée à l'aide de primers spécifiques (sens / anti-sens) pour Stat3 (GAAGAGTGCCTTCGTGGT/AGCAACCTGACTTTTTGTGG), AMPAR1 (CGAGTTCTGCTACAAATCCCG/TGTCCGTATGGCTTCATTGATG) AMPAR2 (AAAGAATACCCTGGAGCACAC/CCAAACAATCTCCTGCATTTCC), NMDAR1 (CAGCCGTGAACGTGTGGAG/TGCTCTACCACTCTTTCTATCC) et NMDAR2A (CAGTGATGTGTATATTTTCAGAGCATGTTA/ ACACTCGTCTATTGCTGCAGGAA) et le standard interne pour la normalisation Pol II(GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC/GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG). La détection et la quantification des produits de PCR sont réalisées à l'aide d'une sonde ADN SYBR Green I. La quantité d'ADN polymérisée à chaque cycle est mesurée en temps réel grâce à un marqueur fluorescent. STAT3,

AMPA1, AMPAR2 et NMDAR1 sont amplifiés à 56°C, NMDAR2A à 50°C et Pol II à la température du gène testé. L'analyse des données est réalisée à l'aide du logiciel fourni par le fournisseur (Step One Plus, Applied Biosystems).

4. qRT-PCR Taqman

Fiche technique 21

Les ARNs totaux sont extraits de mésencéphales d'embryons ou d'hippocampes de rats J21 et de cellules H19-7 (10^2 à 10^7) en utilisant le miRVana® miRNA Isolation kit (Applied biosystems) (Kerek et al., 2013). Le kit a été conçu pour la purification conservant les ARN non codants de petites tailles, comme les miRNAs lors de l'extraction des ARN totaux. Aucune étape de concentration n'est nécessaire pour l'étude de l'expression des microARNs par miRNAs array.

Fiche technique 22

Une PCR en temps-réel en deux temps est utilisée pour l'analyse de l'expression des microARNs. La rétrotranscription des miARNs est réalisée avec le Taqman® MicroRNA Reverse Transcription kit de Life technologies sur un iCycler (Bio-Rad). Le protocole permet la reverse-transcription spécifique des miARNs grâce à des sondes optimisées pour les ARNs de petite taille : rno-miR-124, rno-let-7a, rno-miR-34a, rno-miR-9, rno-miR-23a, rno-miR132, rno-miR-137 et snoRNA-U6 (4427975, Life Technologies). L'amplification des ADNc cibles avec le kit Taqman® Micro RNA Assay se caractérise par une quantification hautement sensitive (jusqu'à 1 à 10 ng d'ARNs) et spécifique (discrimination à une base près). La quantité d'ADN polymérisée à chaque cycle est mesurée en temps réel grâce au signal fluorescent générés par clivage des sondes Taqman sur le Step One Plus (Applied biosystems). Le TaqMan miRNA assay correspondant aux primers séquence-spécifique (5'-3') de chacun des miRNA (miR-124a : UAAGGCACGCGGUGAAUGCC/ let-7a : UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU / miR-34a :UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU / miR-9 :UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA / miR-23 : AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC / miR-132 : ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU/ miR-137 :UUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAG) ou du snoRNA-

U6 (CACGAATTTGCGTGTGCATCCTT) utilisé comme control interne pour la normalisation.

5. Hybridation in situ des miRNAs

Fiches techniques 23

La détection par hybridation in situ des microARNs est réalisée sur tissus et sur cellules H19-7 par une technique de locked nucleic acid (LNA)-oligo in situ hybridization (Kloosterman et al., 2006). La technique permet l'observation des miRs par complémentarité de séquence grâce à l'utilisation de sondes spécifiques, marquées en 3' et 5' par une molécule de digoxygénine (DIG), et une sonde contrôle spécifique du SnoRNP U6 marquée uniquement en 5'. Le marquage est mis en évidence par un anticorps I^{aire} anti-DIG puis reconnu par un anticorps II^{aire} spécifique du premier et conjugué à un fluorochrome. Le tampon d'hybridation est mélangé aux sondes spécifiques (LNA-modified et digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotide, Exiqon) des séquences de miR-124a :GGCATTCACCGCGTGCCTTA / let-7a : AACTATAACAACCTACTACCTCA / miR-34a : ACAACCAGCTAAGACACTGCCA / miR-9 : TCATACAGCTAGATAACCAAAGA / miR-23 : GGAAATCCCTGGCAATGTGAT / miR-137 :CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA) ou snoRNA-U6B (CACGAATTTGCGTGTGCATCCTT) utilisé comme contrôle pour chacune des expériences. Les échantillons sont ensuite incubés avec un anticorps anti-DIG (1/500, Roche Applied Science) et l'immunoréactivité est évaluée à l'aide d'un anticorps secondaire adapté conjugué AlexaFluor (1/2000, Molecular Probes).

V. Etudes de l'expression protéique

1. Western Blot

Fiches techniques 24 & 25, annexe I

Après extraction des protéines au tampon RIPA, l'analyse en western blot est réalisée en utilisant la procédure standard avec luminescence par le système ECL (Bio-Rad) (Akchiche et

al., 2010). Des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêts sont mis en contact avec les échantillons. La Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase est utilisée comme standard interne. Les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la horseradish peroxydase (HRP) correspondant. Les kinases Src, JNK, p38, ERK1/2 et Akt phosphorylés régulent l'activité de STAT3, qui en réponse, pourra agir sur des cibles comme Bcl-2 ou comme facteur de transcription sur d'autres cibles comme Bcl-xl. Son absence favoriserait l'apoptose par l'intermédiaire de protéines telles que Bax ou les caspase-clivées. Trim 71 et la voie Notch sont également associées à la prolifération. La fixation de Dll1 sur le récepteur Notch favorise l'expression du facteur de transcription Hes1. Il favorise la prolifération en réprimant Mash1 dont l'action permet l'expression des gènes de la différenciation. Src et PKA phosphorylées sont également impliquées dans la régulation des récepteurs AMPA/NMDA, ainsi que PKA. La régulation des récepteurs module l'expression du facteur de transcription CREB, qui intervient dans les mécanismes de la plasticité synaptique.

2. Immunochimie

Fiche technique 26, annexe I

Les échantillons sont traités selon le protocole utilisé au laboratoire (Kerek et al., 2013, Akchiche et al., 2012). Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués et les échantillons sont incubés avec un anticorps dirigé contre l'une des protéines d'intérêt. L'immunoréactivité est réalisée en incubant l'anticorps secondaire anti-IgG conjugué à l'AlexaFluor adapté. Les contrôles sont réalisés en l'absence d'anticorps primaire. La visualisation de la fluorescence, l'acquisition des images (grossissement x20 et x60) et le comptage cellulaire dans des champs sélectionnés aléatoirement sont réalisés avec un microscope BX51WI (Olympus) couplé à une caméra ProgRes MF coll (Jenoptik) ou avec un microscope confocal (Nikon Instruments Ti) et analysés à l'aide du « Cell® Software ».

3. Duolink

Fiche technique 27

Cette technique permet de détecter, visualiser et quantifier des protéines individuelles, des modifications post-traductionnelles ou des interactions protéiques dans des échantillons cellulaires et tissulaires. Les réactifs Duolink sont basés sur le PLA[®] (Proximity Ligation Assay). Lorsque les sondes PLA sont à proximité (28Å), leurs brins d'ADN peuvent interagir et se lier grâce à un ajout ultérieur d'oligonucléotides et d'une ligase. Ils sont ensuite amplifiés plusieurs centaines de fois à l'aide d'une polymérase. L'ajout de sondes oligonucléotidiques complémentaires fluorescentes met en évidence le produit final. Le signal de chaque paire de sondes PLA détectées est visualisé comme un spot fluorescent individuel.

VI. Etudes comportementales

Pour des raisons d'homogénéité les tests sont réalisés entre 8h et 11h du matin.

1. Righting reflex

Fiche technique 28

La fonction motrice et la coordination des mouvements des rats sont évaluées par le test de « righting reflex ». Il met en jeu la fonction motrice sur la commande des muscles nécessaires à l'opération de retournement ainsi que la coordination des mouvements entre « l'avant-main » et « l'arrière main » des individus. Ce test se base sur le malaise de position des individus retournés et reposés dorsalement, ce qui engendre un réflexe de retournement afin de retrouver une position naturelle et préférée (position quadrupède) (Schroeder et al., 1995). De façon physiologique, ce réflexe de retournement s'acquiert au cours des premiers jours après la naissance et le test ne s'effectue donc plus après la première semaine. Le temps nécessaire pour reprendre une position quadrupède est mesuré.

2. Negative geotaxis

Fiche technique 29

La fonction motrice et la coordination des mouvements des rats sont également évaluées par le test de « negative geotaxis ». Il met en jeu la fonction motrice sur la commande des muscles des membres nécessaires à l'opération de retournement ainsi que la coordination des mouvements entre les quatre membres des individus. Ce test se base sur le malaise de position des individus positionnés la tête en bas sur un plan incliné, ce qui engendre un réflexe de retournement afin de retrouver une position naturelle et préférée (position « tête en haut ») (Schroeder et al., 1995). De façon physiologique, ce réflexe de retournement s'acquiert avant le sevrage (au cours de la deuxième semaine après la naissance chez les rongeurs), mais le test peut être effectué à tout moment de la vie. Le temps nécessaire pour reprendre une position « tête en haut » sur le plan incliné (alignement du museau jusqu'au bas du dos) est mesuré.

3. Homing

Fiche technique 30

Les capacités d'apprentissage et de mémoire olfactivo-hippocampo-dépendantes chez les jeunes individus avant le sevrage sont évaluées par le test de « homing ». Il est basé sur les aptitudes des individus à reconnaître et suivre les informations environnementales afin de retrouver leur environnement maternel habituel. Le parcours est caractérisé par un couloir de progression composé d'un labyrinthe en T (Slamberová et al., 2006) dont l'une des extrémités contient de la litière propre, tandis que la seconde contient de la litière provenant de la cage de la mère. Ce test est généralement effectué pendant la phase d'allaitement à partir du moment où l'activité exploratoire des individus commence à se développer (à partir de 5 jours post-nataux). Les paramètres enregistrés sont la latence d'entrée dans le compartiment contenant la litière connue (entrée avec les quatre pattes dans le compartiment) et le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans le bras contenant la litière fraîche ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »). Le test est un succès lorsque les rats rejoignent la litière maternelle sans visiter la litière propre et sans revenir dans la zone de départ.

4. Labyrinthe multi-T

Fiche technique 31

Les capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes sont également évaluées par le test de labyrinthe multi-T. Il est basé sur les aptitudes des individus à mémoriser un parcours dans lequel ils naviguent en fonction de repères environnementaux (non contrôlés par l'expérimentateur). A l'une des extrémités, la zone de départ est déterminée alors qu'à l'autre extrémité, la zone d'arrivée ou de « sortie » est définie. Le parcours définit un tracé « idéal » et des accès en « cul-de-sac ». Ce test peut être effectué à tous les âges à partir du moment où l'activité exploratoire des individus est bien développée (en général légèrement avant le sevrage chez les rongeurs). Les paramètres enregistrés sont le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière ») et la latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée). Par la suite, un test de réutilisation de l'acquisition dit « test de mémoire » peut être réalisé, par un seul passage dans le même dispositif, chaque mois. Le test est un succès lorsque les rats rejoignent la sortie sans visiter de voies sans issue et sans revenir en arrière.

VII. Etude statistique

Les résultats sont analysés avec le StatView 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley). Ils sont comparés par l'utilisation d'un test de variance (ANOVA) couplé à un test de Fisher. Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées comme indiquant une significativité statistique.

RESULTATS

1^{ère} partie : Une carence gestationnelle en donneurs de groupements méthyles peut induire des défauts cérébraux persistants en réduisant la signalisation STAT3 ciblée par miR-124.

Objectif de l'étude

La carence en donneurs de groupements méthyles affecte les réactions de trans-méthylation à l'origine de perturbations des mécanismes épigénétiques et épigénomiques. En période gestationnelle, elle contribue à la survenue de défauts du développement cérébral, avec notamment des défauts de fermeture du tube neural (FTN), comme le spina bifida. Dans ce contexte, notre étude porte sur les conséquences d'une carence sur le développement cérébral embryonnaire chez le rat.

Le développement cérébral est un processus particulièrement complexe ; il nécessite l'expression spatio-temporelle appropriée de gènes spécifiques, dont la régulation peut être affectée par une carence en B9 et B12. Nous avons réalisé une étude préliminaire par microarray (Rat Neurogenesis and Neural Stem Cell PCR Array, RT² Profiler™ PCR Array, SABiosciences, Qiagen) afin d'évaluer les variations d'expression potentielles de 84 gènes qui participent à la neurogenèse et à la différenciation cellulaire, dans les progéniteurs neuronaux hippocampiques H19-7 ainsi que dans les embryons de rats carencés en donneurs de méthyles. Parmi ces multiples gènes, il est apparu que « Signal Transducer and Activator of Transcription 3 » (STAT3) est fortement réprimé en conditions de carence dans les deux modèles d'étude.

La voie STAT3 est une voie de signalisation qui permet de moduler les phénomènes de prolifération, apoptose et survie cellulaire. STAT3 peut agir par action directe sur certaines protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou par son activité de facteur de transcription en modulant l'expression d'autres protéines favorables à la survie telle que Bcl-xl. La régulation de STAT3 par phosphorylations nécessite l'action d'une cascade de protéines kinases en amont, dont l'état de phosphorylation définit l'activité. En plus de ces facteurs activateurs, il est question depuis quelques années, de nouvelles molécules régulatrices correspondant aux miRs, qui

exercent leur action répressive au niveau post-transcriptionnel. Ces petits ARNs non-codants, dont l'expression est finement régulée, sont fortement impliqués dans la régulation d'un très grand nombre de processus biologiques en modulant la traduction et/ou la dégradation de leurs ARN messagers cibles.

Parmi ces miRs, miR-124a est connu pour participer à la régulation de la neurogenèse où il est nécessaire à l'acquisition d'un phénotype neuronal par les progéniteurs lors de l'induction de la différenciation. Son expression est augmentée au cours du développement puis persiste à un niveau basal pour assurer le maintien de l'identité neurale. Il est préférentiellement exprimé dans le cortex et l'hippocampe. S'il est exprimé prématurément, il perturbe la voie de signalisation STAT3 et le processus de neurogenèse. MiR-124 est désigné comme régulateur de STAT3 en modifiant sa phosphorylation et en ciblant la région 3'UTR du gène pour en inhiber l'expression.

Notre travail avait pour objectif d'évaluer les conséquences d'une carence en donneur de méthyles sur la voie de signalisation STAT3 et sur son régulateur post-transcriptionnel miR-124a.

Synthèse des résultats

L'étude morphométrique des embryons issus de mères carencées met en évidence un retard de croissance intra-utérin, confirmé par l'étude de la taille des fémurs. Le déficit global s'accompagne d'un retard de croissance des organes, en particulier du cerveau. La diminution du volume cérébral est associée à une atrophie de plusieurs couches intra-cérébrales, telles que la zone subventriculaire (SVZ) possédant des propriétés neurogéniques, la couche pyramidale CA1 de l'hippocampe et la couche des cellules granulaires du gyrus denté (GD). Cette atrophie persiste après un retour à une alimentation normale à la suite du sevrage (21^{ème} jour post-natal, J21) et s'observe jusqu'à 450 jours post-natals, ce qui privilégie un défaut du développement plus qu'un simple retard de croissance.

Suite à l'analyse en microarray, l'étude en qPCR de l'expression de l'ARNm de STAT3 confirme sa répression en condition de carence chez les embryons au stade E20. L'étude en Western-blot révèle une diminution de l'expression de la protéine STAT3 totale dans le

mésencéphale et le cortex frontal des individus, qui s'accompagne d'une diminution de ses formes phosphorylées sur la Tyr705 et la Ser727. Ces données sont confirmées par immunohistochimie ainsi qu'en immunocytochimie sur les cellules H19-7 déplétées en folates et différenciées 6h ou 13h, avec la mise en évidence d'une diminution de la localisation nucléaire de la protéine en microscopie confocale.

La diminution de l'activation de STAT3 s'explique par une variation d'expression, dans les deux modèles expérimentaux, des formes phosphorylées des kinases impliquées dans la voie : Phospho-Erk1/2, phospho-Src et phospho-p38 sont significativement diminuées ; cependant phospho-JNK est augmentée alors que phospho-Akt reste inchangée.

La répression de la voie STAT3 induit une réduction de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Caspase-3 clivée, que ce soit dans le cortex et le mésencéphale. De plus, le nombre de cellules positives au test TUNEL (marqueur d'apoptose) dans l'hippocampe, la SVZ et le cortex est significativement augmenté, ce qui est confirmé par les niveaux de Caspase-3 et Caspase-9 clivées. Les résultats sont similaires dans les cellules H19-7 différenciées qui présentent un taux de viabilité plus faible en condition de carence, une perte du potentiel membranaire mitochondrial et une augmentation du pourcentage de cellules en apoptose.

En condition de carence, l'étude en TaqMan RT-qPCR montre une augmentation de l'expression de miR-124a dans le mésencéphale des embryons et dans les progéniteurs après 13h de différenciation. Ces résultats sont confirmés par hybridation in situ sur les cellules différenciées in vitro, et in vivo sur l'hippocampe, le cortex et la SVZ des embryons E20.

Le rôle de miR-124a dans les altérations observées a été validé par l'utilisation de siRNA anti-miR124a. L'administration des siRNA aboutit à une restauration de l'ensemble de la voie Stat3 et à une diminution du nombre de cellules TUNEL-positives. Enfin, tandis que l'augmentation d'expression de miR-124a associée à la carence affecte la morphologie des progéniteurs différenciés, qui présentent une forte réduction du nombre et de la taille des prolongements neuraux, l'inhibition de miR-124a par siRNA permet une amélioration morphologique des cellules, notamment en ce qui concerne le nombre et la taille des neurites.

Conclusion

La carence est associée à une augmentation d'expression de miR-124a responsable d'une inhibition de la voie STAT3. L'augmentation de miR-124a en condition de carence conduit à une répression des formes phosphorylées de STAT3, par inhibition de la phosphorylation de ses kinases activatrices. L'augmentation d'expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Caspase-3 clivée et Caspase-9 clivée qui accompagne la diminution d'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-xl aboutit à un déséquilibre de la balance survie/apoptose qui semble contribuer à la survenue des défauts de mise en place du système nerveux central observés en condition de carence.

1ère publication

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

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

*/[#] : contribution égale des auteurs

Cell Death Dis. 2013 Aug 8;4: e755. doi: 10.1038/cddis.2013.278

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

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

The methyl donors folate (vitamin B9) and vitamin B12 are centrepieces of the one-carbon metabolism that has a key role in transmethylation reactions, and thus in epigenetic and epigenomic regulations. Low dietary intakes of folate and vitamin B12 are frequent, especially in pregnant women and in the elderly, and deficiency constitutes a risk factor for various diseases, including neurological and developmental disorders. In this respect, both vitamins are essential for normal brain development, and have a role in neuroplasticity and in the maintenance of neuronal integrity. The consequences of a methyl donor deficiency (MDD) were studied both *in vivo* in rats exposed *in utero*, and *in vitro* in hippocampal progenitors (H19-7 cell line). Deficiency was associated with growth retardation at embryonic day 20 (E20) and postnatally with long-term brain defects in selective areas. mRNA and protein levels of the transcription factor Stat3 were found to be decreased in the brains of deprived fetuses and in differentiating progenitors (62 and 48% for total Stat3 protein, respectively), along with a strong reduction in its phosphorylation at both Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷ residues. Vitamin shortage also affected upstream kinases of Stat3 signaling pathway (phospho-Erk1/2, phospho-Src, phospho-JNK, and phospho-p38) as well as downstream target gene products (Bcl-2 and Bcl-xL), thus promoting apoptosis. Conversely, the expression of the Stat3 regulator miR-124 was upregulated in deficiency conditions ($\geq 65\%$), and its silencing by using siRNA partly restored Stat3 signaling in hippocampal neurons by increasing specifically the phosphorylation of Erk1/2 and Src kinases. Furthermore, miR-124 siRNA improved the phenotype of deprived cells, with enhanced neurite outgrowth. Taken together, our data suggest that downregulation of Stat3 signaling by miR-124 would be a key factor in the deleterious effects of MDD on brain development.

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

Subject Category: Neuroscience

The link between diet during pregnancy and infant development has been largely documented, and was associated with long-term effects on health.^{1–3} The prevalence of folate (vitamin B9) and/or cobalamin (vitamin B12) deficiency in pregnant women is relatively high, especially in some communities.^{4,5} The one-carbon metabolism is essential for DNA biosynthesis and methylation reactions, and thus has a key role in epigenetic and epigenomic regulations.⁶ The conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to tetrahydrofolate in the folate cycle provides the methyl group required to convert the sulphur-containing amino acid homocysteine to methionine. Vitamin B12 acts as a cofactor for methionine synthase, which catalyzes this reaction.⁷ Methionine is the precursor of S-adenosylmethionine (SAM), the universal substrate of transmethylation reactions, which is then

demethylated to form S-adenosylhomocysteine (SAH). Thereafter, homocysteine is generated from the hydrolysis of SAH. The shared metabolism between folate and vitamin B12 suggests that deficiencies in one vitamin may alter the metabolism of the other. Deficiency of either folate, vitamin B12 or both vitamins can lead to various adverse consequences, including elevated blood homocysteine, intrauterine growth retardation, congenital heart defects and Down's syndrome.^{8,9} Importantly, folate and vitamin B12 are essential for normal brain development, and both reduced folate and vitamin B12 status are risk factors for developmental disorders such as neural tube defects that can originate at various times during gestation.¹⁰ In addition, a large body of evidence has linked deficiencies in maternal folate and/or vitamin B12 with infant cognitive development.^{8,9}

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

*Corresponding author: J-L Daval, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54500, France. Tel: +33 3 83 68 32 82; Fax: +33 3 83 68 32 79; E-mail: jean-luc.daval@inserm.fr

⁴These authors contributed equally to this work.

⁵These authors contributed equally to this work.

Keywords: folate; vitamin B12; Stat3; miR-124; epigenetics; brain development

Abbreviations: Dapi, 4,6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; E, embryonic day; Erk, extracellular signal-regulated kinase; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP, mitogen-activated protein; MDD, methyl donor deficiency; PN, postnatal day; RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-adenosylmethionine; siRNA, small interfering RNA; Stat3, signal transducer and activator of transcription 3; SVZ, subventricular zone; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Received 19.4.13; revised 25.6.13; accepted 02.7.13; Edited by E Candi

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

Embryofetal brain development is a very complex process, requiring the temporal expression of specific gene sets with a number of precisely orchestrated steps.²⁰ To determine how genetic regulation of factors related to neural development might account for brain defects associated with folate/vitamin B12 depletion, we used a microarray approach (Rat Neurogenesis and Neural Stem Cell PCR Array, RT² Profiler PCR Array, SABiosciences, Qiagen SA, Courtaboeuf, France) that profiled the expression of 84 genes related to neurogenesis and cell differentiation in hippocampal neuroprogenitors issued from the rat H19-7 hippocampal embryonic cell line and in the brain of rat pups subjected to early methyl donor deficiency (MDD) (unpublished observations). As signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) emerged as one gene highly downregulated upon vitamin B deficiency, we further investigated its participation in the consequences of MDD both *in vivo* on a validated rat model of maternal deficiency^{12,17} and *in vitro* in hippocampal progenitors.¹⁴

Primarily associated with cytokine- and growth factor-related signals, Stat3 is activated through phosphorylation, and regulates the transcription of target genes that participate in a number of physiological responses.²¹ Indeed, Stat3 has been repeatedly involved in fundamental biological processes, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis and survival,^{22,23} and has been shown to be implicated in various developmental events, such as motor neuron pathfinding and guidance²⁴ and neurite outgrowth.²⁵ Here, we provide the first evidence that early MDD causes loss of Stat3 signaling related to overexpression of miR-124, with impairment of cerebral development.

Results

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

Gestational MDD alters rat pup morphometric properties and brain characteristics. As shown by Figure 1, both body weight and body length were significantly reduced (–20.5% and –15%, respectively) during late gestation (embryonic day 20, E20) in rat fetuses from dams fed the deficient diet, suggesting the occurrence of intrauterine growth retardation. This was confirmed by the noticeable reduction in the femur length (–14%). Whereas brain weight

was also affected (–14.6%), the thickness of selective brain layers such as the hippocampal CA1 pyramidal layer, the granular cell layer of the dentate gyrus and the neurogenic subventricular zone (SVZ) were more dramatically decreased (–40, –22 and –26%, respectively). Most interestingly, these brain areas remained atrophied as late as the age of 450 days, although rat pups had exclusively received a standard, non-deficient diet since their weaning (Figures 1e–h).

MDD decreases brain expression and phosphorylation of Stat3. When studied by quantitative RT-PCR analysis, mRNA levels of Stat3 were found to be significantly decreased in the brains of E20 fetuses subjected to MDD as compared with controls (–34%, Figure 2a). Consistently, western blot immunoactivities revealed a decreased expression of Stat3 total protein both in the midbrain (which includes hippocampus, thalamus, hypothalamus and striatum) and in the cerebral cortex, along with lowered amounts of the phosphorylated forms, that is, phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ and phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ (Figure 2b). Quantitative changes in protein levels are provided in Supplementary information (Supplementary Figure 1). According to our western blot analyses, total amounts of Stat3 protein were reduced by 62% in the midbrain of deprived fetuses. As illustrated by Figure 2c for phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵, such observations were confirmed *in situ* by immunohistochemistry in the cerebral cortex, the SVZ and the CA1 layer of the hippocampus.

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

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

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

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

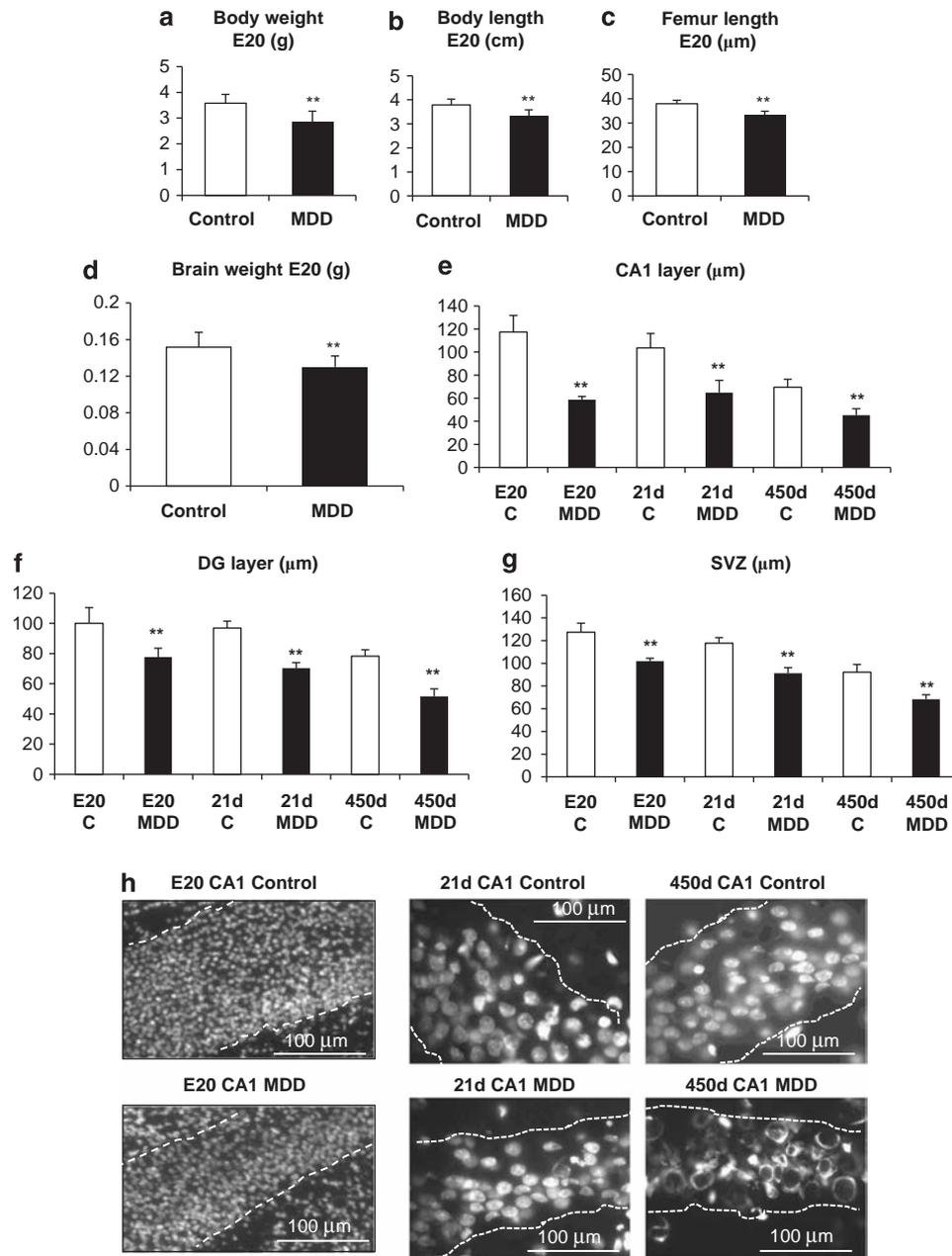


Figure 1 Effects of methyl donor deficiency on rat fetus morphometric properties. (a–d) General morphometric measurements in control and MDD fetuses at embryonic day (ED) 20, $33 \leq n \leq 37$. Data are reported as means \pm S.D. Statistically significant differences between control and MDD rats: **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

As expected, amounts of Bcl-2 and Bcl-xL were significantly decreased in the brain of E20 fetuses subjected to the deficient diet, whereas the expression levels of pro-apoptotic proteins Bax and cleaved caspase-3 were more elevated in both midbrain and cerebral cortex, cleaved caspase-9 being overexpressed in the midbrain only (Figure 5a). Quantitative changes in protein amounts are provided in Supplementary information (Supplementary Figure 2). Furthermore, the number of TUNEL-positive cells was dramatically increased

in the hippocampus, the SVZ and the cerebral cortex of deficient fetuses (Figure 5c, Supplementary Figure 3). This was confirmed by the labeling of active caspase-3 and caspase-9 in fetal brains, as illustrated in the CA1 hippocampal region and in the SVZ, with the presence of a high number of dead cells within the lateral ventricle (Supplementary Figure 3).

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

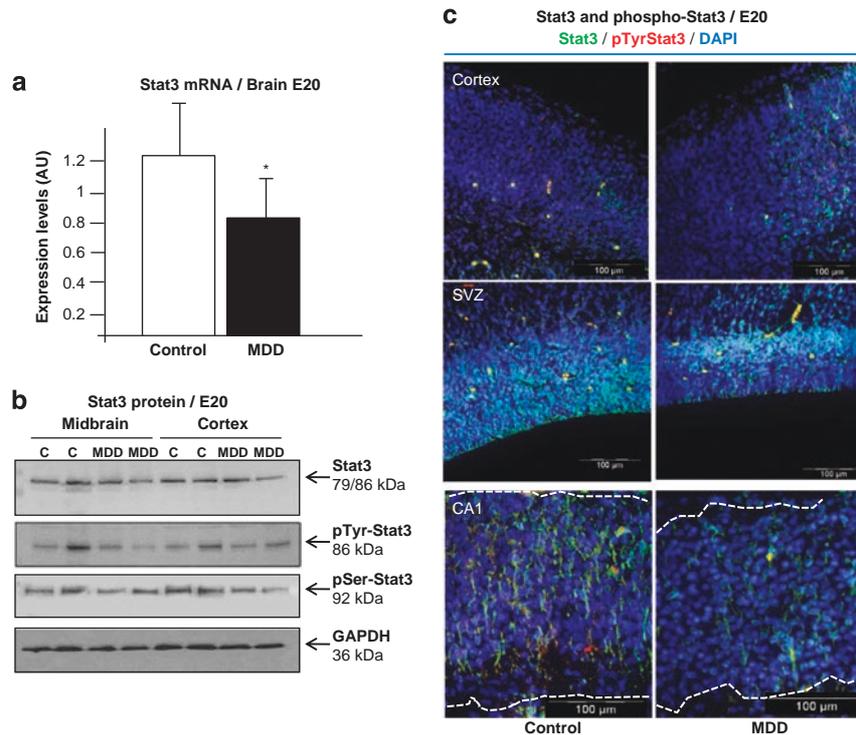


Figure 2 Effects of methyl donor deficiency on brain expression of Stat3 and phospho-Stat3 (Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷) in rat fetuses at E20. (a) Total Stat3 mRNA levels measured by real-time quantitative RT-PCR. Data are reported in arbitrary units (AU) as means \pm S.D. ($n=5$), * $P<0.05$. (b) Western blot analyses of protein expression levels of Stat3, phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ and phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ in the midbrain and the cerebral cortex from control (C) and MDD E20 fetuses. Similar profiles were obtained from five other experiments. (c) Immunohistochemical labeling of Stat3 and phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ in the cerebral cortex, SVZ and hippocampal CA1 layer from control and MDD E20 fetuses

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

Decreased Stat3 signaling is associated with increased brain expression of miR-124. As miR-124 has been reported to regulate Stat3 signaling by affecting Stat3 phosphorylation³¹ and by targeting the 3'-UTR of Stat3 gene so as to inhibit the expression of Stat3 protein,³² we subsequently investigated the consequences of an MDD on the expression of miR-124 in the brain of rat pups and in H19-7 cells.

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

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

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

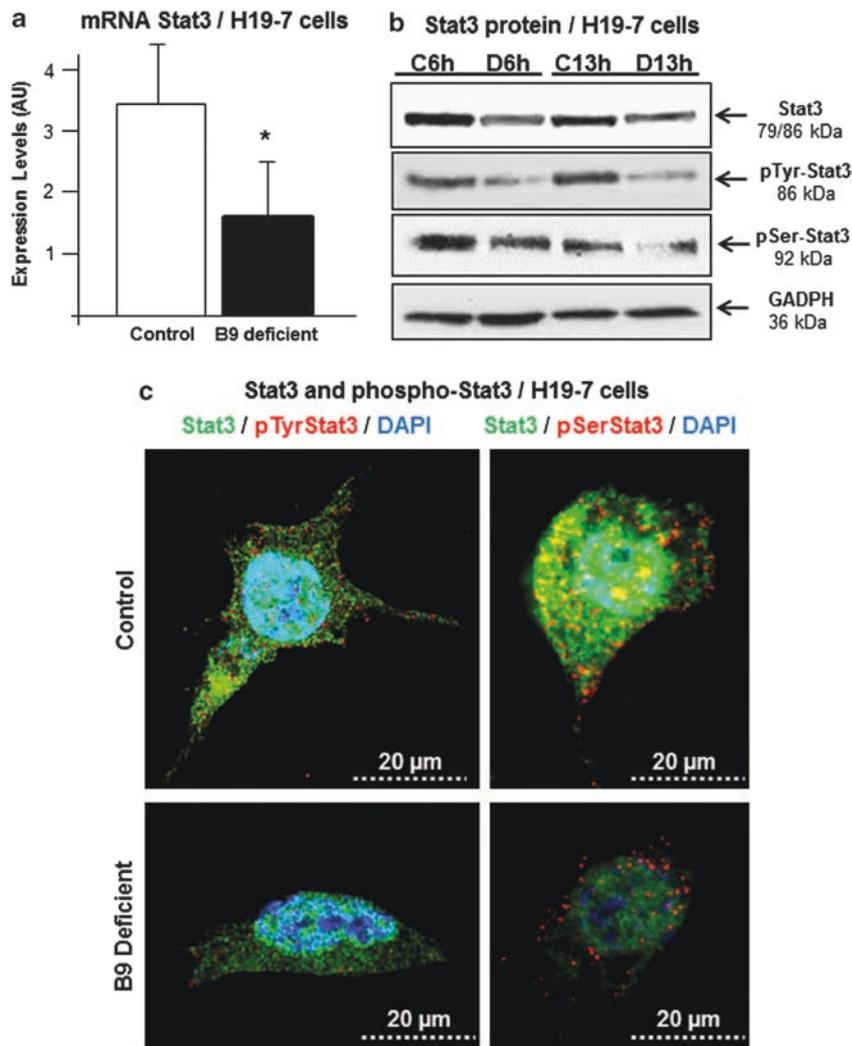


Figure 3 Effects of folate deficiency on the expression of Stat3 and phospho-Stat3 (Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷) in H19-7 hippocampal progenitor cells. (a) Total Stat3 mRNA levels measured by real-time quantitative RT-PCR in control and B9-deficient cells at 13 h after induction of their differentiation. Data are reported in AUs as means ± S.D. ($n = 5$), $*P < 0.05$. (b) Western blot analyses of protein expression levels of Stat3, phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ and phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 6 and 13 h after the induction of differentiation. Similar findings were obtained from five other experiments. (c) Immunocytochemical labeling of Stat3, phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ and phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ in control and B9-deficient H19-7 cells at 13 h after induction of their differentiation

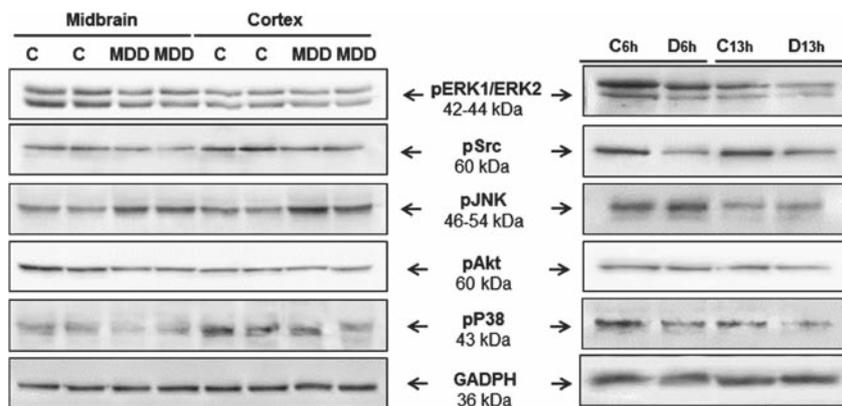


Figure 4 Western blot analyses of upstream phospho-kinases involved in Stat3 signaling pathways in the midbrain and cerebral cortex of control (C) and MDD E20 fetuses, and in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 6 and 13 h after the induction of their differentiation. Similar profiles were obtained from five other experiments

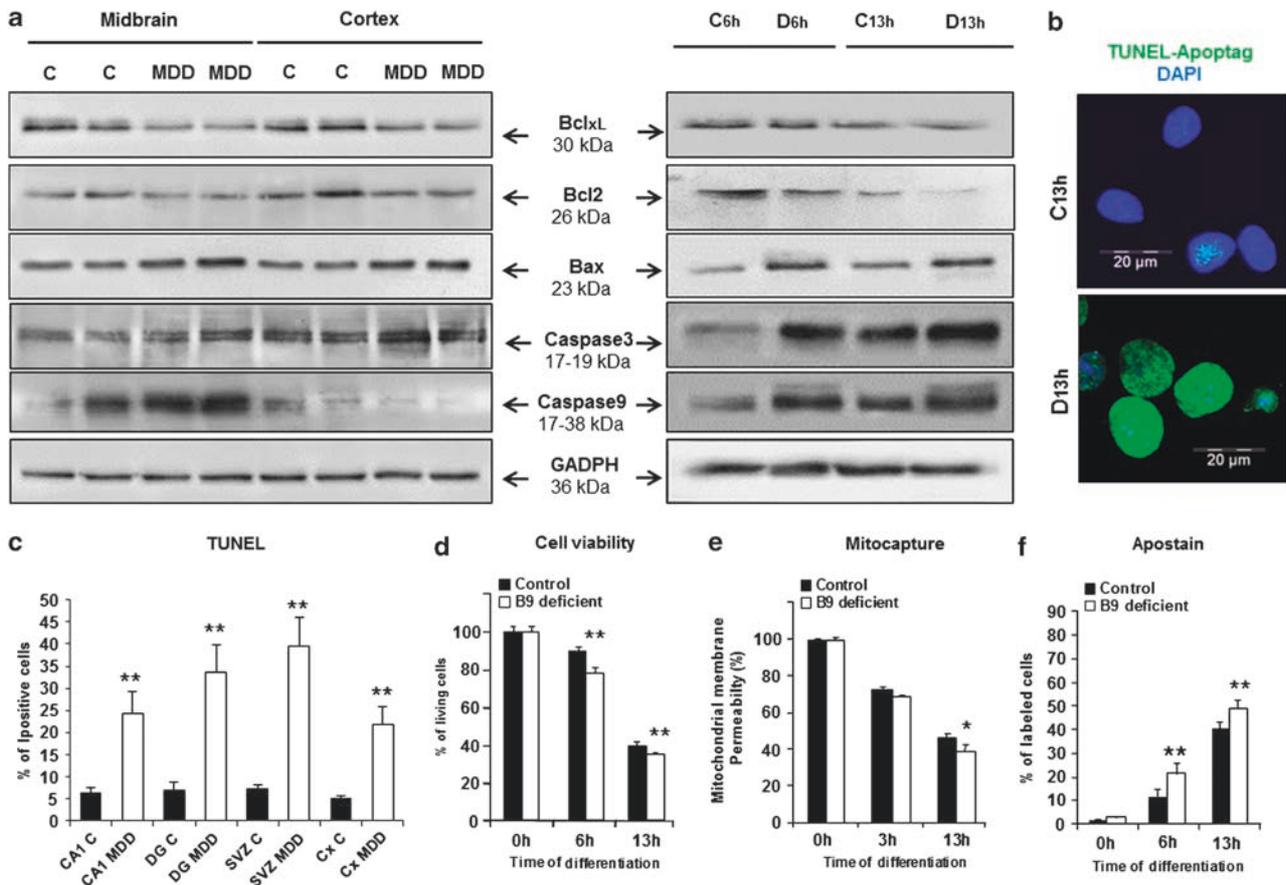


Figure 5 Effects of methyl donor deficiency on cell apoptosis and the key related proteins. (a) Western blot analyses of targets of Stat3 signaling (Bcl-xL and Bcl-2) and apoptosis-related proteins in the midbrain and cerebral cortex of control (C) and MDD E20 fetuses, and in control (C) and B9-deficient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

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

Discussion

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

The direct effects of MDD on the one-carbon metabolism and its various key factors in the animal model as well as the effects of folate deficiency in cultured H19-7 hippocampal progenitors have been extensively described in previous

reports.^{12,14,26} In particular, such treatments result in the accumulation of homocysteine, and in a decrease of the cellular index of methylation capacity corresponding to the SAM/SAH ratio. This is reflected in our study notably by a decrease in the amounts of methylated DNA in response to MDD in our two experimental models.

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

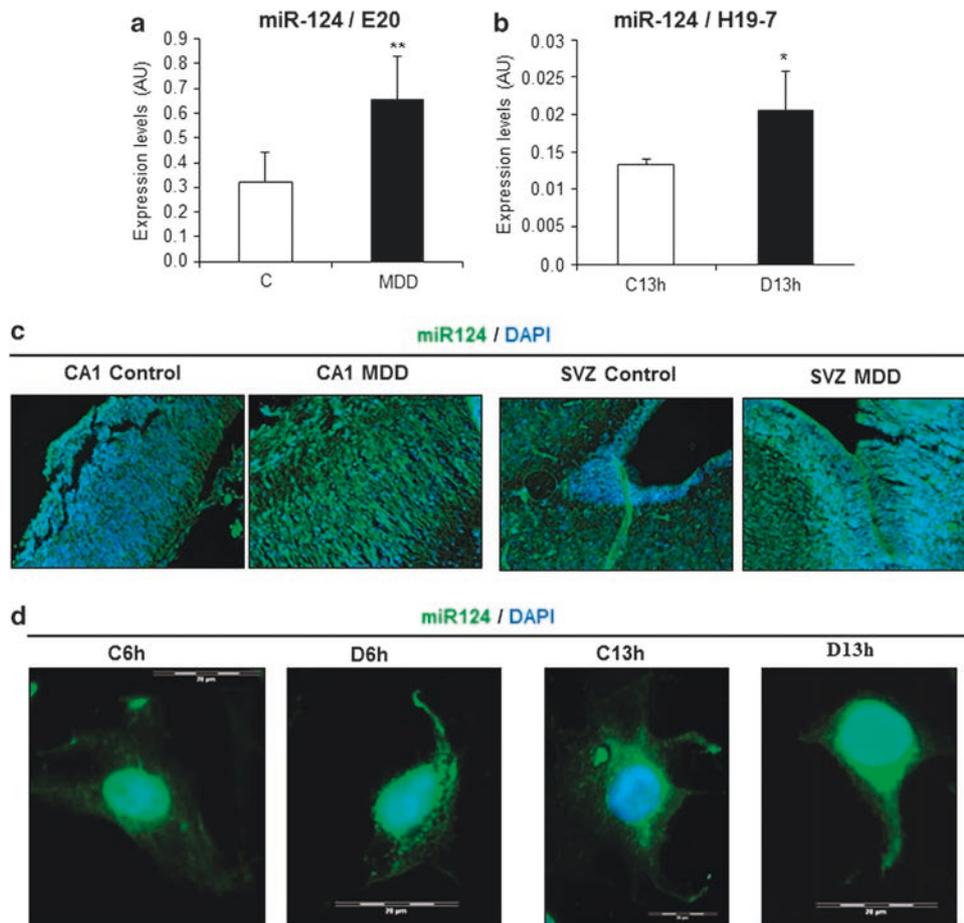


Figure 6 Effects of methyl donor deficiency on the expression of miR-124. (a) Expression levels of miR-124 in AU in the brains of control and deficient E20 fetuses. (b) Expression levels in control (C) and B9-deficient (D) H19-7 cells at 13 h after the induction of their differentiation. All data are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

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

While folate deprivation markedly affects proliferation, differentiation and viability of hippocampal progenitors *in vitro*, cell polarity, vesicular transport and synaptic plasticity were shown to be dramatically altered, with poor neurite outgrowth.¹⁴ The transcription factor Stat3 is known to strongly influence proliferation, survival, growth and differentiation of neuronal cells during brain development and in mature brain after injury.^{23,34–36} In rodents, Stat3 mRNA and protein are expressed continually from E14 to 3 months.

During postnatal development, Stat3 expression increases from postnatal day 3 (PN3) through PN21.²³ Stat3 acts on various target genes that participate in a variety of physiological processes, including apoptosis, survival and neurite outgrowth. It is activated by phosphorylation at two types of residues, that is, Tyr⁷⁰⁵ and Ser⁷²⁷, allowing homo- and/or heterodimerization, translocation into the nucleus and subsequent binding to sequence-specific DNA motifs. In addition, phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ has been recently reported to mediate nerve growth factor-induced neurite outgrowth by a transcription-independent mechanism.³⁷ Under MDD, the amounts of Stat3 mRNA, Stat3 and phospho-Stat3 proteins were dramatically decreased both *in vivo* in the fetal brain and *in vitro* in hippocampal progenitors, in which less protein amounts were observed in cell nuclei. Stat3 phosphorylation involves various important kinases, the activation of which being differentially affected by methyl donor deprivation. Growth factors such as epidermal growth factor and platelet-derived growth factor stimulate Stat tyrosine phosphorylation through their intrinsic receptor tyrosine kinase activity or by the non-receptor tyrosine kinases Src,³⁸ whereas serine phosphorylation occurs via MAP kinases and other serine

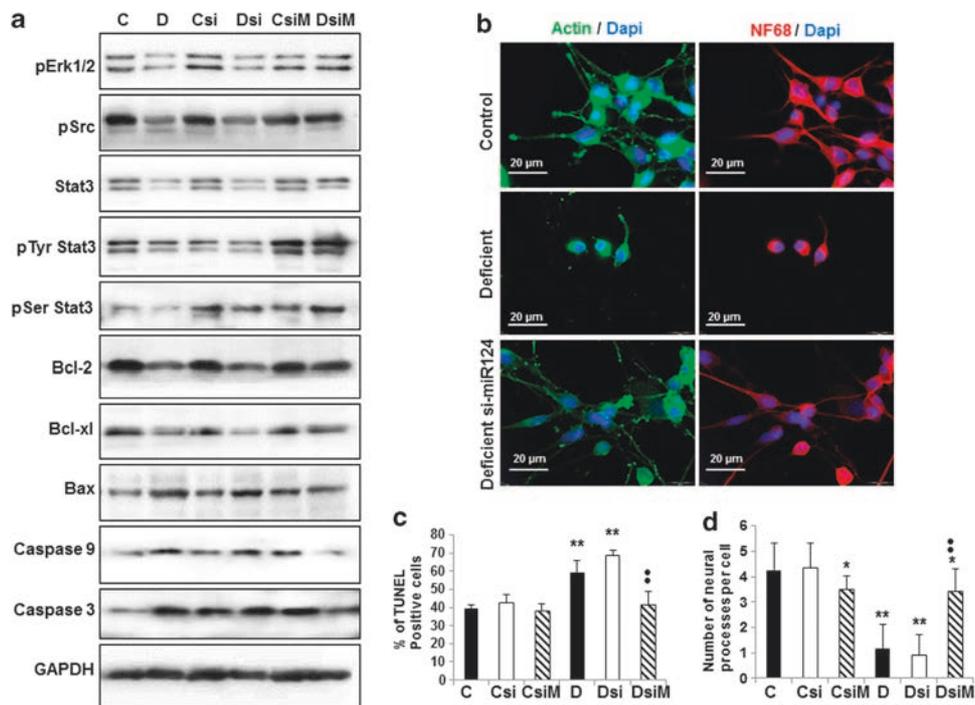


Figure 7 Effects of silencing miR-124 on differentiating H19-7 cells. (a) Effects of miR-124 siRNA on the expression levels of Stat3 and related proteins in control (C) and folate-deficient (D) cells at 13 h after induction of differentiation (si = non-targeting siRNA, siM = miR-124-targeted siRNA).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

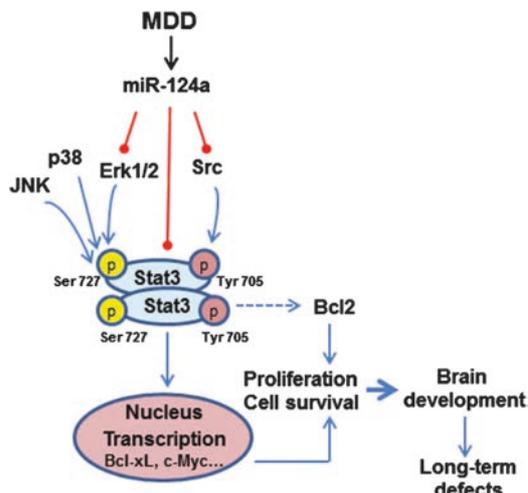


Figure 8 Summary of major events involved in the consequences of MDD in the rat brain. Please note that we provide the first evidence of a negative regulation by miR-124 on Src activity that accounts for phosphorylation of Stat3 at Tyr⁷⁰⁵ residue

kinases such as the serine-threonine kinase Akt.²⁸ In our models, phospho-Erk1/2, phospho-Src and phospho-p38 were repressed in conditions of MDD, suggesting their potential role in the pathophysiological consequences observed. Whereas Akt pathway did not appear to be

involved, the expression of phospho-JNK was increased, an observation consistent with the potential negative regulation of Stat3 by JNK.³⁹

MicroRNAs constitute an extensive class of small noncoding RNAs that control post-transcriptional gene expression. In this respect, Stat3 has been identified as a target of miR-124, the most abundant microRNA in the mammalian brain. The recent identification of a central role for miR-124 in neurogenesis⁴⁰ and synaptic plasticity⁴¹ integrates this microRNA into the full repertoire of neuronal events, particularly at both the developmental and functional aspects. miR-124 regulates Stat3 either by inhibiting its phosphorylation at Tyr⁷⁰⁵ residue by an unknown mechanism³¹ or, as demonstrated more recently, by targeting the 3'-UTR of *Stat3* gene so as to repress the expression of Stat3 protein.³² The expression levels of miR-124a were found to be obviously increased in brains of fetuses as well as in differentiating hippocampal neurons after exposure to MDD, suggesting a significant role for miR-124 on Stat3 signaling in response to folate and B12 deprivation. This conclusion was strengthened by our additional experiments using siRNA transfection. Indeed, silencing miR-124a by almost 90% in H19-7 progenitors appeared to restore Stat3-signaling pathway in folate-deficient cells by increasing specifically the phosphorylation of Erk1/2 and Src kinases. As mentioned above, Erk1/2 phosphorylates Stat3 at Ser⁷²⁷ residue, whereas Src phosphorylates Stat3 at Tyr⁷⁰⁵ residue, the phosphorylation at both residues being necessary for Stat3 activation and

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

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

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

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

Materials and Methods

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

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

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

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

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

The presence of apoptosis was selectively depicted by the Apostain method⁵¹ using monoclonal antibody to single-strand DNA (F7-26 from calf thymus ssDNA, AbCys SA, Paris, France) after DNA denaturation by heating in the presence of formamide, as described by Blaise *et al.*¹² and Akkiche *et al.*¹⁴ for tissue sections and cultured cells, respectively. Apoptosis was additionally monitored by using the ApoptTag Plus Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International, Millipore, Guyancourt, France) based on the TUNEL assay and which labels apoptotic cells by modifying genomic DNA utilizing terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT).

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

Immunohistochemistry. Cells cultured on poly-L-lysine-precoated glass coverslips were washed, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), as reported by Akkiche *et al.*¹⁴ Nonspecific binding sites were blocked in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin (BSA) and incubation was performed overnight with an antibody against one of the following proteins: Stat3 (rabbit monoclonal, 1/200, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France), phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ (mouse monoclonal, 1/100, Cell Signaling Technology), phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ (mouse monoclonal, 1/100, Enzo life sciences, Villeurbanne, France), actin (goat polyclonal, 1/200, Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), NF68 (rabbit polyclonal, 1/300, US Biological, Euromedex, Soufflweyersheim, France). After a washing step, immunoreactivity was assessed by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1 h at 25°C (1/1000, Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France). Control experiments were conducted by omitting the primary antibody. Immunofluorescence visualization, image acquisition ($\times 20$ and

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

Western blotting. Western blot analyses were performed using standard procedure with chemiluminescence using ECL system (Amersham Biosciences, Orsay, France), as previously detailed.⁴⁹ Antibodies against the following proteins were used: Stat3 (rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-Stat3 Tyr⁷⁰⁵ (mouse monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-Stat3 Ser⁷²⁷ (mouse monoclonal, 1/250, Enzo life sciences), Bcl-2 (goat polyclonal, 1/1000, Santa Cruz Biotechnology), Bcl-xL (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Bax (rabbit polyclonal, 1/1000, Santa Cruz Biotechnology), cleaved caspase-3, Asp¹⁷⁵ (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), cleaved caspase-9, Asp³⁵³ (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Src (rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), phospho-Src Family Tyr⁴¹⁶ (rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), p44/42 MAP kinase (Erk1/2, rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), phospho-p44/42 MAP kinase Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), Akt (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-Akt Ser⁴⁷³ (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-p38 MAP kinase Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² (rabbit monoclonal, 1/500, Cell Signaling Technology) and phospho-SAPK/JNK Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵ (rabbit monoclonal, 1/500, Cell Signaling Technology).

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

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

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

Analysis of miR-124 expression

TaqMan RT-qPCR. Two-step real-time PCR was used to analyze the expression of miR-124. In the first step, total RNA was reverse transcribed using miRNA-specific RT primers (mo-miR-124 and U6SnoRNA) and a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). miRNA expression was analyzed using Taqman microRNA assays (Applied Biosystems), according to the instructions of the manufacturer. The RT reaction was performed in 15 µl volume, containing 1 µg RNA sample, 3 µl primer and master mix adjusted to 15 µl/

reaction. Products of RT reaction (1.33 µl) were used in a real-time PCR reaction, which also included 10 µl of the TaqMan Universal Master Mix II, and 1 µl TaqMan miRNA assay containing the sequence-specific primers of either the target miRNA (5'-GGCATTACCGCGTGCCTTA-3') or the U6SnoRNA (5'-CACGAATTTGCGTGCATCCTT-3') used as an endogenous control for normalization. Real-time PCR was carried out on a Step One Plus LightCycler (Roche Applied Science). Incubations were performed in a 96-well plate at 95 °C for 10 min for enzyme activation, followed by 40 cycles of PCR: denaturation (95 °C for 15 s), and annealing/extending (60 °C for 2 min). Data analysis was performed with the software provided by the manufacturer (Step One Plus).

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

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

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

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

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

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

7. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; **157**(Suppl 2): S40–S44.
8. Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S101–S111.
9. Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S126–S131.
10. Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993; **86**: 703–708.
11. Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* 2004; **134**: 162–166.
12. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pouricé C, Guéant JL et al. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 2007; **170**: 667–679.
13. Battaglia-Hsu SF, Akkiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 21930–21935.
14. Akkiche N, Bossenmeyer-Pouricé C, Kerek R, Martin N, Pouricé G, Koziel V et al. Homocysteinylolation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J* 2012; **26**: 3980–3992.
15. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauthotte G, Arnold C, Gueant JL et al. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e553.
16. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 12474–12479.
17. Daval JL, Blaise S, Guéant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: E1.
18. Greene ND, Dunlevy LE, Copp AJ. Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. *Anat Embryol (Berl)* 2003; **206**: 185–191.
19. Burren KA, Savery D, Massa V, Kok RM, Scott JM, Blom HJ et al. Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 3675–3685.
20. Greene ND, Copp AJ. Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube. *Prenat Diagn* 2009; **29**: 303–311.
21. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; **109**: 1143–1148.
22. Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **13**: 211–217.
23. Dziennis S, Alkayed NJ. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 2008; **19**: 341–361.
24. Conway G. STAT3-dependent pathfinding and control of axonal branching and target selection. *Dev Biol* 2006; **296**: 119–136.
25. He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA et al. The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem* 2005; **280**: 33426–33434.
26. Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pouricé C et al. Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia in the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol* 2009; **216**: 231–238.
27. Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 2545–2552.
28. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 2000; **19**: 2628–2637.
29. Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA, Haque SJ. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 2002; **21**: 8404–8413.
30. Choi H J, Lee J H, Park S Y, Cho J H, Han J S. STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells. *Exp Mol Med* 2009; **41**: 94–101.
31. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 2006; **24**: 857–864.
32. Cai B, Li J, Wang J, Luo X, Ai J, Liu Y et al. microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. *Stem Cells* 2012; **30**: 1746–1755.
33. Molina V, Medici M, Taranto MP, Font de Valdez G. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr* 2008; **62**: 162–168.
34. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron* 2009; **64**: 61–78.
35. Cheng X, Jin G, Zhang X, Tian M, Zou L. Stage-dependent STAT3 activation is involved in the differentiation of rat hippocampus neural stem cells. *Neurosci Lett* 2011; **493**: 18–23.
36. Murase S, Kim E, Lin L, Hoffman DA, McKay RD. Loss of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling during elevated activity causes vulnerability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2012; **32**: 15511–15520.
37. Zhou L, Too HP. Mitochondrial localized STAT3 is involved in NGF induced neurite outgrowth. *PLoS One* 2011; **6**: e21680.
38. Zorina Y, Iyengar R, Bromberg KD. Cannabinoid 1 receptor and interleukin-6 receptor together induce integration of protein kinase and transcription factor signaling to trigger neurite outgrowth. *J Biol Chem* 2010; **285**: 1358–1370.
39. Lim CP, Cao X. Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31055–31061.
40. Åkerblom M, Sachdeva R, Barde I, Verp S, Gentner B, Trono D et al. MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *J Neurosci* 2012; **32**: 8879–8889.
41. Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveetil SV, Russo JJ et al. Characterization of small RNAs in aplasia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 2009; **63**: 803–817.
42. Yamane K, Jinnin M, Etoh T, Kobayashi Y, Shimozono N, Fukushima S et al. Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J Mol Med (Berl)* 2013; **91**: 69–81.
43. Wang LL, Zhang Z, Li Q, Yang R, Pei X, Xu Y et al. Ethanol exposure induces differential microRNA and target gene expression and teratogenic effects which can be suppressed by folic acid supplementation. *Hum Reprod* 2009; **24**: 562–579.
44. Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen YW, Boshnjaku V et al. Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* 2010; **285**: 36922–36932.
45. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res* 2006; **66**: 10843–10848.
46. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011; **278**: 1598–1609.
47. Wang P, Chen L, Zhang J, Chen H, Fan J, Wang K et al. Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* 2013; e-pub ahead of print 21 January 2013; doi:10.1038/ncr.2012.598.
48. Eves EM, Tucker MS, Roback JD, Downen M, Rosne MR, Wainer BH. Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4373–4377.
49. Akkiche N, Bossenmeyer-Pouricé C, Pouricé G, Koziel V, Nédélec E, Guéant JL et al. Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus* 2010; **20**: 949–961.
50. Wang Bx Yin BL, He B, Chen C, Zhao M, Zhang Wx et al. Overexpression of DNA damage-induced 45 alpha gene contributes to esophageal squamous cell cancer by promoter hypomethylation. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; **31**: 11.
51. Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 2001; **49**: 369–378.
52. Wallin J, Wiltling J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, Balling R. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 1994; **120**: 1109–1121.
53. Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 2006; **3**: 27–29.



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

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

Supplementary information

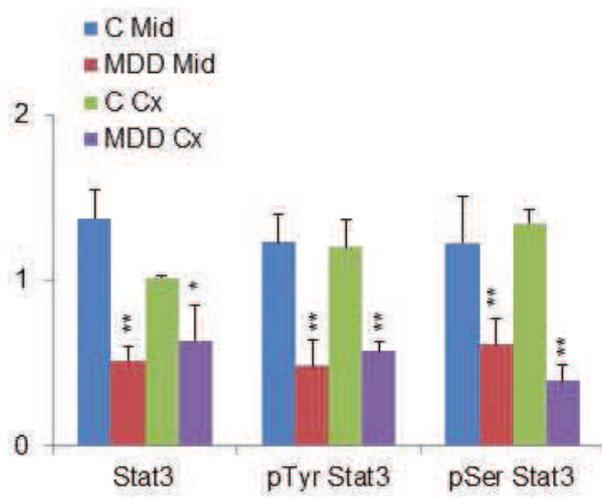
Supplementary Figure 1: Effects of methyl donor deficiency on the expression and phosphorylation of Stat3 **(a)** in brains of E20 fetuses and **(b)** in cultured H19-7 progenitors at 6h and 13h after induction of differentiation. Densitometric analyses correspond to Western blots shown in Figures 2 and 3, among others. All data are reported as means \pm sd in arbitrary units and were obtained from six separate experiments. Statistically significant differences between control (C) and methyl donor deficiency (MDD): * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Mid = midbrain, Cx = cortex.

Supplementary Figure 2: Effects of methyl donor deficiency on the expression of various key proteins **(a)** in brains of E20 fetuses and **(b)** in cultured H19-7 progenitors at 6h and 13h after induction of differentiation. Densitometric analyses correspond to Western blots shown in Figures 4 and 5, among others. All data are reported as means \pm sd in arbitrary units and were obtained from six separate experiments. Statistically significant differences between control (C) and methyl donor deficiency (MDD): * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Mid = midbrain, Cx = cortex.

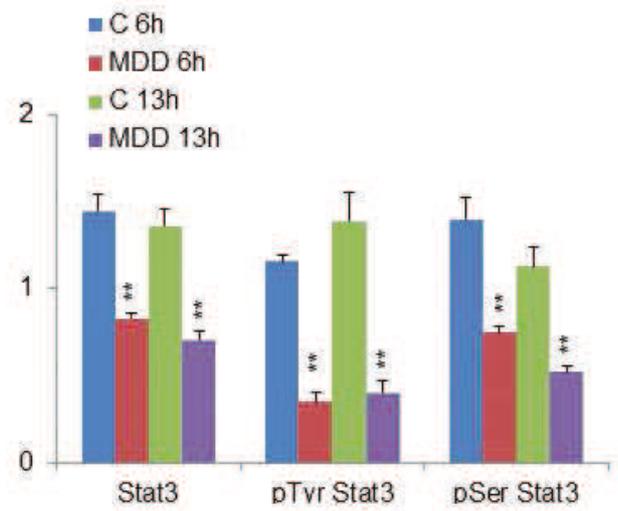
Supplementary Figure 3: Upper panel: Effects of methyl donor deficiency (MDD) on the immunostaining of active caspase-3 and caspase-9 in the CA1 pyramidal cell layer and subventricular zone (SVZ) from E20 rat fetuses. Please note the presence of a high number of dead cells within the lateral ventricle (LV) in MDD fetuses. Lower panel: Representative sagittal midbrain section of E20 rat fetus and illustration of apoptosis, as depicted by the TUNEL assay, in the CA1 layer of the hippocampus in control and methyl donor deficient (MDD) fetuses.

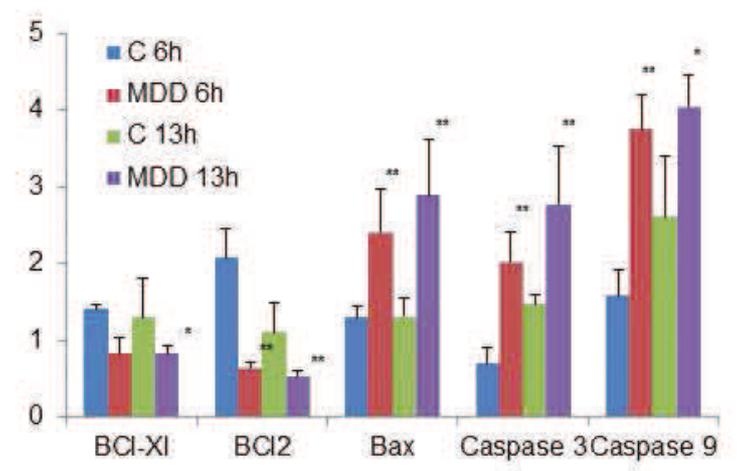
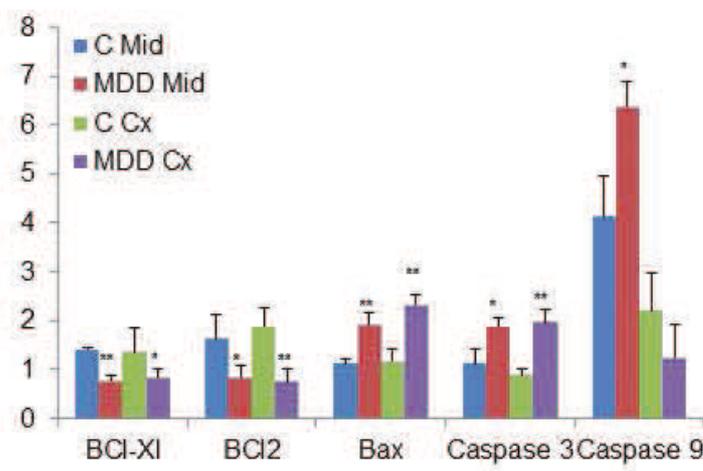
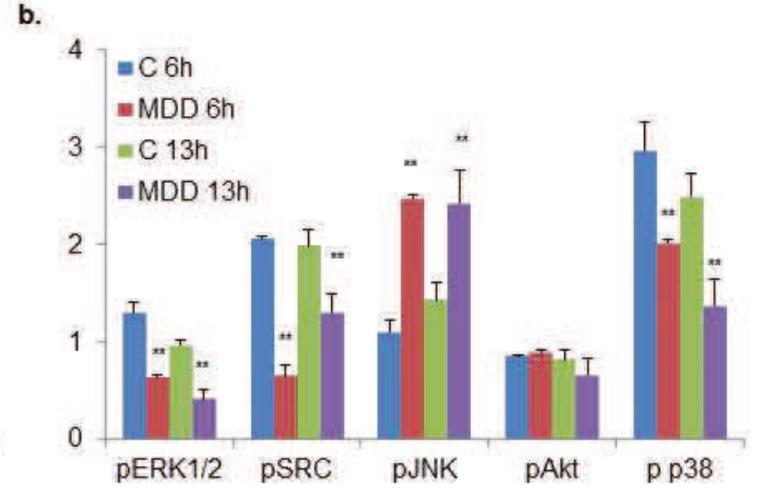
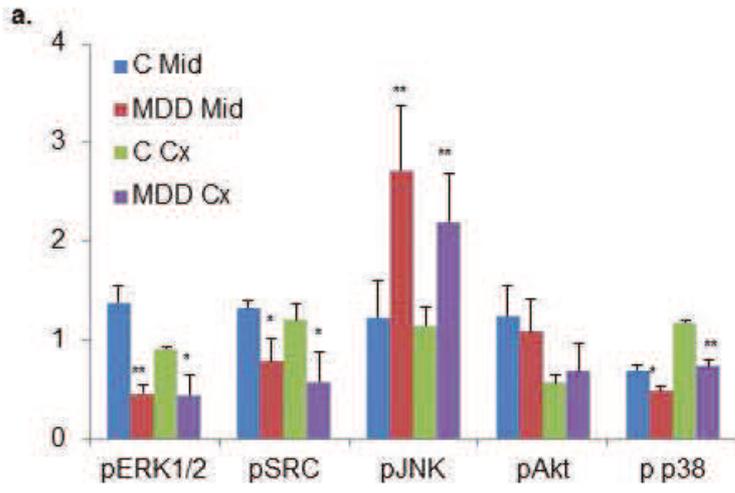
Supplementary Figure 4: Effects of silencing miR-124 on differentiating H19-7 cells. **(a)** Densitometric analyses corresponding to Western blots shown in Figure 7, among others. All data are reported as means \pm sd in arbitrary units and were obtained from four separate experiments. Statistically significant differences from respective control: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (C=control, D=B9-deficient, si=non-targeting siRNA, siM=miR-124 targeted siRNA). **(b)** Histoimmunostaining of caspase-3 and caspase-9 in cultured control, B9-deficient, and miR-124 siRNA-treated B9-deficient hippocampal cells.

a.



b.





Cleaved-caspase 3 / Dapi

Cleaved-caspase 9 / Dapi

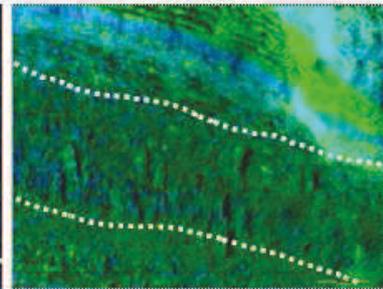
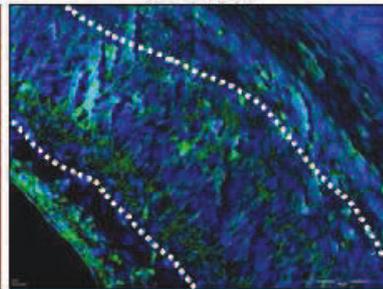
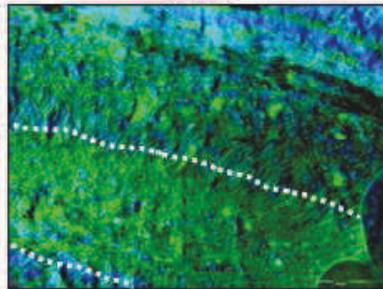
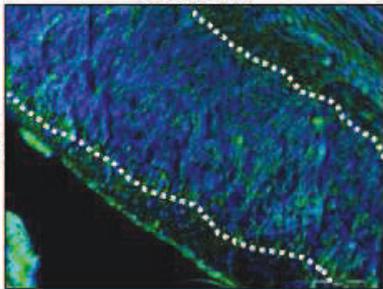
Control

MDD

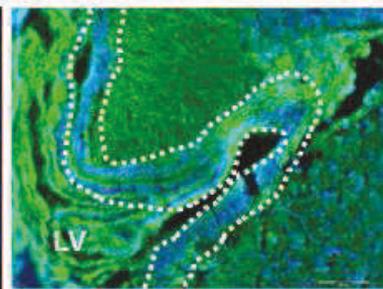
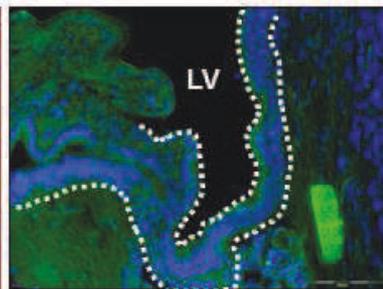
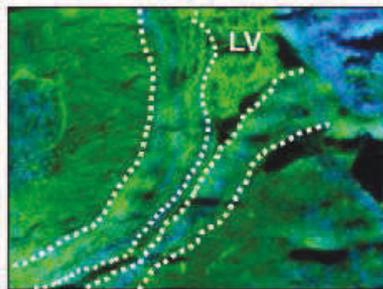
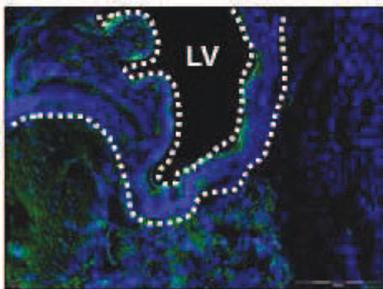
Control

MDD

CA1



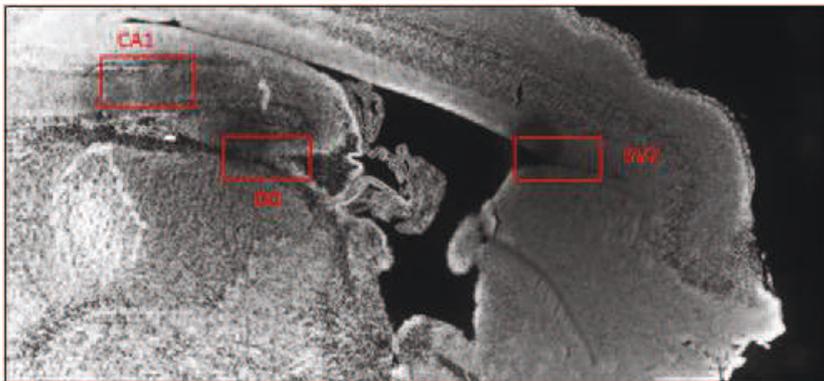
SVZ



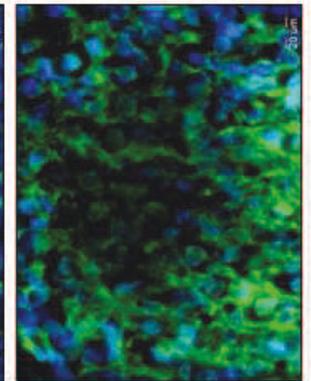
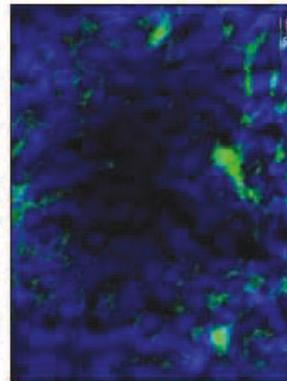
E20 Midbrain

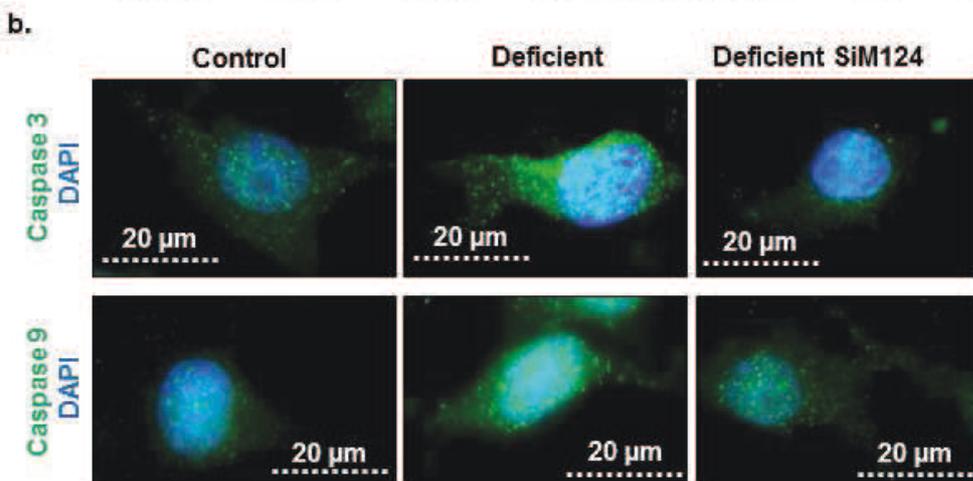
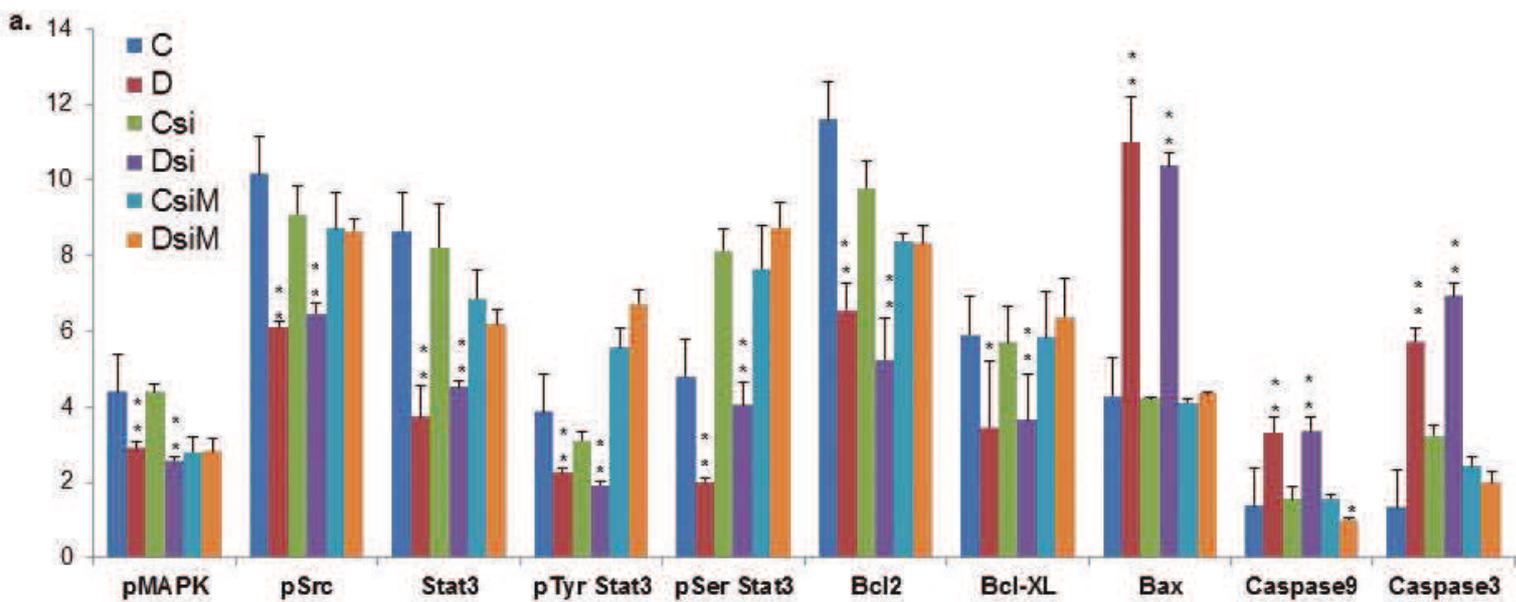
Control CA1

MDD CA1



TUNEL-Apoptag / Dapi





2^{ème} partie : Une supplémentation tardive en folates améliore les atteintes cérébrales associées à une carence en donneurs de méthyles, en restaurant les voies de signalisation Let-7 et miR-34.

Objectif de l'étude

L'implication des carences en donneurs de méthyles dans la survenue d'un certain nombre d'anomalies du développement justifie la recommandation par l'OMS d'une supplémentation chez les femmes avant la conception et pendant le premier trimestre de grossesse. Cette pratique a pour but de pallier les risques de survenue des anomalies les plus graves, pouvant provoquer des arrêts spontanés du développement ou aboutir à des handicaps sévères. Ainsi, une telle supplémentation est reconnue pour prévenir efficacement les défauts de fermeture du tube neural (FTN) qui peuvent se manifester sous différentes formes.

Certaines anomalies comme les spina bifida sont déterminées au cours du premier trimestre de gestation. Suite à la mise en place anatomique de la moelle épinière et du cerveau, des processus de maturation périnatale, notamment la fermeture des sutures inter-hémisphériques et du cervelet ainsi que la mise en place des circuits neuronaux, assurent la fonctionnalité cérébrale. Parmi les gènes identifiés en microarray comme étant altérés en condition de carence, figurent un certain nombre de gènes impliqués dans la voie de signalisation associée à Notch. Cette voie permet le contrôle de la transition prolifération/différenciation au cours du développement. Une dérégulation en condition de carence pourrait être à l'origine d'une différenciation prématurée, délétère pour le devenir de l'embryon.

Les miRs let-7a et miR-34a sont impliqués dans le contrôle de la fermeture du tube neural. Let-7a participe à la régulation des phénomènes de prolifération par le contrôle de l'expression de Trim71 tandis que miR-34a contribue au déroulement approprié des phénomènes de différenciation en modulant la voie de signalisation Dll1/Notch. Etant donné que les miRs peuvent être dérégulés en condition de carence, un lien pourrait exister entre l'expression de ces miRs, la dérégulation de leurs voies de signalisation cibles et les anomalies du développement.

Dans ce contexte, l'étude visait à étudier l'impact d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles associée ou non à une supplémentation tardive en folates, équivalant au troisième trimestre de grossesse chez la femme, sur le développement embryonnaire et la maturation cérébrale. Ainsi, il s'agissait d'évaluer l'impact de la supplémentation sur le profil d'expression des voies de signalisation let-7a/Trim71 et miR-34a/Notch en condition de carence. L'objectif était de corrélérer ces profils aux anomalies développementales précédemment recensées dans nos modèles et d'évaluer le potentiel effet bénéfique d'une supplémentation en période périnatale.

Synthèse des résultats

Comme décrit précédemment, la carence en donneurs de méthyles induit un retard de croissance intra-utérin. La supplémentation en acide folique (3 mg/kg/jour) au cours du dernier tiers de la gestation (soit pendant la 3^{ème} semaine) permet de corriger partiellement ce retard. Au cours du développement, un taux relativement constant d'anomalies (~20%) est observé dans les portées carencées. Au stade embryonnaire E20, ce taux est légèrement réduit puisque les anomalies les plus graves conduisent à un arrêt spontané du développement et à une résorption spontanée des embryons. Cependant, des anomalies telles que des syndactylies ou des spina bifida (« queue twistée », maintien d'une ouverture du canal vertébral, retard d'ossification et fusion des vertèbres) sont encore visibles. Le phénotype de « queue twistée » n'est plus observé chez les embryons supplémentés mais l'ouverture du canal vertébral est toujours présente. Elle semble cependant moins étendue, principalement grâce à une amélioration du défaut d'ossification. Le retard de croissance cérébral associé à une atrophie de différentes couches intra-cérébrales telles que la SVZ, la CA1 ou le GD est réduit par la supplémentation. Enfin, alors que la carence est associée à des anomalies de fermeture de la partie céphalique du tube neural, sous forme de défaut de fermeture des sutures inter-hémisphériques et du cervelet, le risque semble éliminé en condition de supplémentation tardive en folates.

L'étude de Let-7a et miR-34a met en évidence une augmentation significative de leur expression en condition de carence dans le mésencéphale des embryons à E20 et in vitro dans les

cellules H19-7 différenciées. La supplémentation restaure le taux d'expression des miRs, observation confirmée en hybridation in situ sur les tissus cérébraux à E20 carencés et sur les cellules H19-7.

Une étude par microarray a permis de montrer une répression générale des cibles connues ou prédites de let-7a et miR-34a sur le tissu cérébral embryonnaire en condition de carence. Pour chacun de ces miRs, 12 gènes dont l'expression est altérée interviennent dans le développement embryonnaire et le devenir cellulaire (les autres sont liés à la migration, au cytosquelette, au cycle cellulaire et au trafic des ARN). En condition de supplémentation, la dérégulation est largement réduite (~ -50% de répression).

L'analyse des cibles majeures de let-7a et miR-34a en Western blot met en évidence la répression de leur voie de signalisation dans le mésencéphale des embryons et dans les cellules différenciées en condition de carence. Ainsi, l'expression de Trim 71 régulé par Let-7a est réduite, de même que celle de Dll1/Notch régulé par miR34a, avec une répression de Hes1 associée à une augmentation de Mash1. En condition de supplémentation, l'expression de ces différentes protéines est similaire aux contrôles. Dans le modèle cellulaire, l'inhibition par siRNA dirigés contre let-7a et miR-34a restaure respectivement les voies de signalisation Trim71 et Dll1/Notch, et améliore le phénotype cellulaire (nombre de neurites et longueur axonale).

En complément, une étude post-natale des propriétés locomotrices et des capacités d'apprentissage et de mémorisation olfactivo-hippocampo-dépendante a été réalisée. Les individus carencés présentent un retard d'acquisition significatif dans leur fonction motrice et cognitive qui n'est pas rattrapé à J21. Malgré les améliorations anatomiques observées, il apparaît que les individus supplémentés n'atteignent pas les capacités des témoins. Cependant, les aptitudes de ces individus sont largement améliorées par rapport aux individus carencés.

Conclusion

La supplémentation tardive (3^{ème} tiers de la gestation) chez le rat atténue les défauts de développement et améliore les capacités cognitives, au moins partiellement en restaurant l'expression de Let-7a et miR-34a, ainsi que celle de leurs voies de signalisation respectives. D'une part la carence en donneurs de groupements méthyles induit une augmentation de l'expression du miRNA Let-7a qui aboutit à la répression de sa cible Trim 71, impliquée dans la promotion de la prolifération au détriment de la différenciation pour le contrôle des différentes étapes du développement. D'autre part, la carence induit une augmentation de l'expression de miR-34a qui aboutit à la répression de la voie de signalisation cible Dll1/Notch qui intervient au cours du développement du système nerveux central pour le contrôle du switch prolifération/différenciation en favorisant l'expression de Hes1 (promotion de la prolifération) au détriment de l'expression de Mash1 (promotion de la différenciation). En condition de carence, la répression de ces voies de signalisation aboutit à un défaut de prolifération qui provoque un engagement précoce et inapproprié dans le processus de différenciation. La supplémentation tardive en folate restaure les taux d'expression des miRs Let-7a et miR-34a ainsi que de leurs voies de signalisation associées. Elle contribue au maintien approprié des processus impliqués dans le développement tardif et améliore de manière interventionnelle certaines anomalies du développement.

2^{ème} publication

“Late maternal folate supplementation recues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring let-7 and miR-34 pathways.”

Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval* and Carine Bossenmeyer-Pourié*

* : contribution égale des auteurs

Cell Death & Diff, soumis

Late maternal folate supplementation recues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring let-7 and miR-34 pathways

Short title: let-7 and miR-34 in methyl donor deficiency

Andréa Geoffroy^{1,2}, Racha Kerek^{1,2}, Grégory Pourié^{1,2}, Déborah Helle^{1,2}, Jean-Louis Guéant^{1,2,3}, Jean-Luc Daval^{1,2}*, Carine Bossenmeyer-Pourié^{1,2}*

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

*: Authors with equal contributions

Corresponding authors

- **Jean-Luc Daval**, PhD, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Phone: (33) 3 83 68 32 82; Fax : (33) 3 83 68 32 79; e-mail: jean-luc.daval@inserm.fr

- **Carine Bossenmeyer-Pourié**, PhD, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Phone: (33) 3 83 68 32 92; Fax : (33) 3 83 68 32 79; e-mail: carine.pourie@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

The micronutrients folate and vitamin B12 are essential for the proper development of the central nervous system and their deficiency during pregnancy has been associated with a wide range of disorders, including neural tube defects. They act as methyl donors in the one-carbon metabolism which critically influences epigenetic mechanisms. In order to depict further underlying mechanisms, we investigated the role of let-7 and miR-34, two microRNAs known to be regulated by methylation and to exert a requisite role in brain development, on a validated rat model of maternal deficiency. In several countries, public health policies recommend periconceptional supplementation with folic acid. However, the question remains about the duration and periodicity of supplementation, particularly during perinatal phases of brain maturation. We therefore tested maternal supply (3mg/kg/day) during the last third of gestation, from embryonic day (E) 13 to 20. Methyl donor deficiency-related developmental disorders at E20, including cerebellar and interhemispheric suture defects and atrophy of selective cerebral layers, were associated with enhanced brain expression (by 2.5 fold) of let-7a and miR-34a, with subsequent downregulation of their regulatory targets such as Trim71 and Notch signaling partners, respectively. These processes could be reversed by siRNA strategy in differentiating neuroprogenitors lacking folate, with improvement of their morphological characteristics. Whereas folic acid supplementation helped restoring the levels of let-7 and miR-34 and their downstream targets, it led to a reduction of structural and functional defects taking place during the perinatal period. Our data outline the potential role of let-7 and miR-34 and their related signaling pathways in the developmental defects consecutive to gestational methyl donor deficiency, and support the likely usefulness of late folate supplementation in at risk women.

Keywords: folate, vitamin B12, let-7, miR-34, epigenetics, brain development

INTRODUCTION

Embryogenesis implies a series of programming processes involving extremely accurate time-controlled gene activation/silencing expressions. Numerous studies have shown that epigenetic regulations such as DNA methylation and histone modification play a critical role on genomic programming during embryogenesis and fetal development, by regulating cell proliferation and differentiation (Aranda et al., 2009; Cantone and Fisher, 2013). Epigenetic mechanisms also serve as important interfaces between genes and environmental cues (Zhang and Meaney, 2010; Lo and Zhou, 2014). In this respect, epigenetic variability appears to be susceptible to modulation by exogenous factors such as nutritional components, and early exposure to inappropriate maternal diet may lead to developmental disorders and increased risk for certain diseases later in life (McMillen et al., 2008; Attig et al., 2010).

Among the “epigenetic dietary compounds” identified, the methyl donors folate (vitamin B9) and vitamin B12 are major actors in the one-carbon metabolism that plays a key role in epigenetic regulations, including during development (see for review Guéant et al., 2013a and 2013b). Indeed, both vitamins are essential for the transfer of one-carbon units for synthesis of S-adenosylmethionine (SAM), the universal methyl donor for biological methylations (Hoffman et al., 1979). Their deficiency results in decreased methylation capacities, and thus is associated to genomewide hypomethylation both in humans and in animal models (Hoffman et al., 1979; McKay et al., 2004). Folate and vitamin B12 are essential for the development of the central nervous system, and a reduced status in these compounds has been associated with various developmental effects, ranging from brain growth retardation to major congenital disorders such as neural tube defects (NTDs), including spina bifida and anencephaly (Kirke et al., 1993; Molloy et al., 2008; Black et al., 2008; Kerek et al., 2013). The protective effect of folate on the occurrence and recurrence of NTDs has been clearly demonstrated, leading to national public health policies recommending periconceptional supplementation with folic acid (Bailey, 2004; De-Regil et al., 2010; Czeizel et al., 2011; Fekete et al., 2012). Owing to the role of folate in the methylation pathway, it is accepted that disturbed methylation may significantly account for the relation between NTDs and folate (Afman et al., 2005; Dunlevy et al., 2006), reinforcing the epigenetic hypothesis (Greene et al., 2011; Imbard et al., 2013).

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that regulate posttranscriptional gene expression. The presence of specific miRNAs is enriched in the central nervous system where they influence cell cycling, cell differentiation and apoptosis during development (Kapsimali et al., 2007; Fineberg et al., 2009; Yi and Fuchs, 2011; Petri et al., 2014). It has been reported that folate deficiency and DNA hypomethylation can lead to misexpression of miRNAs which in turn may substantially affect neural development (Shookhoff and Gallicano, 2010). Among the subset of miRNAs known to be regulated by DNA methylation (Sato et al., 2011), *let-7* (*lethal 7*) and miR-34 are believed to exert a requisite role at various steps of cerebral development, while they would influence the occurrence of NTDs (Maller Schulman et al., 2008; Shookhoff and Gallicano, 2010).

It was recently shown that methyl donor deficiency (folate, B12) during the embryofetal period in the rat causes overexpression of miR-124, resulting in the loss of Stat3 signaling and in a substantial impairment of brain development (Kerek et al., 2013). In order to identify further mechanisms underlying the effect of maternal B-vitamin status on neural tube and brain development, in line with potential epigenetic dysregulations, we investigated the participation of let-7 and miR-34 as well as of their related pathways in the consequences of methyl donor deficiency both *in vivo* on a validated rat model of maternal deficiency (Blaise et al., 2007; Daval et al., 2009) and *in vitro* in hippocampal progenitors (Akchiche et al., 2012). In addition, since folate supplementation is classically prescribed to women until the end of the first trimester of pregnancy in several countries, we aimed to test whether a later vitamin supply (i.e. during the last trimester, corresponding to the third week of gestation in the rat) could exert beneficial effects on fetus brain outcome.

MATERIALS AND METHODS

Animals and tissue collection

In vivo experiments were performed on a validated animal model of methyl donor deficiency (Blaise et al., 2007; Daval et al., 2009). They were conducted in accordance with the international guidelines for the care and use of laboratory animals, and were approved by the local University Research Ethics Board. Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) were maintained under standard laboratory conditions, on a 12-hour light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. One month before mating, adult females were fed either a standard diet (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or a methyl donor deficient (MDD) low-choline diet lacking folate and vitamin B12 (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Methionine content (~0.4%) was similar in both diets. In the supplementation protocol, folic acid (the synthetic form of folate, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) diluted in condensed milk was given *per os* at the dose of 3 mg/kg per day in a final volume of 1 mL to dams from embryonic day 13 (E13) to E20. Matched control dams received the same volume of vehicle (i.e., 1 mL condensed milk) over the same period. Whatever the maternal diet, fetuses were collected at E9, E13, E16 or E20. They were euthanized by excess isoflurane, and then weighed and evaluated morphologically with the aid of a BX51WI microscope (Olympus, Rungis, France) coupled to a ProgRes MF cool camera (Jenoptik, Jena, Germany). For biochemical analyses, the brains were rapidly harvested and the midbrain was dissected before freezing in liquid nitrogen and stored at -80°C. For immunochemistry, brains were immediately fixed in 4%-paraformaldehyde (24-48h) at 4°C, dehydrated and included in paraffin. Microtome-generated 12- μ m sagittal brain sections were then mounted onto glass slides and stored at ambient temperature. In addition, blood samples were collected from dams for subsequent analyses.

Measurement of maternal plasma concentrations of homocysteine, vitamin B12 and folate and offspring tissue concentrations of SAM and SAH

Homocysteine concentrations were measured by HPLC (Waters, St. Quentin, France) coupled with mass spectrometry (Api 4000 Qtrap; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) (Ducros et al., 2006). Vitamin B12 and folate concentrations were measured by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals, Versailles, France) (Chery et al., 2002). SAM and SAH concentrations were measured in tissue homogenates using high-performance liquid chromatography adapted from Delabar et al. (1999). Proteins were precipitated with 0.2N HClO₄ before injection on the column (Lichrospher, 100 RP-C18, 5 μ m, 250 x 4 mm ID). The mobile phase, consisting of 50 mmol/L sodium phosphate (pH 3.2), 10 mmol/L heptane sulfonate, and acetonitrile (10-20% from 0 to 20 minutes), was applied at 0.75 mL/min flow rate. Amounts of SAM and SAH were quantified using a UV detector set at 254 nm.

DNA methylation

Global DNA methylation was quantified in brain tissues at E20 by using the Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit (Epigentek, Euromedex, Mundolsheim, France),

as previously described (Wang et al., 2012). According to the manufacturer's instructions, the methylated fraction of DNA can be recognized by a 5-methylcytosine antibody and quantified through an ELISA-like reaction. The amount of methylated DNA is proportional to the OD intensity.

Histopathological analyses

For basic histopathological investigations, brain sections were stained with the DNA fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, Sigma-Aldrich) for the measurement of thickness of specific brain layers.

For skeletal analysis, the procedure adapted from Wallin *et al.* (1994) involves complete skinning of fresh eviscerated rat embryos following a 24 h-immersion in 95% ethanol. Skeletons were stained for 48 h with 1% Alcian blue dye, diluted in an ethanol/acetic acid mix, specific for cartilage staining. Skeletons were then macerated in 2% KOH until bones are visible, and stained for 24 h with 0.12% Alizarin red dye diluted in KOH, specific for bone staining. Specimen were finally cleared and hardened in glycerol/ethanol baths and stored in 87% glycerol. Detailed observations and measurements were performed by means of the Cell® software (Olympus).

Cell cultures

H19-7/IGF-IR cell line (ATCC# CRL-2526) was conditionally immortalized from embryonic day 17 rat hippocampi with a temperature-sensitive simian virus 40 (SV40) large tumor antigen (Eves et al., 1992). Cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per well in 24-well plates (Falcon, Dutscher, Brumath, France) precoated with poly-L-lysine in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/mL penicillin, 50 U/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate, as previously described (Akchiche et al., 2010; Akchiche et al., 2012). For homogeneity, the same lot of serum was used throughout all experiments. Cells were allowed to proliferate at the temperature of 33°C in 95% air/5% CO₂. Selection was maintained with 200 µg/mL G418. Because standard DMEM does not contain vitamin B12, methyl donor deficiency was induced by using DMEM lacking vitamin B9 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After 24h, cells were washed and shifted to the non-permissive temperature (39°C) for induction of their differentiation in high-glucose-DMEM (with or without B9) containing 1% fetal calf serum, N2 supplement (Invitrogen), 0.11 mg/mL sodium pyruvate and 2 mM glutamine.

Immunohistochemistry

In addition to brain sections used for immunohistological analysis, cells cultured on poly-L-lysine-precoated glass coverslips were washed, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), as reported by Akchiche *et al.* (2012) and Kerek et al. (2013). Nonspecific binding sites were blocked in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin (BSA) and incubation was performed overnight with an antibody against one of the following proteins: Trim71 (goat polyclonal, 1/200, USBiological, Euromedex, Souffelweyersheim, France), Dll1 (sheep polyclonal, 1/200, USBiological), Notch1 (Rabbit monoclonal, 1/200, Cell Signaling Technology), Hes1 (rabbit monoclonal, 1/200, Cell Signaling Technology), Mash1 (rabbit polyclonal, 1/200, Abcam),

actin (goat polyclonal, 1/200, Santa Cruz Biotechnology, Clinisciences, Nanterre, France), NF68 (rabbit polyclonal, 1/300, USBiological). After a washing step, immunoreactivity was assessed by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1h at 25°C (1/1000, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Control experiments were conducted by omitting the primary antibody. Immunofluorescence visualization, image acquisition (x20 and x60 magnification) and unbiased cell counts in randomly selected fields were performed with a BX51WI microscope (Olympus) coupled to a ProgRes MF cool camera (Jenoptik) or a confocal microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) and analyzed by Cell[®] software.

Western blotting

Biological samples were obtained from the brains of six E20 fetuses. Following protein extraction with RIPA buffer, Western blot analyses were performed using standard procedure with chemiluminescence using ECL system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), as previously detailed (Akchiche et al., 2010). Antibodies against the following proteins were used: Trim71 (goat polyclonal, 1/1000, LSBio, Clinisciences), Dll1 (sheep polyclonal, 1/1000, USBiological), Notch1 (Rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Hes1 (rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Mash1 (rabbit polyclonal, 1/1000, Abcam, Paris, France).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, chicken monoclonal, 1/1000, Millipore, Fontenay-sous-Bois, France) was used as an internal standard. Polyvinylidenedifluoride membranes were incubated for 1h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1/2000, Santa Cruz).

RNA extraction

Biological samples were obtained from the brains of three to six E16 and E20 fetuses. Total RNA was extracted from 0.5 mg of embryonic midbrain tissues and from H19-7 cells (10^2 to 10^7 cells) and using the mirVana[®]miRNA Isolation kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions, and as previously described by Kerek et al. (2013). miRNA were isolated using a two-step procedure. In the first step, samples were disrupted in a denaturing lysis buffer, and then subjected to acid-phenol/chloroform extraction. The second step consisted on purification over glass-fiber filter that immobilizes the RNA which was later eluted using RNase-free water. According to the manufacturer's instructions, no enrichment procedure is needed while isolating miRNA for expression profiling using miRNA arrays. The concentration and purity of RNA were determined at 260/280 nm by using a nanodrop spectrophotometer (Multiskan GO).

Analysis of let-7a and miR-34a expression

TaqMan RT-qPCR: Two-step real-time PCR was used to analyze the expression of microRNAs. In the first step total RNA was reverse transcribed using miRNA-specific RT primers (rno-let-7, rno-miR-34 and U6SnoRNA) and a TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). miRNA expression was analyzed using TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems), according to the

instructions of the manufacturer. The RT reaction was performed in 15 μ L volume, containing 1 μ g RNA sample, 3 μ L primer, and master mix adjusted to 15 μ L/reaction. Products of RT reaction (1.33 μ L) were used in a real-time PCR reaction, which also included 10 μ L of the TaqMan Universal Master Mix II, and 1 μ L TaqMan miRNA assay containing the sequence-specific primers of either the target miRNA (let-7: UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU, miR-34: UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU) or the U6SnoRNA (CACGAATTTGCGTGTCATCCTT) used as an endogenous control for normalization. Real-time PCR was carried out by means of a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Incubations were performed in a 96-well plate at 95°C for 10 min for enzyme activation, followed by 40 cycles of PCR: denaturation (95°C for 15 sec), and annealing/extending (60°C for 2 min). Data analysis was performed with the software provided by the manufacturer (Step One Plus).

In situ hybridization: The *in situ* detection of let-7 and miR-34 was performed on paraffin embedded sections from normal and methyl donor deficient brain tissues by locked nucleic acid (LNA)-oligo *in situ* hybridization, as previously described by Kloosterman *et al.* (2006). Briefly, the slides were deparaffinized in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol, and treated with proteinase-k for nucleic acid release. Slides were then re-dehydrated and prehybridized in hybridization buffer with 0.5 nm specific probe (LNA-modified and digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotide, Exiqon, Copenhagen, Denmark) complementary to let-7 (AACTATAACAACCTACTACCTCA) or miR-34 (ACAACCAGCTAAGACACTGCCA). Sections were then washed in saline sodium citrate buffer, followed by blocking in Denhardt solution 1x in a humidified chamber. Slides were then incubated with anti-DIG antibody (1/500, Roche Applied Science) for 1h at room temperature, washed in PBS-T and then immunoreactivity was assessed in the presence of a matching secondary antibody conjugated to AlexaFluor (1/2000, Molecular Probes) for 1h at room temperature. Positive controls (snoRNA U6B, Exiqon: CACGAATTTGCGTGTCATCCTT) were used for each hybridization experiment.

Small interfering RNA (siRNA) and cell transfection

Let-7 and miR-34 expression in cell cultures was silenced using small interfering RNA. The siRNA oligonucleotide duplexes were purchased from Ambion (Applied Biosystems) for targeting the rat let-7 (hsa-let-7a-5p) or miR-34 (hsa-miR-34a-5p) in H19-7 cells. The siRNA sequence is (sense strand indicated): 5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3' for let-7, 5'-UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU-3' for miR-34, and mirVana™ miRNA Inhibitor Negative Control #1 was used as control for evaluation of the effect of the experimental miRNA inhibition. siRNA duplexes (25 nM final concentration for the first transfection then 10 nM for the second day re-transfection) were transfected with lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). Three days post-transfection, cells were harvested for RNA or protein extraction.

Micro RNA Targets RT² Profiler PCR Arrays

Rat microRNA Targets RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen, Courtaboeuf, France) in a 96-well plate format were used to monitor the expression of the most relevant experimentally documented or bioinformatically predicted gene targets for let-7a and miR-34a. Biological samples were obtained from the brains of two to three E20 fetuses and were tested in

duplicate in separate plates. Total RNA was purified using the RNeasyPlus Mini Kit (Qiagen). Following manufacturer's instructions, total RNA was reverse transcribed using RT² First Strand kit. Reaction was performed in the iCycler instrument (Bio-Rad). The reaction includes a gDNA elimination step. The RT reaction was performed in a 20 μ L volume containing 10 μ L of gDNA-free RNA (500 ng RNA, 2 μ L gDNA elimination buffer and RNase-free water) and 10 μ L of RT mix (4 μ L RT buffer, 1 μ L primer and external control, 2 μ L RT enzyme mix and 3 μ L RNase-free water). Products of RT reaction were mixed with 91 μ L of RNase-free water for a final template volume of 111 μ L. For PCR reaction, 1350 μ L RT² SYBR Green mastermix and 1248 μ L RNase-free water were added. 25 μ L of PCR components were added to each well of the 96-well plate. Real-time PCR was carried out on a Step One Plus apparatus (Applied Biosystems). Plates were incubated at 95°C for 10 min for enzyme activation, followed by 40 cycles of PCR: denaturation (95°C for 15 sec), and annealing/extending (60°C for 1 min). Data analysis of the transcription of 84 separate genes was performed with the software provided by the manufacturer (Step One Plus).

Statistical analysis

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

RESULTS

Methyl donor deficiency is associated with various developmental abnormalities and defective closure of the posterior and cephalic parts of the neural tube: beneficial effects of folic acid supplementation

As previously documented in the same animal model (Kerek et al., 2013), early methyl donor deficiency was associated with global intrauterine growth retardation, as reflected by a significant reduction of body weight, body length and femur length at the stage of embryonic day 20 (E20) (Figure 1A-C). This could be corrected at least partly by folic acid supplementation during the last third of gestation. Morphologic abnormalities were detected in ~20% of deficient embryos at E9, E13 and E16, but not, or very exceptionally, in controls (Figure 1D). They were still present at E20, but at a somewhat lower rate (Figure 1E), presumably due to spontaneous abortions of the most affected fetuses. In addition to marked growth retardation, these abnormalities include syndactyly and related malformations such as atrophied digits, conjoined fetuses, as well as various signs indicative of spina bifida, such as “twisted tail” (12%) and open vertebral canal (Figure 1F- H), in addition to delayed ossification and fused vertebrae. Following folic acid supplementation, the occurrence of morphologic abnormalities was consistently reduced (Figure 1E). Whereas twisted tail was not detected in supplemented E20 fetuses, opening of the vertebral canal was still present, but to a smaller extent, as illustrated on Figure 1H.

While brain weight at E20 was reduced in the same proportions as body weight (about 15%) following exposure to methyl donor deficiency, thicknesses of selective brain layers such as the hippocampal CA1 pyramidal layer, the granular cell layer of the dentate gyrus and the neurogenic subventricular zone (SVZ) were more dramatically affected (from 25 to 40%) (Figure 2A-D). Again, belated supplementation allowed significant reduction of these defects. Importantly, early deficiency was associated, at this developmental stage, with delayed closure of the cephalic parts of the neural tube, as reflected by improper interhemispheric junction and open cerebellar vermis that could be largely prevented by folic acid supplementation (Figure 2E). As illustrated by Figure 2F, the occurrence of open cerebellar vermis at E20 varied from 41% in deficient fetuses to ~3% in controls and supplemented counterparts.

Methyl donor deficiency increases expression levels of let-7 and miR-34: reversion by folic acid supplementation

When studied by TaqMan RT-qPCR, let-7a expression patterns showed a significant increase (by 2.5 fold) in the midbrain extracts from E20 fetuses exposed to methyl donor deficiency, and such an effect was reversed by folic acid supplementation (Figure 3A). Let-7 levels were increased by the same order of magnitude *in vitro* in differentiating hippocampal progenitors lacking folate (Figure 3B). Similar observations could be made regarding the expression patterns of miR-34a (Figure 3C-D). This was confirmed by *in situ* hybridization in various brain areas including the hippocampus, the cerebral cortex and the cerebellum (Supplementary Figures S1-S2).

Early methyl donor deficiency alters the expression pattern of a wild range of genes influenced by let-7 and miR-34 and involved in various aspects of development

As shown by Figures 4 and 5, microarray approach revealed that methyl donor deficiency was associated with an overall decreased expression of known or predicted target genes analyzed. More specifically, the average downregulation of let-7a targets was above 6-fold in brain tissues issued from deficient fetuses, 95% being downregulated by more than 3-fold. Among them, 12 target genes were identified to participate to embryonic development and cell fate (Figure 4C), while others are involved in cell migration, cytoskeleton organization, cell cycle, and RNA trafficking, as indicated in supplementary data (Supplementary Figure S3). Folic acid supplementation reduced significantly the dysregulation of almost all target genes affected by deficiency conditions. Regarding miR-34a, the average downregulation of its targets was ~5-fold in deficient samples, 96% being downregulated by more than 3-fold (Figure 5A-B). Fifteen target genes were related to embryonic development and cell fate (Figure 5C), while others are involved in cell migration, axon guidance, cell cycle, and vesicular trafficking (Supplementary Figure S4). Again, folic acid supplementation was able to improve gene expression.

Methyl donor deficiency affects protein expression levels of known downstream pathways of let-7 and miR-34: reversion by folic acid supplementation

In the present study, we chose to investigate Trim71 which is a key effector of the let-7 microRNA pathway that promotes cell proliferation and inhibits differentiation to control various developmental processes (Escedi and Grosshans, 2013). Western blot analysis showed that the expression level of Trim71 in the fetus midbrain was repressed at E20 consecutively to methyl donor deficiency, whereas it was restored to normal level following folic acid supplementation (Figure 6A).

The Notch receptor ligand delta-like 1 (dll1) is a target of miR-34, and during morphogenesis of the central nervous system, differentiation of neural progenitors is known to be inhibited by hairy and enhancer of split homolog 1 (Hes1) whereas it is stimulated by mammalian achaete-scute complex homolog 1 (Mash1) (Ishibashi, 2004). We therefore focused our study more specifically on Notch signaling pathway. Under deficiency conditions, midbrain expression levels of dll1, Notch1 and Hes1 were noticeably reduced, whereas the expression of Mash1 was more elevated (Figure 7A). When folic acid supplementation was applied, the expression of the various proteins in deficient fetuses was similar to controls.

Silencing let-7 and miR-34 restores their related pathways and contributes to rescue cells exposed to folate deficiency

Let-7 siRNA, that repeatedly inhibited the expression of let-7a by >85% after quantification by TaqMan RT-qPCR, increased Trim71 levels in both control and folate-deficient H19-7 cells at 13 h after induction of their differentiation (Figure 6C). The detrimental role of increased let-7 in folate-deficient progenitors was further supported by cell morphology of differentiating progenitors (Figure 6D-F). Indeed, folate deficiency was accompanied at 13h of differentiation by a strong reduction of the number and length of neural processes, as previously documented (Akchiche et al., 2012). In the present study, the downregulation of let-7a by siRNA led to a noticeable restoration of these processes. Although the treatment by

let-7 siRNA slightly modified cell characteristics in control progenitors, reflecting increased branching projections, both the number of neurites per cell and the axon length were significantly augmented in folate-deficient cells treated by let-7 siRNA as compared with those treated by non-targeting siRNA (Figure 6D-F).

Whereas the use of non-targeting siRNA (Si-) had no patent effect on the expression of Notch signaling proteins in differentiating cells, silencing miR-34a increased significantly the expression of *ddl1*, *Notch1* and *Hes1*, while protein amounts of *Mash1* were reduced (Figure 7B). As for let-7, miR-34 siRNA had beneficial effects on the morphological characteristics of deficient cells (Figure 7D-E and Supplementary Figure S5).

DISCUSSION

In the present study, we provide the first evidence that the epigenetic misexpression of let-7 and miR-34, along with the disruption of their related pathways would be key players in the deleterious effects of early methyl donor deficiency on the anatomical and functional development of the central nervous system. While it cannot fully prevent early-occurring NTDs such as spina bifida, maternal supplementation with folate during the period corresponding to the last trimester of pregnancy in women appeared to help preserve a normal development, at least partly through restoring let-7 and miR-34 normal expression.

In our animal model, maternal exposure to methyl donor deficiency is associated with various developmental abnormalities in embryos and fetuses, such as spontaneous abortion, intrauterine growth retardation, malformations, and delayed ossification. Underdeveloped skeleton has been already reported in relationship with low folate status in the periconceptional period or following low paternal dietary folate (Lambrot et al., 2013). Also, there was a high prevalence of apparent NTDs. These include defective closure of the posterior neural tube as reflected by “twisted” tail and open spinal canal, both signs being suggestive of spina bifida. Such developmental disorders in line with folate and/or vitamin B12 deficiency have been largely reported (Kirke et al., 1993; Beaudin and Stover, 2007; Molloy et al., 2008). In addition to a concomitant global atrophy of the brain in deficient pups, we frequently observed improper interhemispheric junction and unclosed cerebellar vermis, suggesting developmental anomalies of the cephalic part of the neural tube. The embryonic development of NTDs is complex, with diverse cellular and molecular mechanisms operating at different levels of the body axis. Although homocysteine was shown to be embryotoxic, it did not appear to be directly responsible for NTDs (Greene et al., 2003), and the mechanisms underlying the effect of maternal B-vitamin status on neural tube development remain elusive.

Neurulation, which is conventionally divided into primary and secondary phases, is a fundamental event of embryogenesis that culminates in the formation of the neural tube, the precursor of the brain and spinal cord, and neural tube closure is an essential step in the development of the central nervous system (Copp and Greene, 2013). The neuroepithelium is entirely proliferative during neurulation. Cells begin to exit the cell cycle, with the onset of neuronal differentiation, only after neural tube closure is complete. Accurate control of proliferation, differentiation and apoptosis of neural cells is crucial for proper development and maturation of the nervous system. This requires the temporal expression of specific gene sets, most of them being influenced by epigenetic processes (Meza-Sosa et al., 2012; Boland et al., 2014). In this respect, regulation of gene expression by microRNAs is proving to be essential for the neurogenic process (Meza-Sosa et al., 2014). Under the conditions of methyl donor deficiency, we observed a disruption of the expression of let-7 and miR-34 and their related pathways. Among the microRNAs relevant to vertebrate nervous system development, the highly conserved let-7a microRNA would constitute a key regulator of neural cell proliferation and differentiation (Büssing et al., 2008), and has been tightly associated with the occurrence of NTDs (Maller Schulman et al., 2008). Depending on the experimental models used, it was reported that let-7a could act through various pathways involving the participation of transcription factors such as Ahr, Sox2, Tlx or cell cycle regulators such as

CDK/Cyclin complexes (Cimadamore et al., 2013; Hartl and Grunwald Kadow, 2013), contributing to the overall effect of let-7 on increasing the number of cells in the G1 phase of the cell cycle. In the present study, we chose to further investigate the well-established target of let-7, Trim71 (also called Lin41), which is required for embryonic development and proper neural tube closure (Lin et al., 2007; Maller Schulman et al., 2008). According to the study by Maller Schuman et al. (2008) in the mouse, Trim71 is necessary for initiation and correct closure of the neural tube at the midbrain/hindbrain border. Belonging to the family of Trim-NHL ubiquitin ligases, Trim71 is highly expressed in undifferentiated cells, such as embryonic stem cells, but becomes rapidly down-regulated upon differentiation, in response to the rise of let-7 levels (Rybak et al., 2009). It was reported to cooperate with microRNAs to repress *Cdkn1a* expression and promote embryonic stem cell proliferation (Chang et al., 2012). The data available suggest a role for Trim71 in the maintenance of stem cell identity and/or inhibition of premature differentiation. In our experimental models of methyl donor deficiency, we observed a strong increase in let-7a expression, especially in rat pups at the E20 stage and in differentiating progenitors, along with significantly lower levels of Trim71 protein. These results are consistent with the relatively high prevalence of anomalies of the cephalic part of the neural tube depicted in E20 rat pups. Regarding miR-34, its expression levels were also found to be significantly higher under methyl donor deficiency. Described as belonging to a “late-brain development” expression cluster in the mouse (Thomson et al., 2004), miR-34a regulates numerous target genes involved in cell cycle, apoptosis, differentiation, and neuron maintenance (Chen and Hu, 2012). More specifically, an increase in the expression of miR-34a leads to a decrease of *dll1*, which mediates its effects by binding to the Notch receptor, causing its proteolytic cleavage and release of the Notch intracellular domain (Machka et al., 2005). Notch is known to play a role in the developing central nervous system by inhibiting neuronal differentiation and maintaining neural precursor cells. *Hes1*, a major downstream target of Notch, suppresses neuronal differentiation by repressing expression of, amongst other targets, the activator-type bHLH gene *Mash1* (Kageyama et al., 2005). In the present study, all the above-mentioned members of the Notch signaling pathway were dramatically affected by methyl donor deficiency. This would finally result in decreased cell proliferation and premature neuronal differentiation (Hatakeyama et al., 2004). Taken together, our data therefore suggest that the alterations observed in let-7 and miR-34 pathways in response to methyl donor deficiency may participate to a disruption of the proliferation/differentiation balance, resulting in improper development of the central nervous system, and influencing the occurrence of NTDs. As pointed out by Copp et al. (2003), premature differentiation in the neuroepithelium might render the neural plate mechanically inflexible and prevent dorsolateral bending, interfere with the release of neural crest cells or inhibit the adhesion process that is necessary for neural fold fusion. Furthermore, overexpression of miR-34a has been reported to alter neurite outgrowth and synaptogenesis, with functional consequences, in particular at the electrophysiological level (Agostini et al., 2011). Such observations are consistent with our previous findings in developing neuroprogenitors showing that folate deprivation markedly affects cell polarity, neurite outgrowth, vesicular transport and synaptic function and plasticity (Akchiche et al., 2012). Finally, the methyl donor deficiency-associated poorer scores recorded in the homing test at postnatal days 5-16 are in good correlation with the observation of persisting atrophy of some

brain cell layers, notably in the hippocampus, in rat pups exposed to the same conditions of B-vitamin deficiency as in the present study (Kerek et al., 2013), suggesting long-lasting functional defects.

Our experimental conditions reduced methyl donor availability, and affected the one-carbon metabolism and thus methylation capacities, as previously documented both in the rat progeny (Blaise et al., 2007; Bossenmeyer-Pourié et al., 2010; El Hajj Chehadeh et al., 2014) and in H19-7 neuroprogenitors (Akchiche et al., 2012). Whereas periconceptional administration of folic acid is recognized for its beneficial effects, questions remain about the optimal dose and appropriate periodicity of folic acid supplementation. Indeed, folate deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain (Craciunescu et al., 2004; 2010). In addition, it has been reported that differences in birth weight and neurocognitive development related to environmental factors are most likely initiated during the second and third trimesters of pregnancy (Raznahan et al., 2012). Consecutively to our protocol of belated supplementation, metabolic features were ameliorated, along with lower levels of homocysteine, and we observed a reduction of structural and functional (homing test) defects taking place during the peak of brain maturation in the perinatal period. Most importantly, folic acid supplementation helped restoring the levels of let-7 and miR-34 and their respective targets.

As recently reviewed by Imbard et al. (2013), several mechanisms have been proposed to account for the role of folate and other methyl donors such as vitamin B12 during embryogenesis. They include decreased oxidative stress and increased nucleotide biosynthesis, facilitating DNA replication. Since folate and vitamin B12 are involved in the methylation pathway, several authors have pointed out that disturbed methylation and related epigenetic changes could be responsible for developmental abnormalities and birth defects (Afman et al., 2005; Dunlevy et al., 2006; Greene et al., 2011). This is supported by the deleterious effects of polymorphisms in genes involved in the methylation pathway such as *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)*, a key enzyme of folate metabolism implied in homocysteine remethylation (Botto and Yang, 2000; Yan et al., 2012), and whose activity is affected in our animal model (Blaise et al., 2009). Interestingly, MTHFR is a predicted target of miR-34a (Shookhoff and Gallicano, 2010). An increase in miR-34a would lead to a decrease in MTHFR expression, reducing methionine amounts to finally decrease methylation reactions and increase homocysteine levels.

In conclusion, we showed that methyl donor deficiency was associated with enhanced expression of let-7a and miR-34a, with subsequent alterations of their development regulatory targets such as Trim71 and Notch signaling partners. The latter data are consistent with the previous demonstrations that folic acid is able to stimulate Notch signaling, including Hes1 transcription, and promotes cell proliferation in neural stem cells (Zhang et al., 2008; Liu et al., 2010; Ichi et al., 2010). Taken together, the positive impact observed after folic acid supplementation and following siRNA strategy, along with the associated normalization of let-7 and miR-34, strengthen the potential role of these microRNAs and their related signaling pathways in the developmental defects consecutive to gestational methyl donor deficiency. By using the microarray approach, the identification of new putative target genes affected in response to methyl donor deficiency *via* let-7 and miR-34 warrants further investigations.

Finally, our data support the likely usefulness of late folate supplementation in at risk women. According to the “fetal programming” hypothesis, gestational exposure to appropriate concentrations of methyl donors may help reduce the susceptibility to certain diseases in adulthood, by favorably influencing epigenetic profiles (Li et al., 2014).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank Philippe Gérard and Elise Jeannesson-Thivisol for their skillful technical assistance and Rémy Umoret for management of animal facility. They are indebted to the “Région Lorraine” for support. AG and RK are recipients of a fellowship from the french Ministry for Higher Education and Research.

REFERENCES

- Afman, L.A.; Blom, H.J.; Drittij, M.J.; Brouns, M.R.; van Straaten, H.W. Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2005, **158**, 59-65.
- Agostini M, Tucci, P., Steinert, J.R., Shalom-Feuerstein R, Rouleau M, Aberdam D, Forsythe ID, Young KW, Ventura A, Concepcion CP, Han YC, Candi E, Knight RA, Mak TW, Melino G. (2011). microRNA-34a regulates neurite outgrowth, spinal morphology, and function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108, 21099-21104.
- 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 J* 2012; **26**: 3980-3992.
- Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Pourié G, Koziel V, Nédélec E, Guéant JL, Daval JL. Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: Signaling pathways sequentially involved. *Hippocampus* 2010; **20**: 949-961.
- Aranda P, Agirre X, Ballestar E, Andreu EJ, Román-Gómez J, Prieto I, Martín-Subero JI, Cigudosa JC, Siebert R, Esteller M, Prosper F. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. *PLoS One.* 2009; **4**(11):e7809.
- Attig L, Gabory A, Junien C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc Nutr Soc* 2010; **69**: 221-231.
- Bailey L.B. Folate and vitamin B12 recommended intakes and status in the United States. *Nutr. Rev.* 2004, **62**, S14-S20.
- Beaudin AE, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2007; **81**: 183-203.
- Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S126-S131.
- 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**: 231-238.
- 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* 2007; **170**: 667-679.
- Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res.* 2014; **115**: 311-324.
- 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**: 270-277.

- Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 862-877.
- Büssing I, Slack FJ, Grosshans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med.* 2008;14: 400-409.
- Cantone I, Fisher AG. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20: 282-289.
- Chang HM, Martinez NJ, Thornton JE, Hagan JP, Nguyen KD, Gregory RI. Trim71 cooperates with microRNAs to repress Cdkn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation. *Nat Commun.* 2012; 3: 923.
- Chen F, Hu SJ. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012; 26: 79-86.
- Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmouttaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 40:1105-1108, 2002.
- Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, Terskikh AV. SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: E3017-E3026.
- Copp AJ, Greene ND. Neural tube defects – disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013 2:213-227.
- Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet.* 2003; 4: 784-793.
- Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* 2004; **134**: 162-166.
- Craciunescu CN, Johnson AR, Zeisel SH. Dietary choline reverses some, but not all, effects of folate deficiency on neurogenesis and apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr.* 2010; 140: 1162-1166.
- Czeizel AE, Dudás I, Paput L, Bánhidly F. Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins? *Ann Nutr Metab.* 2011 58: 263-271.
- Daval JL, Blaise S, Guéant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: E1.
- Delabar U, Kloor D, Luippold G, Muhlbauer B. 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, 1999.
- De-Regil LM, Fernández-Gaxiola AC, Dowswell T, Peña-Rosas JP. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; 10: CD007950.
- Ducros, V., Belva-Besnet, H., Casetta, B., and Favier, A. (2006) A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, 987-990.

- Dunlevy, L.P.; Burren, K.A.; Mills, K.; Chitty, L.S.; Copp, A.J.; Greene, N.D. Integrity of the methylation cycle is essential for mammalian neural tube closure. *Birth Defects Res.* 2006, **76**, 544-552.
- El Hajj Chehadeh S, Pourié G, Martin N, Alberto JM, Daval JL, Guéant JL, Leininger-Muller B. 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. *Br J Nutr.* 2014; **111**: 1021-1031.
- Ecsedi M, Grosshans H. LIN-41/TRIM71: emancipation of a miRNA target. *Genes Dev.* 2013; **27**: 581-589.
- Eves EM, Tucker MS, Roback JD, Downen M, Rosne, MR, Wainer BH. Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4373-4377.
- 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.
- Fineberg SK, Kosik KS, Davidson BL. MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron.* 2009; **64**: 303-309.
- Greene ND, Dunlevy LE, Copp AJ. Homocysteine is embryotoxic but does not cause neural tube defects in mouse embryos. *Anat Embryol (Berl)* 2003; **206**: 185-191.
- Greene, N.D.; Stanier, P.; Moore, G.E. The emerging role of epigenetic mechanisms in the etiology of neural tube defects. *Epigenetics* 2011, **6**, 875-883.
- Guéant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, Adjalla C, Maury F, Merle C, Nicolas JP, Namour F, Daval JL. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie.* 2013 **95**:1033-1040.
- Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab* 2013; **24**:279-289.
- Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R. 2004. Hes genes regulate size, shape, and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* **131**:5539-5550.
- Hartl M, Grunwald Kadow IC. New roles for "old" microRNAs in nervous system function and disease. *Front Mol Neurosci.* 2013 ;**6**: 51.
- Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem.* 1979; **57**:56-65.
- Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen YW, Boshnjaku V, Sharma S, Mania-Farnell B, McLone DG, Tomita T, Soares MB, Mayanil CS. Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* 2010; **285**: 36922-36932.
- Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;**10**: 4352-4389.
- Ishibashi M. Molecular mechanisms for morphogenesis of the central nervous system in mammals. *Anat Sci Int.* 2004; **79**: 226-234.

- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res.* 2005; 306: 343-348.
- Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.* 2007; 8: R173.
- 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.
- Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 1993; **86**: 703-708.
- Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 2006; **3**: 27-29.
- Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, Suderman M, Hallett M, Kimmins S. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun.* 2013; 4: 2889.
- Li Y, Saldanha SN, Tollefsbol TO. Impact of epigenetic dietary compounds on transgenerational prevention of human diseases. *AAPS J.* 2014; 16: 27-36.
- Lin YC, Hsieh LC, Kuo MW, Yu J, Kuo HH, Lo WL, et al. Human TRIM71 and its nematode homologue are targets of let-7 microRNA and its zebrafish orthologue is essential for development. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 2525-2534.
- 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: 174-180.
- Lo CL, Zhou FC. Environmental alterations of epigenetics prior to the birth. *Int Rev Neurobiol.* 2014;115:1-49.
- Machka C, Kersten M, Zobawa M, Harder A, Horsch M, Halder T, Lottspeich F, Hrabe' de Angelis M, Beckers J. 2005. Identification of Dll1 (Delta1) target genes during mouse embryogenesis using differential expression profiling. *Gene Expr Patterns* 6: 94-101.
- Maller Schulman BR, Liang X, Stahlhut C, DelConte C, Stefani G, Slack FJ. The let-7 microRNA target gene, Mlin41/Trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle.* 2008; 7: 3935-3942.
- McKay JA, Williams EA, Mathers JC. Folate and DNA methylation during in utero development and aging. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32: 1006-1007.
- McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; **102**: 82-89.
- Meza-Sosa KF, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L. microRNAs: key triggers of neuronal cell fate. *Front Cell Neurosci.* 2014, 8: 175.
- Meza-Sosa K, Valle-García D, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L (2012). Role of microRNAs in central nervous system development and pathology. *J. Neurosci.Res.* 90, 1-12.

- Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr Bull* 2008; **29**: S101-S111.
- Petri R, Malmevik J, Fasching L, Åkerblom M, Jakobsson J. miRNAs in brain development. *Exp Cell Res*. 2014;321: 84-89.
- Raznahan A, Greenstein D, Lee NR, Clasen LS, Giedd JN. Prenatal growth in humans and postnatal brain maturation into late adolescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 11366-11371.
- Rybak,A., Fuchs,H., Hadian,K., Smirnova,L., Wulczyn,E.A., Michel,G., Nitsch,R., Krappmann,D. and Wulczyn,F.G. (2009) The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat. Cell Biol.*, 11: 1411-1420.
- Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K. MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J* 2011; **278**: 1598-1609.
- Shookhoff JM, Gallicano GI. A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. *Genesis*. 2010; 48: 282-294.
- Slamberová, R., Pomětlová, M., and Charousová, P. (2006) Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 82-88.
- Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM (2004) A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* 1: 47-53.
- Tonkiss J, Harrison RH, Galler JR. Differential effects of prenatal protein malnutrition and prenatal cocaine on a test of homing behavior in rat pups. *Physiol Behav*. 1996; 60:1013-1018.
- Wallin J, Wilting J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, Balling R. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 1994; **120**: 1109-1121.
- Wang BX, Yin BL, He B, Chen C, Zhao M, Zhang WX, Xia ZK, Pan YZ, Tang JQ, Zhou XM, Yin N. Overexpression of DNA damage-induced 45 α gene contributes to esophageal squamous cell cancer by promoter hypomethylation. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; **31**: 11.
- Yan L, Zhao L, Long Y, Zou P, Ji G, Gu A, Zhao P. Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offsprings: evidence from 25 case-control studies. *PLoS One* 2012; 7: e41689.
- Yi R, Fuchs E. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *J Cell Sci*. 2011;124: 1775-1783.
- Zhang TY, Meaney MJ. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu. Rev. Psychol.* 61, 439-466 (2010).
- Zhang X, Liu H, Cong G, Tian Z, Ren D, Wilson JX, Huang G. Effects of folate on Notch signaling and cell proliferation in neural stem cells of neonatal rats in vitro. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2008; 54: 353-256.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effects of methyl donor deficiency and folic acid supplementation on rat fetus morphometric properties and developmental abnormalities. (A-C) General morphometric measurements in control (C), methyl donor deficient (MDD), supplemented control (C-B9) and supplemented deficient (MDD-B9) fetuses at embryonic day (E) 20 ($10 \leq n \leq 81$). Data are reported as means \pm standard deviation. Statistically significant differences between control and MDD rats: $**P < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ}P < 0.01$. (D-E) Occurrence of developmental abnormalities in control and MDD fetuses at E9, E13 and E16 stages ($15 \leq n \leq 38$), and following folic acid supplementation at E20 ($37 \leq n \leq 64$). Statistically significant differences between control and MDD rats: $**P < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ}P < 0.01$. (F) Illustrations of developmental abnormalities occurring in methyl donor deficient rats: growth retardation, conjoined fetuses, digit malformations. (G) Prevalence of “twisted tail” in controls, MDD and supplemented rats. (H) Photographs of the vertebral canal (Alcian blue/Alizarin red staining) in the various experimental groups (square brackets delineate open canal).

Figure 2: Brain defects associated with methyl donor deficiency in rat fetuses: influence of folic acid supplementation. (A) Brain weight in control (C), methyl donor deficient (MDD), supplemented control (C-B9) and supplemented deficient (MDD-B9) fetuses at E20 ($15 \leq n \leq 29$). Statistically significant differences between control and MDD rats: $**P < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ}P < 0.01$. (B-D) thicknesses of hippocampal CA1 pyramidal cell layer, granular cell layer of the dentate gyrus (DG), and subventricular zone (SVZ) at E20 ($12 \leq n \leq 21$). Statistically significant differences between control and MDD rats: $**P < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ}P < 0.01$. (E) Improper interhemispheric junction and cerebellar vermis closure (delineated by dotted line areas) in MDD rat fetuses at E20, and beneficial effects of folic acid supplementation (arrows). (F) Prevalence of defective closure of the cerebellar vermis in the various experimental groups. Statistically significant differences between control and MDD rats: $**P < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ}P < 0.01$.

Figure 3: Effects of methyl donor deficiency on the expression of let-7 and miR-34: influence of folic acid supplementation. (A) Expression levels of let-7 in arbitrary units (AU) in the midbrains of control (C) and deficient (MDD) rat embryos at E16 and E20, and effects of folic acid (B9) supplementation. (B) Expression levels in control (C) and B9-deficient (MDD) H19-7 hippocampal cells after induction of their differentiation. (C) Expression levels of miR-34 in the midbrains of control and deficient rat embryos, and effects of folic acid supplementation. (D) Expression levels in control and B9-deficient H19-7 cells. All data are reported as means \pm S.D ($12 \leq n \leq 24$). Statistically significant differences between control and MDD: $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ}P < 0.05$ and $^{\circ\circ}P < 0.01$.

Figure 4: Transcriptional alteration of relevant experimentally documented or bioinformatically predicted gene targets of let-7a in fetal brain under methyl donor deficiency: effects of folic acid supplementation. qPCR analysis was performed by means of Rat microRNA Targets RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen) monitoring 84 specific genes. Biological samples were obtained from the brains of two to three E20 fetuses for each condition and were tested in duplicate in separate plates. (A) Mean downregulation (\pm S.D.) in methyl donor deficient (MDD) and supplemented deficient (MDD-B9) fetuses. (B) Percentage of genes downregulated by more than 3-fold. (C) Downregulation of selected target genes involved in embryonic development and cell fate. Statistically significant differences between MMD and MDD-B9: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5: Transcriptional alteration of relevant experimentally documented or bioinformatically predicted gene targets of miR-34a in fetal brain under methyl donor deficiency: effects of folic acid supplementation. qPCR analysis was performed by means of Rat microRNA Targets RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen) monitoring 84 specific genes. Biological samples were obtained from the brains of two to three E20 fetuses for each condition and were tested in duplicate in separate plates. (A) Mean downregulation (\pm S.D.) in methyl donor deficient (MDD) and supplemented deficient (MDD-B9) fetuses. (B) Percentage of genes downregulated by more than 3-fold. (C) Downregulation of selected target genes involved in embryonic development and cell fate. Statistically significant differences between MMD and MDD-B9: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6: Effects of methyl donor deficiency and folic acid supplementation on Trim71, a target of let-7. Consequences of silencing let-7a on differentiating H19-7 cells. (A) Western blot analyses of Trim71 expression in the midbrain of control (C) and deficient (MDD) E20 fetuses and effect of acid folic (B9) supplementation. Similar findings were obtained from 3 other experiments. (B) Summary of events involved in the consequences of methyl donor deficiency in the rat brain (see discussion). (C) Expression levels of Trim71 and effects of let-7 siRNA in control (C) and folate-deficient (MDD) H19-7 cells at 13h after induction of differentiation (Si- = non-targeting siRNA, Si+ = let-7 targeted siRNA). Expression patterns are representative of 4 separate series of Western blots. (D) Average number of cell processes per cell. (E) Mean axon length. For (D) and (E): statistically significant difference with the respective control: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$; statistically significant difference between Si- and Si+: $^{\circ}P < 0.05$ (n=5). (F) Representative influence of let-7 siRNA on cell morphology at 13h after induction of differentiation. Cells are colabeled with antibodies against actin (green) and NF68 (red) and their nuclei counterstained by Dapi (blue).

Figure 7: Effects of methyl donor deficiency and folic acid supplementation on Notch signaling proteins, targets of miR-34. Consequences of silencing miR-34a on differentiating H19-7 cells. (A) Western blot analyses of Notch signaling proteins expression in the midbrain of control (C) and deficient (MDD) E20 fetuses and effect of acid folic (B9) supplementation. Similar findings were obtained from 3 other experiments. (B) Expression levels of Notch signaling proteins and effects of miR-34 siRNA in control (C) and folate-

deficient (MDD) H19-7 cells at 13h after induction of differentiation (Si- = non-targeting siRNA, Si+ = miR-34 targeted siRNA). Expression patterns are representative of 4 separate series of Western blots. (C) Summary of events involved in the consequences of methyl donor deficiency in the rat brain (see discussion). (D) Average number of cell processes per cell. (E) Mean axon length. For (D) and (E): statistically significant difference with the respective control: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$; statistically significant difference between Si- and Si+: $^{\circ}P < 0.05$ (n=5).

Supplementary information

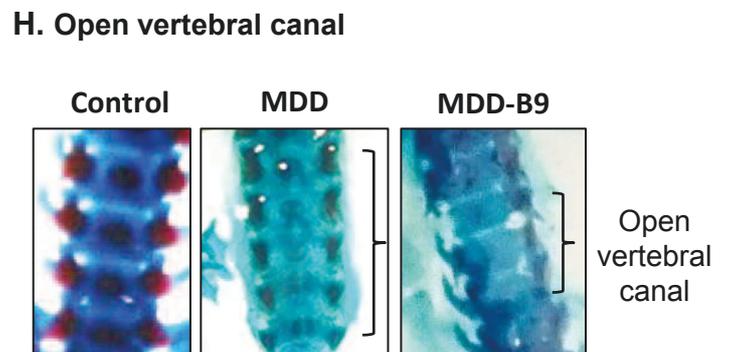
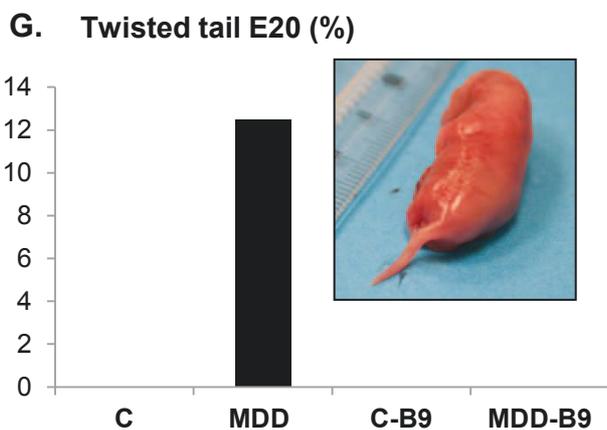
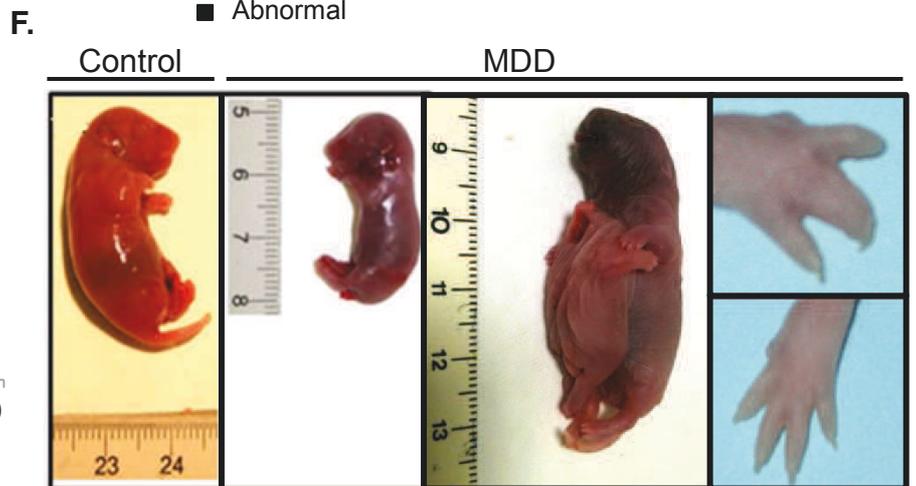
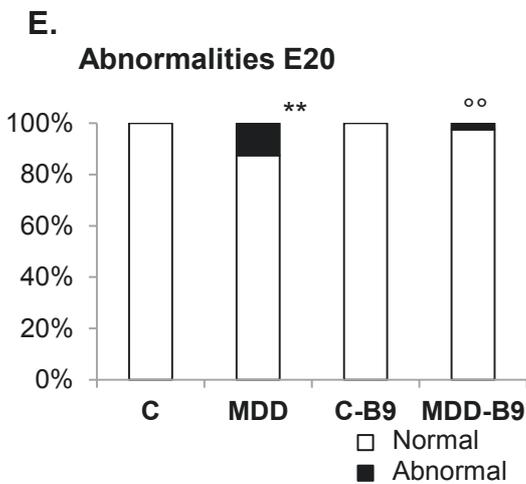
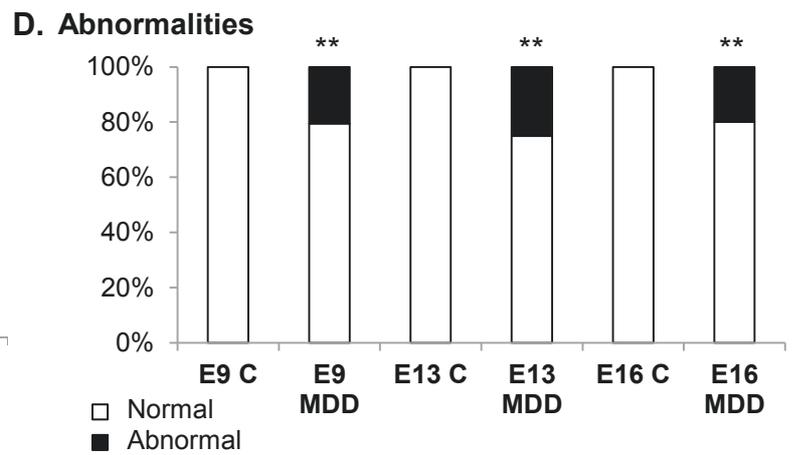
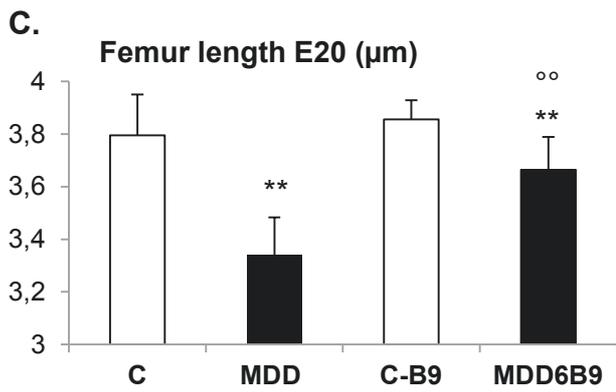
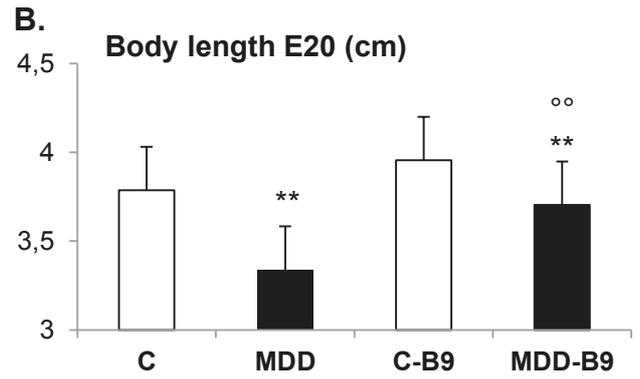
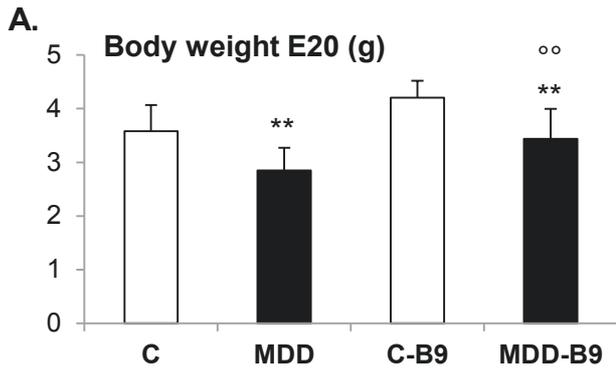
Supplementary Figure S1: Effects of methyl donor deficiency and folic acid supplementation on the expression of let-7a as depicted by *in situ* hybridization in the hippocampus, cerebellum and cerebral cortex from E20 fetuses.

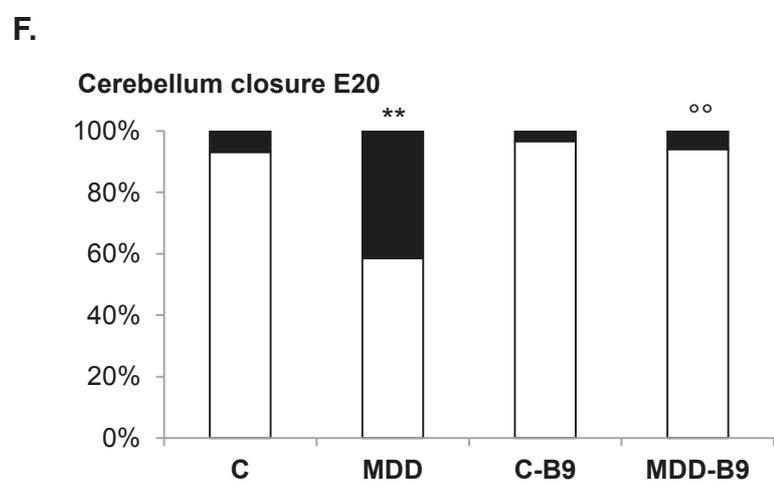
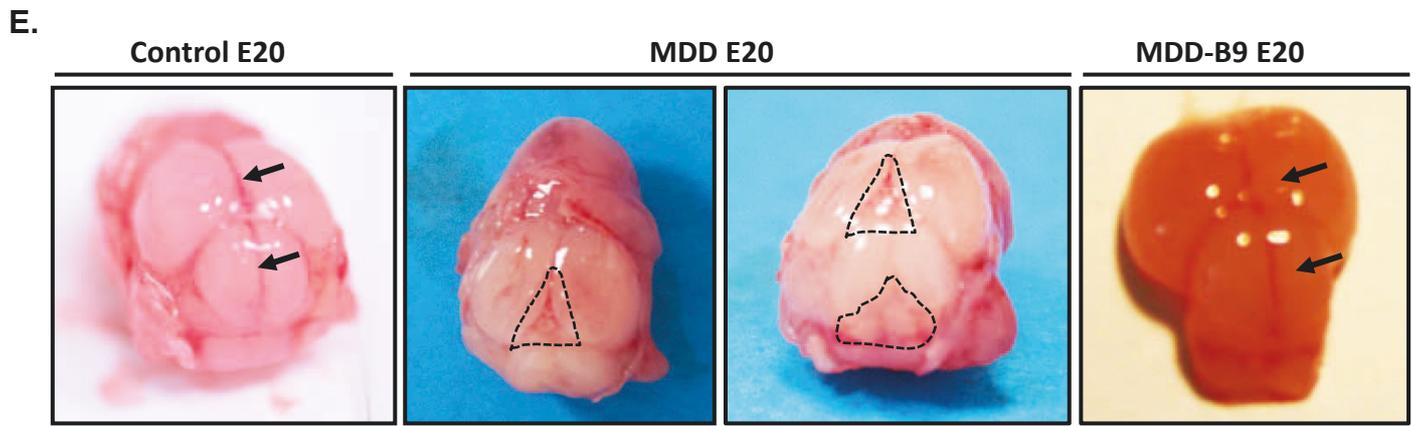
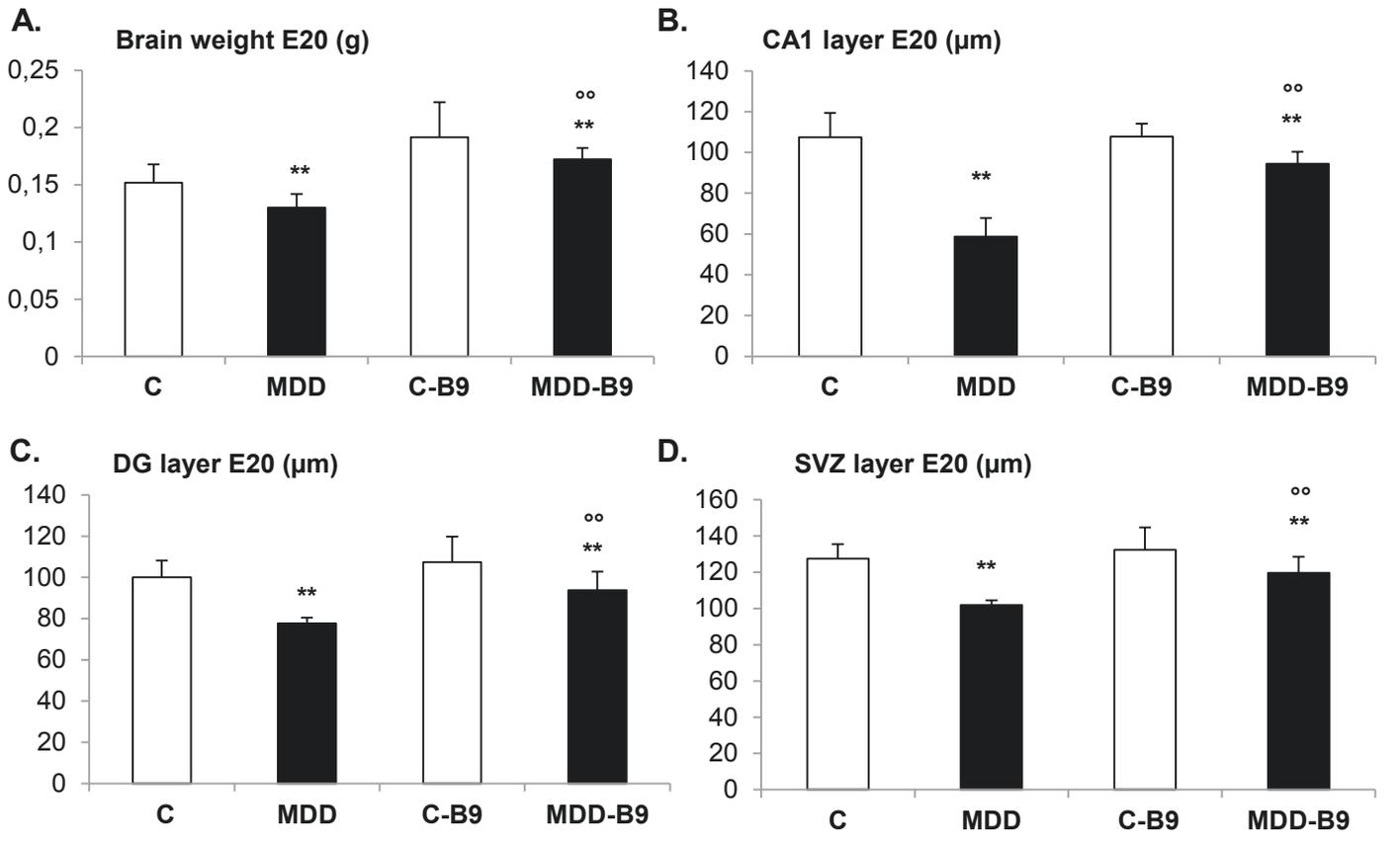
Supplementary Figure S2: Effects of methyl donor deficiency and folic acid supplementation on the expression of miR-34a as depicted by *in situ* hybridization in the hippocampus, cerebellum and cerebral cortex from E20 fetuses.

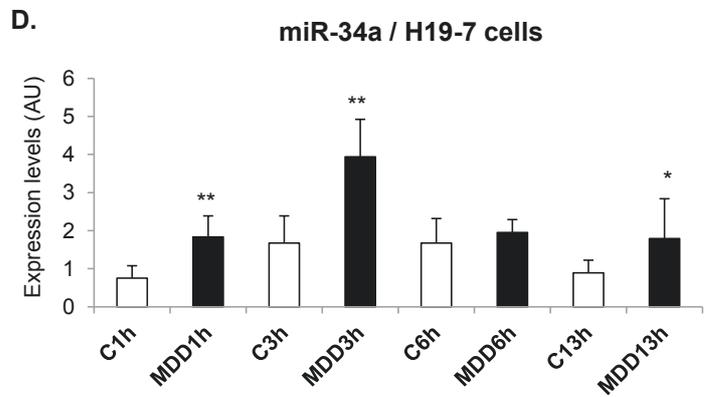
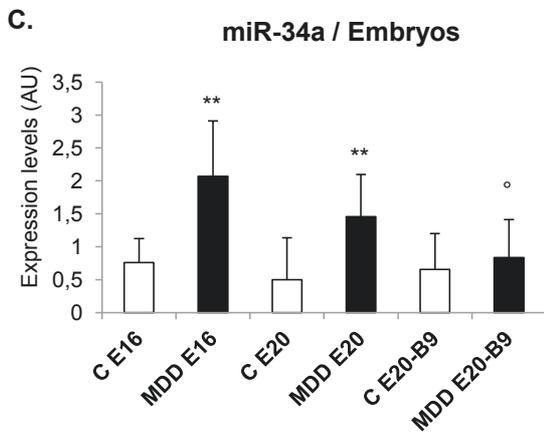
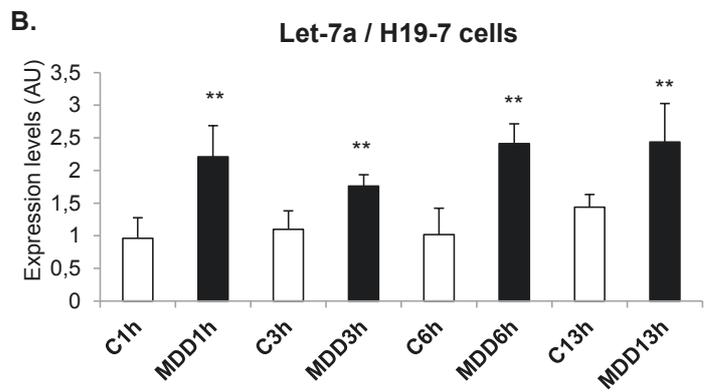
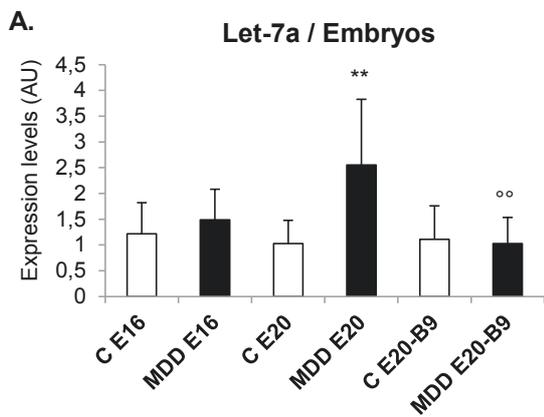
Supplementary Figure S3: Downregulation of let-7a gene targets, according to their known functions, in methyl donor deficient (MDD) and supplemented deficient (MDD-B9) brain fetuses. Statistically significant differences between MMD and MDD-B9: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Supplementary Figure S4: Downregulation of miR-34a gene targets, according to their known functions, in methyl donor deficient (MDD) and supplemented deficient (MDD-B9) brain fetuses. Statistically significant differences between MMD and MDD-B9: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

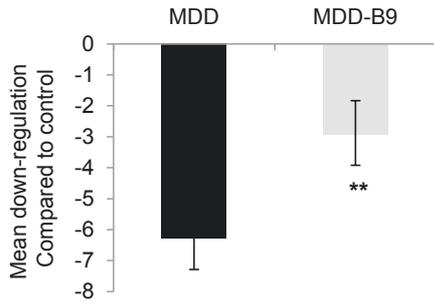
Supplementary Figure S5: Consequences of miR-34a silencing on the morphology of control and folate-deficient (MDD) H19-7 cells at 13h after induction of their differentiation (Si- = non-targeting siRNA, Si-miR-34a = miR-34a targeted siRNA). Cells are colabeled with antibodies against actin (green) and NF68 (red) and their nuclei counterstained by Dapi (blue).



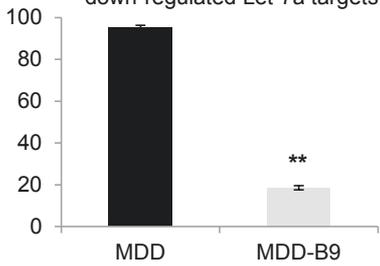




A. Let-7a targets (n=84)



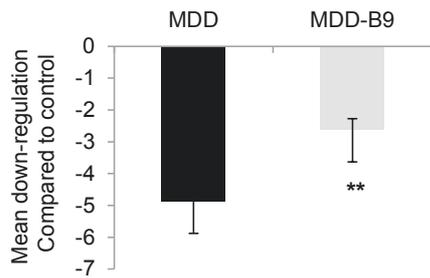
B. Percentage of more than 3 fold down-regulated Let-7a targets



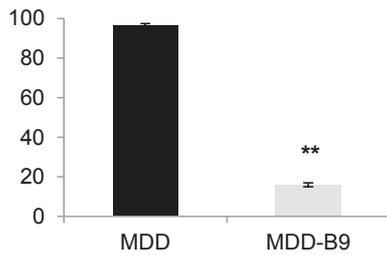
C. Embryonic development, Cell fate

			Down-regulation compared to control	
Abbreviation	Name	Function	MDD	MDD-B9
Hoxa9	Homeobox A9	Embryonic skeletal development Anterior/posterior patterning	-3.43	-1.55*
Mycn	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene,	Embryonic skeletal system morphogenesis	-4.67	-1.85**
Mtpn	Myotrophin	Prenatal muscle differentiation Cerebellar development	-4.95	-2.17**
Tgfbr1	Transforming growth factor, beta receptor 1	Embryonic cranial skeletal system morphogenesis Anterior/posterior patterning	-5.71	-2.38**
Trim71	Tripartite motif-containing 71	Neural tube closure RNA-binding	-3.54	-2.89
Prdm1	PR domain containing 1	Germ cell lineage	-4.43	-1.97**
Wnt1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	Cell fate and patterning during development Forebrain anterior/posterior pattern specification Midbrain-hindbrain boundary maturation	-4.76	-2.48*
Nr2e1	Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1	Neural cell fate	-4.37	-1.69**
Col1a2	Collagen, type I, alpha 2	Skeletal system development, Notch signaling	-4.93	-4.01
Nphp3	Nephronophthisis 3	Wnt signaling, gastrulation, organ identity	-6.08	-3.16**
Gdf6	Growth differentiation factor 6, BMP13	Spinal segmentation	-5.48	-2.51**
Pbx3	Pre-B-cell leukemia homeobox 3	Spinal cord development Lineage segregation	-6.28	-1.97**

A. miR-34a targets (n=84)

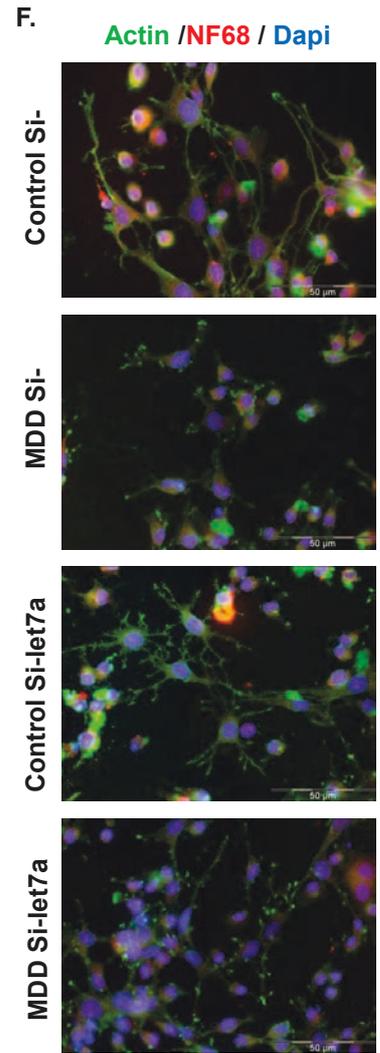
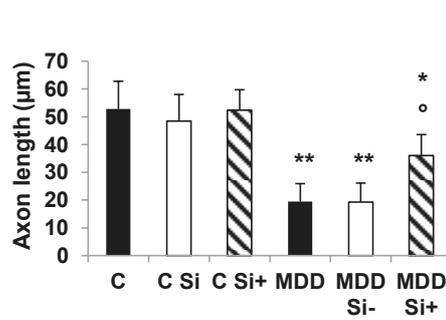
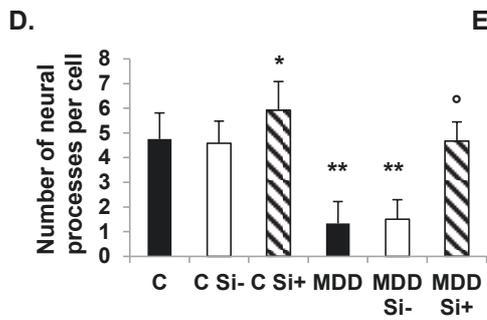
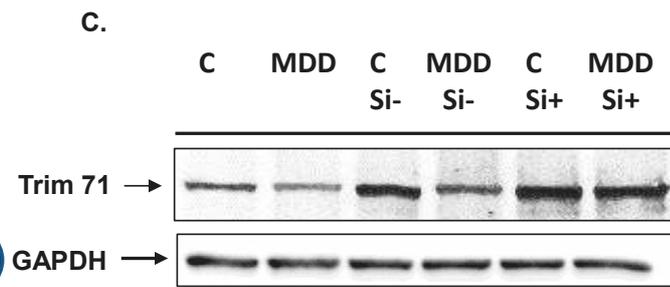
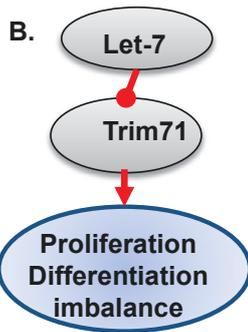
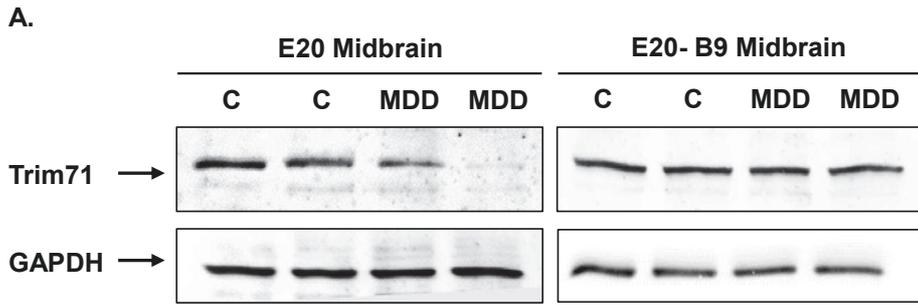


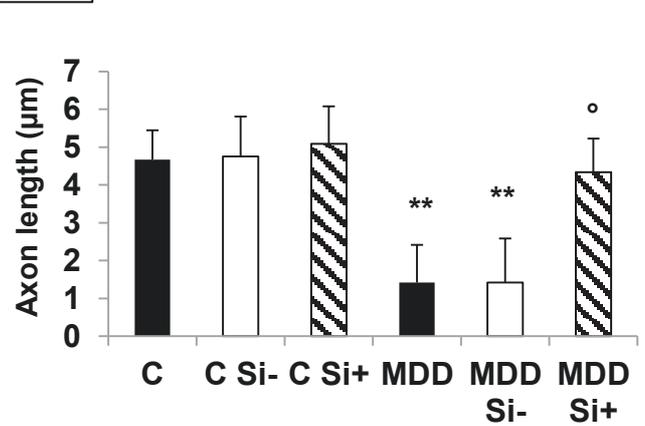
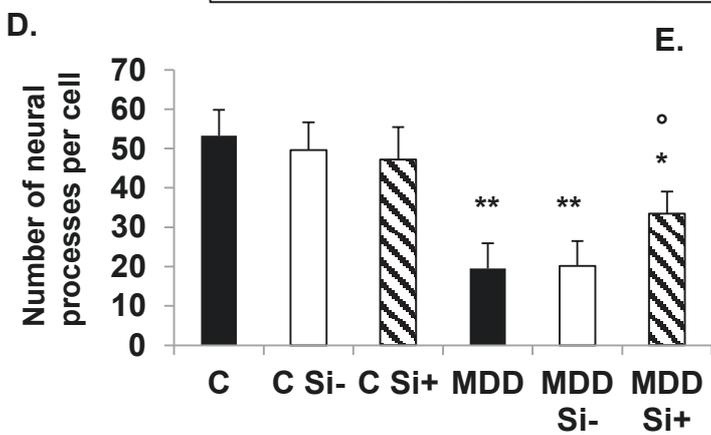
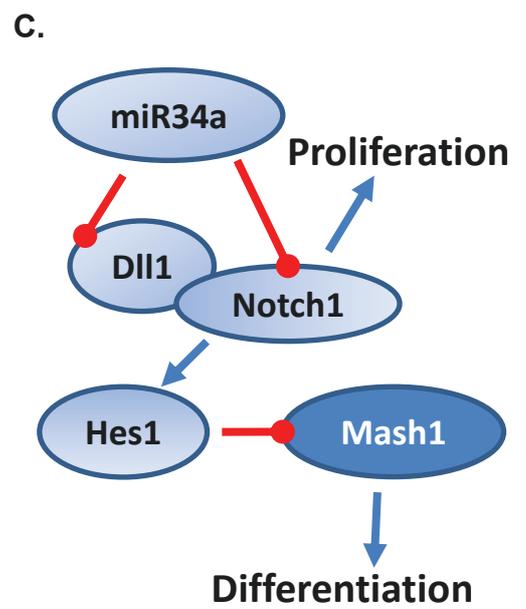
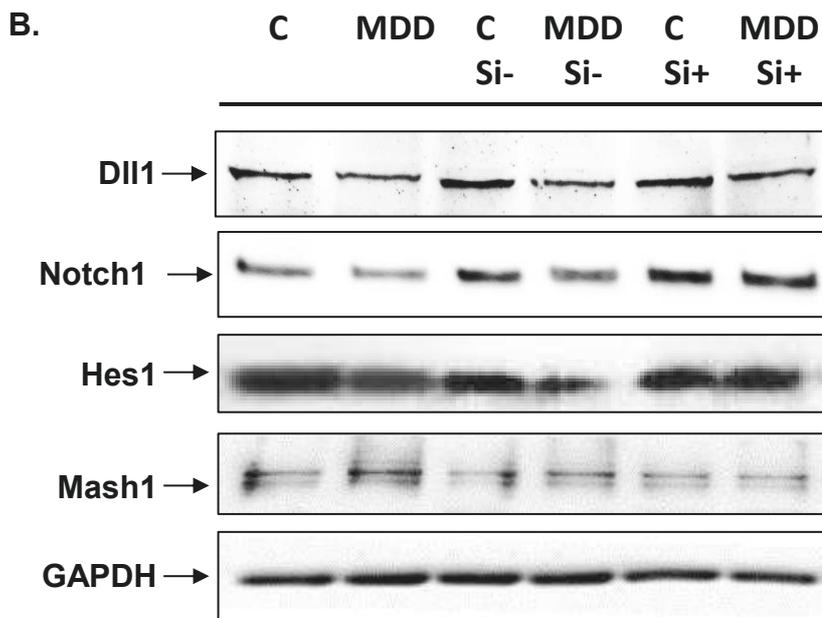
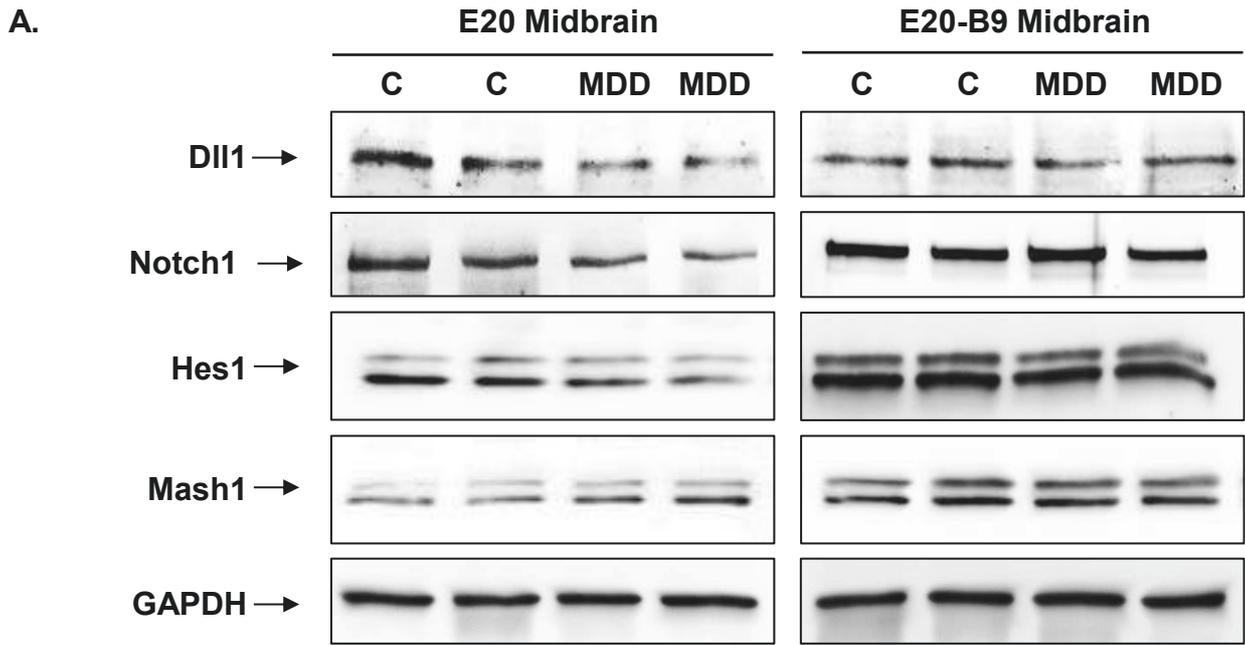
B. Percentage of more than 3 fold down-regulated miR-34a targets



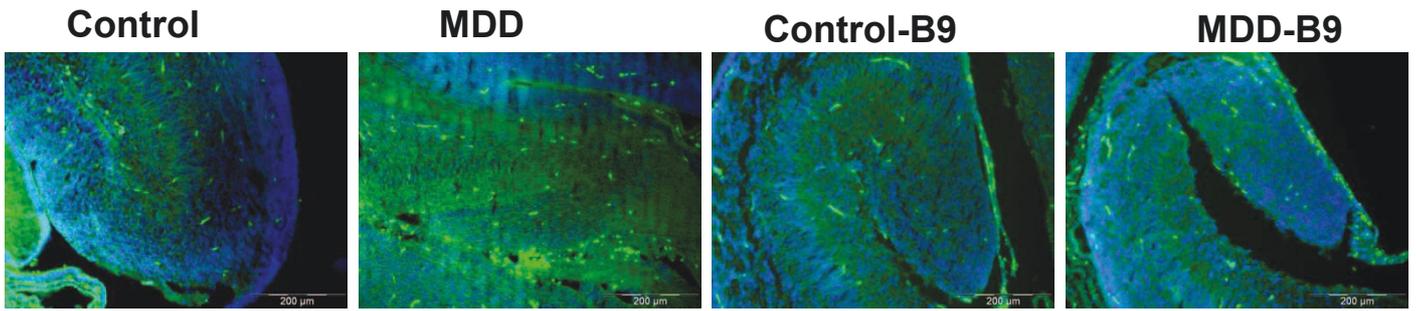
C. Embryonic development, Cell fate

Abbreviation	Name	Function	Down-regulation compared to control	
			MDD	MDD-B9
Met	Met proto-oncogene	Cerebral cortex development	-6.38	-3.13*
Mycn	V-myc myelocytomatosis viral related oncogene,	Embryonic skeletal system morphogenesis	-4.96	-2.19**
Dll1	Delta-like 1	Notch ligand, cell fate decision	-5.26	-2.53**
Jag1	Jagged 1	Notch ligand, cell fate decision	-4.1	-2.7
Notch1	Notch 1 receptor	Notch signaling pathway, cell fate decision Brain development	-5.58	-3.39*
Notch2	Notch 2 receptor	Notch signaling pathway, cell fate decision, left/right symmetry	-4.89	-3.06*
Wnt1	Wingless-type MMTV integration site family, member 1	Cell fate and patterning during development Forebrain anterior/posterior pattern specification Midbrain-hindbrain boundary maturation	-4.81	-2.46**
Axin2	Axin 2	Negative regulator of the Wnt signaling pathway Inhibitor of dorsal/ventral axis formation	-5.26	-3.26*
Lef1	Lymphoid enhancer binding factor 1	Wnt signaling,	-3.84	-2.94
Mlt3	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	Wnt signaling, anterior/posterior specification	-4.65	-2.01**
Ddx17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	Poly(A) RNA binding Helicase Posterior embryonic development	-4.62	-2.57*
Dmwd	Dystrophia myotonica, WD repeat containing	Brain development, synaptic connection	-4.93	-2.57*
Trim 67	Tripartite motif-containing 67	Neuron projection development	-4.95	-2.65
Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor	Embryonic cranial skeleton formation	-4.68	-3.44
Satb2	SATB homeobox 2	Embryonic pattern specification. Associated with cleft palate and mental retardation	-2.92	2.58**

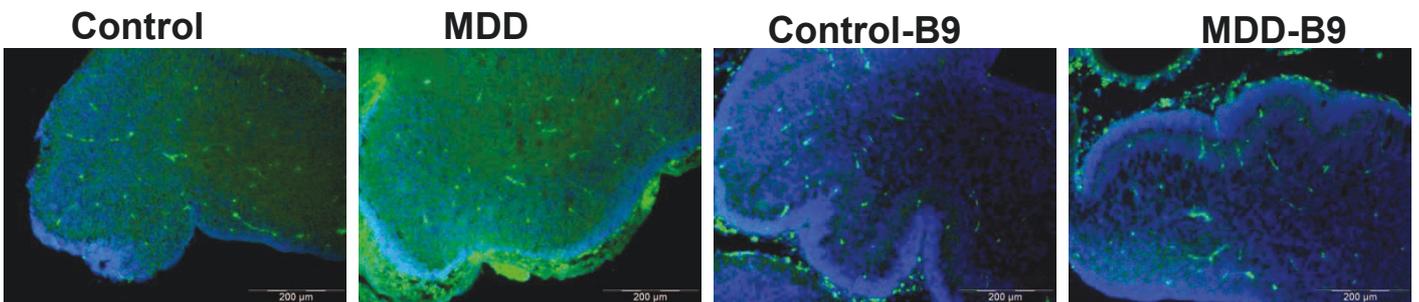




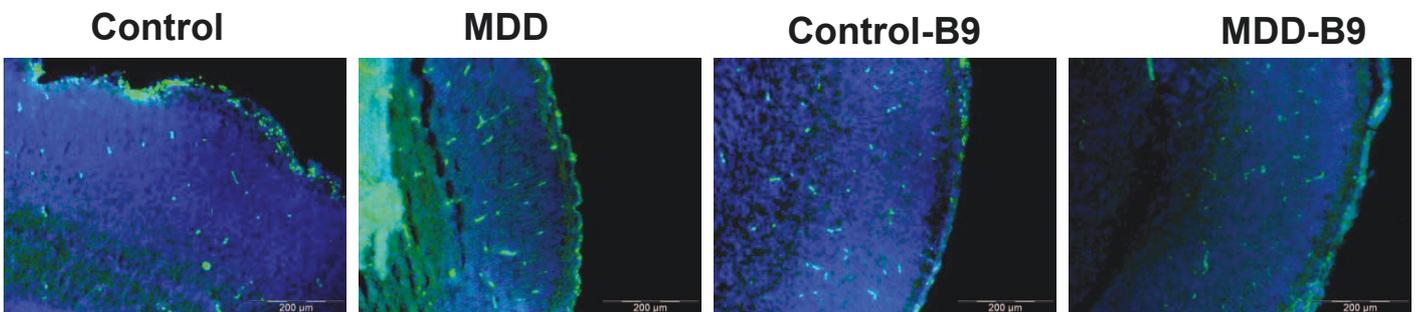
A **Let-7/DAPI Hippocampus**



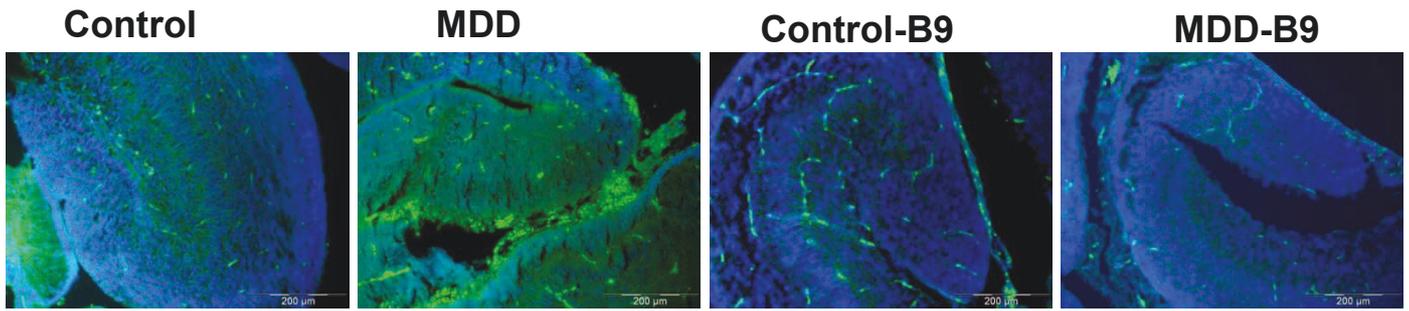
B **Let-7/DAPI - Cerebellum**



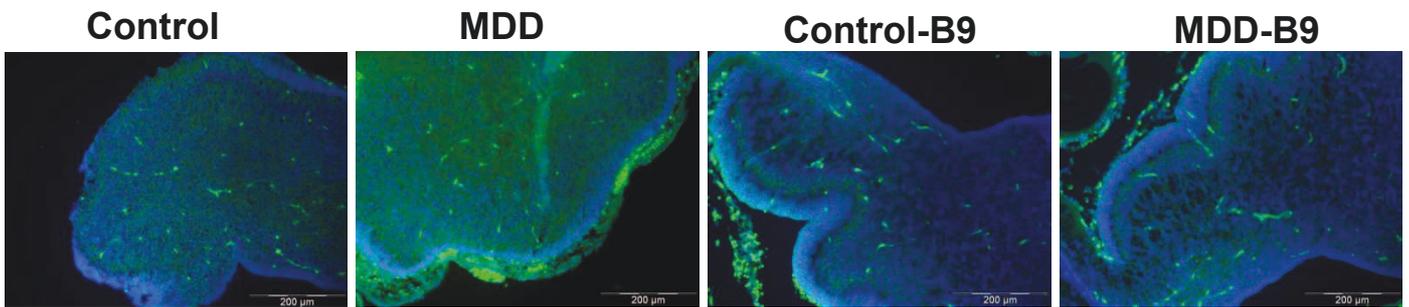
C **Let-7/DAPI - Cortex**



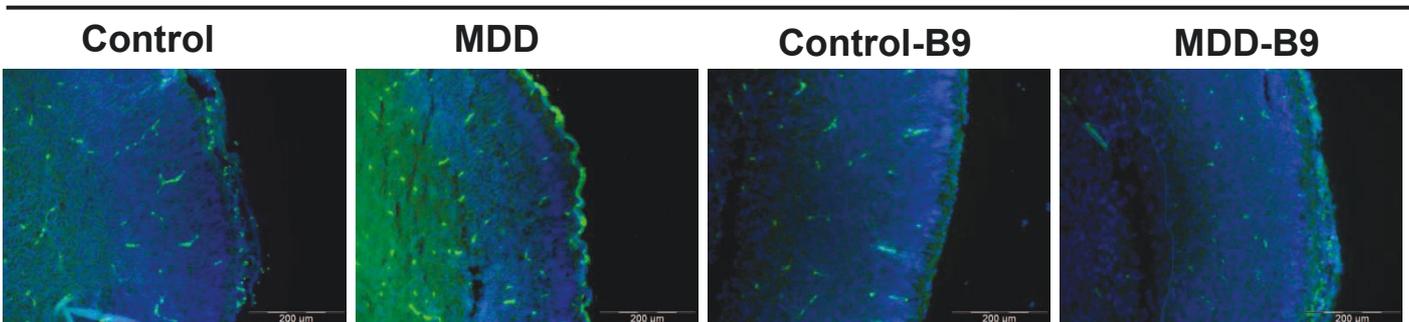
A **miR34/DAPI Hippocampus**



B **miR34/DAPI - Cerebellum**



C **mir34/DAPI - Cortex**



Let7a

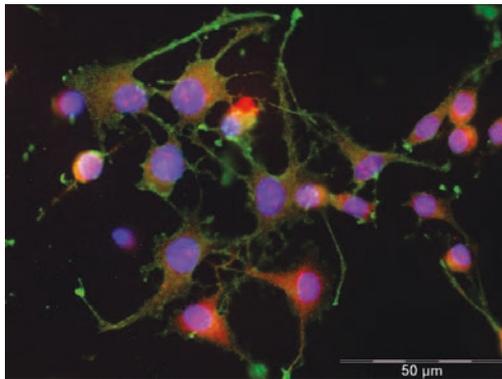
Cell migration, axon guidance, cytoskeleton			Down-regulation compared to control	
Symbol	Name	Function	MDD	MDD-B9
Itgb3	Integrin, beta 3	Cell motility	-4.42	-2.73 *
Lrig2	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2	Innervation, neurite outgrowth, synapses formation	-5.92	-2.89*
Nf2	Neurofibromin 2 (merlin)	Cytoskeleton organization, embryonic development	-5.09	-2.28**
Plxnc1	Plxnc1	Cell motility, axon guidance	-6.82	-3.07**
Coll3a1	Collagen, type III, alpha 1	Axon guidance, cerebral cortex development	-3.94	-2.70
Cell cycle			Down-regulation compared to control	
Ccna2	Cyclin A2	G1/S and G2/M transition	-4.69	-1.82**
Ccnd1	Cyclin D1	G1/S transition, Notch signaling	-5.05	-3.00*
Ccnd2	Cyclin D2	G1/S transition	-4.42	-1.63**
Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog A	G1/S transition, DNA damage	-5.48	-2.56*
Cdc34	Cell division cycle 34 homolog	ubiquitin-mediated degradation of cell cycle G1 regulators	-5.39	-2.53*
Cdk6	Cyclin-dependent kinase 6	G1/S transition, Notch signaling	-4.43	-1.97**
E2f1	E2F transcription factor 1	G1/S transition, Notch signaling, DNA damage	-3.52	-2.19
Uhrf2	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2	G1 arrest	-4.99	-2.28**
Myc	Myelocytomatosis oncogene	p53-dependent G2 arrest, Notch signaling, Wnt signaling	-6.47	-2.63**
Ppp2r2a	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha isoform	G2/M transition	-5.59	-2.39*
Cntrl	Centrosomal protein 110	G2/M transition	-6.10	-2.32**
Cep135	Centrosomal protein 135	G2/M transition, implicated in microcephaly	-6.05	-2.27**
RNA trafficking			Down-regulation compared to control	
Dicer	Dicer 1, ribonuclease type III	miRNA processing, cerebral cortex development	-5.79	-2.16**
IGFBP1	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	mRNA stability	-3.43	-1.81*
Raver2	Ribonucleoprotein, PTB-binding 2	Poly(A) RNA-binding protein	-6.30	-3.02**
Lin28a	Lin-28 homolog	Pre-miRNA processing	-11.70	-11.71
IGFBP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	RNA binding, regulation of translation during late development	-4.71	-2.35*
Ago4	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 4	SiRNA mediated gene silencing, Stem cell maintenance	-5.87	-2.71**
Ddx19b	DEAD (Asp-Glu-Ala-As) box polypeptide 19B	RNA helicase, mRNA export from the nucleus	-5.14	-2.21**

miR-34a

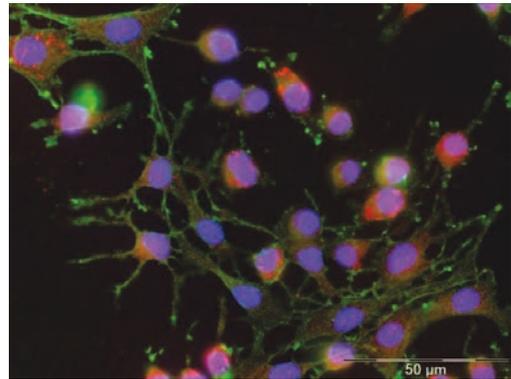
Cell migration, axon guidance, cytoskeleton			Down-regulation compared to control	
Symbol	Name	Function	MDD	MDD-B9
FoxP1	Forkhead box P1	Neuron migration, axon guidance, embryonic development	-6.05	-2.08**
Nav3	Neuron navigator 3	Neuron navigator family, axon guidance	-6.19	-3.26*
Nrn1	Neuritin 1	Promote neurites outgrowth	-4.94	-3.05*
Cd44	Cd44 molecule	Adhesion molecule, cell migration, cartilage development, Wnt signaling	-2.45	-2.36
Myh9	Myosin, heavy chain 9, non-muscle	Cell motility	-4.35	-3.04
Coroc1c	Coronin, actin binding protein 1C	Cell motility	-5.52	-2.78**
Arpp19	CAMP-regulated phosphoprotein 19	NGF signaling, post-transcriptional control of neuronal genes expression.	-5.16	-2.76**
Ctnnd2	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2	Cellular junction, post-synaptic density, brain development	-4.91	-2.73*
Cell cycle			Down-regulation compared to control	
Ccne2	Cyclin E2	G1/S transition, regulates Cdk2	-4.69	-2.74*
Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog A	G1/S transition, DNA damage	-5.29	-2.88**
Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4	G1/S and G2/M transition	-4.73	-2.42*
Cdk6	Cyclin-dependent kinase 6	G1/S transition, Notch signaling	-4.17	-2.07**
E2f3	E2F transcription factor 3	Bind to pRB to regulate the expression of genes involved in the cell cycle	-5.22	-2.74*
Myc	Myelocytomatosis oncogene	p53-dependent G2 arrest, Notch signaling, Wnt signaling	-6.69	-2.54**
Vesicular trafficking, synapse			Down-regulation compared to control	
Flot2	Flotillin 2	Neuronal signaling, caveolae-associated membrane protein	-5.32	-2.64**
Syt1	Synaptotagmin I	Neurotransmitter exocytosis and vesicle trafficking	-5.05	-2.99*
Syn2	Synapsin II	Synaptic vesicle trafficking	-5.73	-2.89**
Vat1	Vesicle amine transport protein 1 homolog	Cholinergic vesicle trafficking	-4.90	-2.83*
Neto1	Neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	Synaptic plasticity	-6.19	-2.28**
Sar1a	SAR1 homolog A	Vesicle mediated transport	-4.62	-2.53*
Trim9	Tripartite motif-containing 9	Synaptic vesicle exocytosis	-5.45	-2.88*
Snx15	Sorting nexin 15	Endosomal trafficking	-4.96	2.46**

Actin /NF68 / Dapi

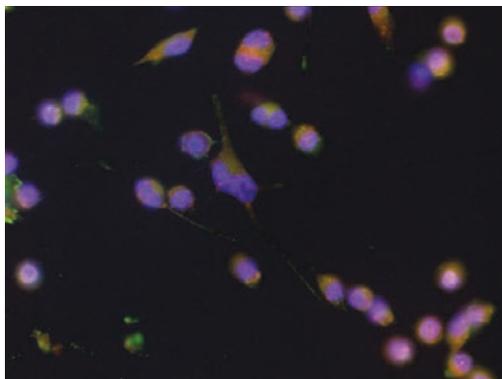
Control Si-



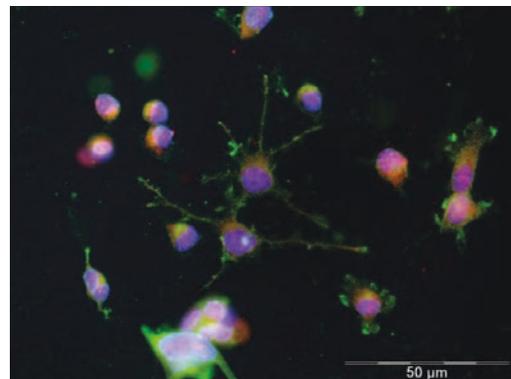
Control Si-miR34a



MDD Si-



MDD Si-miR34a



3^{ème} partie : Une carence précoce en donneurs de méthyles engendre des altérations de la plasticité synaptique par dérégulation de l'activité des microARNs sur les récepteurs ionotropiques au glutamate. Effets bénéfiques d'une supplémentation périnatale en folates.

Objectif de l'étude

Le développement cérébral est un phénomène dynamique dont le bon déroulement est lié à l'expression adaptée de facteurs intrinsèques (gènes du développement, ...) pouvant être modulée par des facteurs extrinsèques (alimentation, médication, ...). La période critique du développement correspond au 1^{er} tiers de la grossesse, au cours de laquelle toute anomalie majeure conduit à un arrêt spontané du développement. Les deux derniers tiers consistent en une croissance des organes et à une maturation fonctionnelle. Pour certains organes comme le cerveau, la maturation se poursuit au-delà de la naissance. La période périnatale est le siège d'une maturation cérébrale structurale et fonctionnelle, notamment sous la dépendance de la stimulation du système nerveux central. L'activité des voies sensitives afférentes contribue à la mise en place des réseaux neuronaux par le biais de la sélection neuronale. La stimulation de certains circuits aboutit au renforcement et à la création de nouvelles synapses tandis que le manque de stimulation mène à leur élimination. La sélection neuronale, responsable de la destruction d'un grand nombre de synapses est indispensable à la maturation fonctionnelle du cerveau. C'est un processus long qui commence dès la naissance et s'achève au cours de l'adolescence, et qui constitue une étape primordiale de la maturation cérébrale puisqu'un défaut de sélection des circuits neuronaux contribue à diverses pathologies telles que l'épilepsie.

Le modèle animal de carence gestationnelle en donneurs de groupements méthyles présente un certain nombre d'anomalies du neurodéveloppement, comme l'atrophie de couches intra-cérébrales, associée à un retard d'acquisition des fonctions motrices, d'apprentissage et de mémorisation. Le déficit cognitif qui en résulte persiste chez les animaux adultes, après un retour à une alimentation normale au moment du sevrage. Les altérations comportementales observées pourraient être liées à un défaut de plasticité synaptique. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus sur le modèle cellulaire qui présente une

atrophie axonale et une forte réduction du nombre de neurites associée à une réduction du nombre de bourgeons dendritiques.

La plasticité synaptique est un phénomène indispensable au processus de mémorisation à court et à long terme, essentiellement au niveau de l'hippocampe qui est le siège des processus impliqués dans la cognition. La plasticité synaptique est le résultat d'une balance entre deux mécanismes antagonistes : la potentialisation à long terme et la dépression à long terme. Ces deux mécanismes sont régulés par le nombre et l'activité des récepteurs au glutamate au niveau de la synapse. Chez le jeune individu, les récepteurs glutamatergiques AMPA1/2 et NMDA1/2A sont prédominants dans l'hippocampe. Une altération des gènes en condition de carence pourrait modifier l'expression de ces récepteurs ionotropiques, de même que leur activation par un défaut des mécanismes de phosphorylation et une altération des voies de signalisation liée aux récepteurs NMDA.

Les miRs interviennent à tous les stades du développement cérébral et sont des acteurs de la régulation des mécanismes de maturation. Nous avons montré que la carence fait varier un certain nombre de miRs dans différentes régions cérébrales dont l'hippocampe. Un panel de miRs interviendrait dans la plasticité synaptique, notamment miR-132 et miR-137 dont la présence module la synaptogenèse, mais aussi Let-7a, miR-9, miR-23a, miR-34a et miR-124a. Parmi eux, miR-124 est prédit par bioinformatique pour être un régulateur potentiel de AMPAR2, tandis que des études mettent en évidence le rôle de Let-7 dans la régulation de AMPAR2 et de miR-132 dans celle de AMPAR1, NMDAR2A et NMDAR2B, par des mécanismes indirects non élucidés.

Puisque la supplémentation périnatale semble aider au bon déroulement des processus de développement cérébral en condition de carence précoce, en maintenant une expression appropriée de certains miRs et de leurs voies de signalisation associées, il est envisageable qu'elle puisse profiter à la maturation cérébrale de manière post-natale.

Dans ce contexte, l'étude vise à étudier l'impact d'une supplémentation tardive en folates, équivalent au troisième trimestre de grossesse chez la femme et au cours de la période de lactation, sur la maturation cérébrale post-natale chez des ratons à J21 (21 jours post-natal, stade du sevrage). Il s'agit d'évaluer l'impact de la supplémentation sur l'activité des voies de signalisation dépendantes des récepteurs ionotropiques au glutamate AMPAR1/2 et NMDAR1/2A qui pourraient faire intervenir les miRs Let-7a, miR-9, miR-23, miR-34a, miR-

124a, miR-132 et miR-137. Le but est de corrélérer ces profils aux défauts cognitifs présents chez les individus carencés, chez lesquels une altération de la plasticité synaptique pourrait être mise en jeu, et d'évaluer le potentiel effet bénéfique d'une supplémentation périnatale en folates.

Synthèse des résultats

Les dosages plasmatiques en vitamines B9 et B12 réalisés à 21 jours révèlent des concentrations significativement ($p < 0,001$) inférieures chez les individus nés de mères carencées (MDD) par rapport aux contrôles (C). Parallèlement, la concentration en homocystéine, est augmentée chez les rats carencés ($p < 0,001$). Dans le groupe carencé supplémenté en acide folique, les taux plasmatiques de B9 et d'homocystéine sont équivalents à ceux des contrôles, sans modification de la quantité de B12 (Effectif : C=39, C-B9=20, MDD=14, MDD-B9=15) (**Figure 41 A**). La taille moyenne des rats du groupe carencé MDD est plus faible de 26%, tandis que le poids est inférieur de 55% par rapport aux rats du groupe contrôle ($p < 0,001$). La supplémentation en folates améliore le phénotype morphologique des rats carencés par rapport au groupe des animaux carencés, avec un gain de poids et de taille atteignant respectivement 22,7% et 9,9% (poids : $p < 0,001$; taille : $p = 0,015$) (**Figure 41 B**). La longueur du fémur reflète la croissance pré- et post-natale. Les rats carencés présentent une diminution de 21% de la taille fémorale par rapport aux contrôles ($p < 0,0001$) tandis que la supplémentation en folate permet une amélioration de 12% ($p < 0,0001$), en accord avec le gain de taille (**Figure 41 C**). Dans les protocoles de carence gestationnelle effectués antérieurement au cours de la période embryonnaire, nous avons recensé des malformations de type spina bifida (canal vertébral ouvert), associées à un phénotype de « queue twistée », à 20 jours de gestation (E20). A l'âge de 21 jours, 12% des rats carencés étaient porteurs d'une queue twistée, 5% des rats carencés supplémentés, et aucun parmi les individus non carencés (**Figure 41 D**). Au niveau du rachis, l'analyse des squelettes colorés a permis de mettre en évidence des anomalies de l'organisation des vertèbres, comme la fusion des vertèbres lombo-sacrées et un retard d'ossification. La supplémentation en folate permet d'améliorer le retard d'ossification, l'organisation des vertèbres lombo-sacrées et le degré de l'ouverture du canal vertébral, ce qui expliquerait la diminution du nombre de queue twistées (**Figure 41 E**).

La taille et le poids des cerveaux des rats à 21 jours sont significativement ($p < 0,001$) inférieurs chez les rats nés de mères carencées par rapports aux témoins, respectivement de 12% et de 29 %. Ces paramètres sont augmentés de 7% pour la taille et de 20% pour le poids suite à la supplémentation en acide folique par rapport aux individus carencés non supplémentés, sans retrouver le niveau des groupes contrôles (différence significative $p < 0,0001$) (**Figure 42 A**). Parmi les données précédemment présentées, 42% des embryons de 20 jours gestationnels présentaient des défauts de fermeture des sutures cérébelleuse et inter-hémisphérique parmi les individus carencés. Le taux de sutures ouvertes était de 6% dans le groupe carencé supplémenté en folates. A J21, aucun défaut de fermeture des sutures cérébrales n'a été observé, quel que soit le groupe expérimental (**Figure 42 B et C**). Les mesures de l'épaisseur de la corne d'Ammon CA1, de la corne d'Ammon CA3, du gyrus denté (GD) permettent de rendre compte du développement neural hippocampique. Les zones CA1, GD, tout comme la SVZ, présentent une épaisseur réduite de l'ordre de 30%, tandis que la couche CA3 est réduite de 20%, chez les animaux carencés par rapport aux contrôles. Pour les rats supplémentés, il a été mis en évidence une augmentation de 20% par rapport aux individus uniquement carencés pour la couche CA1, le GD et la SVZ, et de 15% pour la couche CA3 (**Figure 42 D**).

Plusieurs analyses comportementales ont été réalisées avec des tests psychomoteurs « Righting reflex » et « Negative geotaxis », et des tests cognitifs « Homing test » et « Multi-T maze ». Le test psychomoteur de « Righting reflex » a été pratiqué à 5 et 7 jours et le test de « Negative geotaxis » de 7 jours à 11 jours. Dans ces deux tests d'évaluation des performances sensori-motrices végétatives, un temps plus court pour réaliser le test correspond à de meilleures performances neurocomportementales des individus. Les animaux des groupes carencés, supplémentés ou non, présentent un allongement de la durée nécessaire pour se remettre en position 4 pattes par rapport aux individus contrôles lors du test de righting reflex ($p = 0,031$) (**Figure 43 A**). Ainsi, la supplémentation ne semble pas avoir d'effet sur ce test précoce. Par contre, dans le test de negative geotaxis, il semble que la supplémentation en B9 chez les carencés engendre une amélioration des performances entre les jours 7 et 11 ; comme c'est le cas chez les individus contrôles. Cependant, une erreur de manipulation biaise les résultats pour le groupe contrôle supplémenté (**Figure 43 B**).

Le test de Homing met en jeu les circuits nerveux de l'hippocampe et du cortex olfactif, et représente les premiers aspects cognitifs chez les très jeunes individus. Les

informations provenant du cortex olfactif sont intégrées au circuit de Papez, en passant par le cortex entorhinal. Ce test a été pratiqué à 5, 9 et 16 jours. L'allongement de la durée passée dans la zone proche de la litière familière des individus correspond à une meilleure performance. Ce test montre de meilleurs scores pour les rats contrôles par rapport aux rats carencés avec des performances en amélioration de jour en jour (significatif $p < 0,007$). On enregistre une amélioration des performances chez les animaux carencés supplémentés par rapport aux carencés non-supplémentés à 16 jours par rapport à 5 jours ($p = 0,05$) (**Figure 43 C**). Enfin, le test du Multi-T maze, réalisé du 21^{ème} au 24^{ème} jour post-natals met également en jeu les circuits de l'hippocampe. Le test est basé sur les capacités d'apprentissage et de rappel de la mémoire. Dans ce test réalisé selon 4 sessions successives (S1 à S4, **Figure 43 D**), les temps les plus courts attestent de meilleures performances des individus. Les trois paramètres majeurs relatifs à la sortie des individus du labyrinthe (latence d'échappement, nombre d'erreurs commises et distance totale parcourue) montrent que les individus carencés non supplémentés présentent des performances inférieures aux contrôles pour une ou plusieurs des sessions. Il est à noter que la supplémentation en B9 chez les carencés semble améliorer leur performances par rapport aux carencés non supplémentés. Ainsi leurs résultats sont comparables à ceux des contrôles essentiellement pour le nombre d'erreurs et la distance parcourue (**Figure 43 D**).

Des analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur les zones CA1, CA3, GD et SVZ du cerveau de rats à J21. Seuls les résultats sur la couche CA1 sont présentés. L'analyse des coupes cérébrales montre que NMDAR2 et AMPAR2 présentent un marquage altéré chez les individus carencés concernant la localisation des récepteurs (marquage périmoléculaire) par rapport aux contrôles (marquage cytoplasmique dans les axones et les dendrites). La supplémentation en folate semble restaurer au moins partiellement un marquage comparable aux individus contrôles (**Figure 44 A**). Les résultats obtenus concernant ces acteurs représentatifs de la plasticité synaptique glutamatergique révèlent une tendance sur la variation quantitative de leur expression, qui correspondrait à une diminution ainsi que de leurs formes phosphorylées, dans l'hippocampe. Cette tendance est à confirmer par des expériences complémentaires en Western Blot afin d'augmenter les effectifs, et pallier la susceptibilité individuelle à la carence et la variabilité liée au sexe (**Figure 44 B**).

S'agissant du modèle cellulaire de progéniteurs hippocampiques H19-7, nous avons choisi un temps de différenciation de 13h, qui se rapproche davantage du modèle animal à

J21. En situation de carence, le niveau d'expression des récepteurs glutamatergiques NMDAR1 et des formes phosphorylées P-NMDAR1, P-AMPA1 semble être diminué, tandis que le taux d'expression de NMDAR2a, AMPAR1 et AMPAR2 semble similaire à celui observé en situation témoin (**Figure 45 A**). Cependant, l'analyse de l'expression de AMPAR2 au niveau transcriptionnel montre une diminution de l'ordre de 80% de l'expression de son ARN messager dans les cellules carencées par rapport aux contrôles (**Figure 45 B**). L'expression des formes phosphorylées de NMDAR1 (P-NMDAR1) et de AMPAR1 (P-AMPA1), qui représentent les formes actives des récepteurs, est diminuée avec la carence. L'expression des protéines impliquée dans la voie de signalisation de ces récepteurs, telles que CREB et Src, est diminuée, alors que PKA ne semble pas varier (**Figure 45 C**). Les analyses en immunohistochimie effectuées sur les récepteurs AMPAR1, AMPAR2 et NMDAR2a semblent être en accord avec les analyses quantitatives réalisées en Western blot. Bien qu'une étude plus fine au microscope confocal soit nécessaire, les images permettent de donner une indication sur la localisation des récepteurs. De manière générale, ils sont périnucléaires pour les cellules soumises à la carence, alors qu'ils sont plutôt présents dans le cytoplasme et dans les prolongements cellulaires dans les cellules contrôles (**Figure 45 D**).

L'expression de miR-124a augmente de 37% à 21 jours chez les rats carencés par rapport aux contrôles ($p=0,0019$). La supplémentation en folate chez les individus carencés permet de réduire son expression de 40% par rapport au groupe MDD ($p=0,0002$) (**Figure 46 A**). Dans le modèle cellulaire H19-7, la variation de l'expression de miR-124a varie en fonction de leur niveau de différenciation. En phase de prolifération, miR-124a est sous-exprimé en condition de carence (D-P) par rapport aux contrôles (C-P). La différence s'inverse à 1h (C-1h/D-1h) et 3h (C-3h/D-3h) après induction de la différenciation. A 6h (C-6h/D-6h) et 13h (C-13h/D-13h), l'expression de miR124a est significativement augmentée en milieu carencé par rapport aux contrôles (13h : $p < 0,05$) (**Figure 46 B**). Par la suite, les cellules ont été transfectées avec un siRNA dirigé contre miR-124a. Nous avons analysé l'expression de différents candidats régulés directement ou indirectement par miR-124. Les résultats obtenus en Western blot montrent que l'expression de la forme activée du récepteur AMPAR2 (P-AMPA2), qui est phosphorylé au niveau de la tyrosine876, est augmentée dans les cellules transfectées en condition de carence par rapport à l'expression des cellules non-transfectées. Il en est de même pour les acteurs des voies de signalisation glutamatergique

telles que les formes phosphorylées de Src et de MAPK (Erk1/2), ainsi que le facteur de transcription CREB (**Figure 46 C**).

Conclusion

La carence en donneurs de groupements méthyles induit une diminution de l'expression et de la phosphorylation des récepteurs glutamatergiques. Cette diminution de l'expression et de l'activité des récepteurs est en lien avec une augmentation de l'expression de miR-124a qui aboutit à la répression de la phosphorylation de Src et de Erk1/2 ainsi qu'à la répression du facteur de transcription CREB, acteur final de la voie de signalisation des récepteurs glutamatergiques permettant, via l'expression de ses gènes cibles, la plasticité synaptique à long terme. En condition de carence, la répression de cette voie de signalisation est associée à un défaut fonctionnel, avec un déficit cognitif persistant. Une supplémentation périnatale en folate permet d'améliorer les capacités cognitives, au moins partiellement en normalisant l'expression de miR-124a, ainsi que celles des différents intervenants de la voie de signalisation liée au glutamate. Administrée en période de maturation cérébrale, cette supplémentation peut contrebalancer, au moins partiellement, les effets délétères de la carence en contribuant au maintien des processus impliqués dans le fonctionnement cérébral et en améliorant les capacités d'apprentissage et de mémorisation.

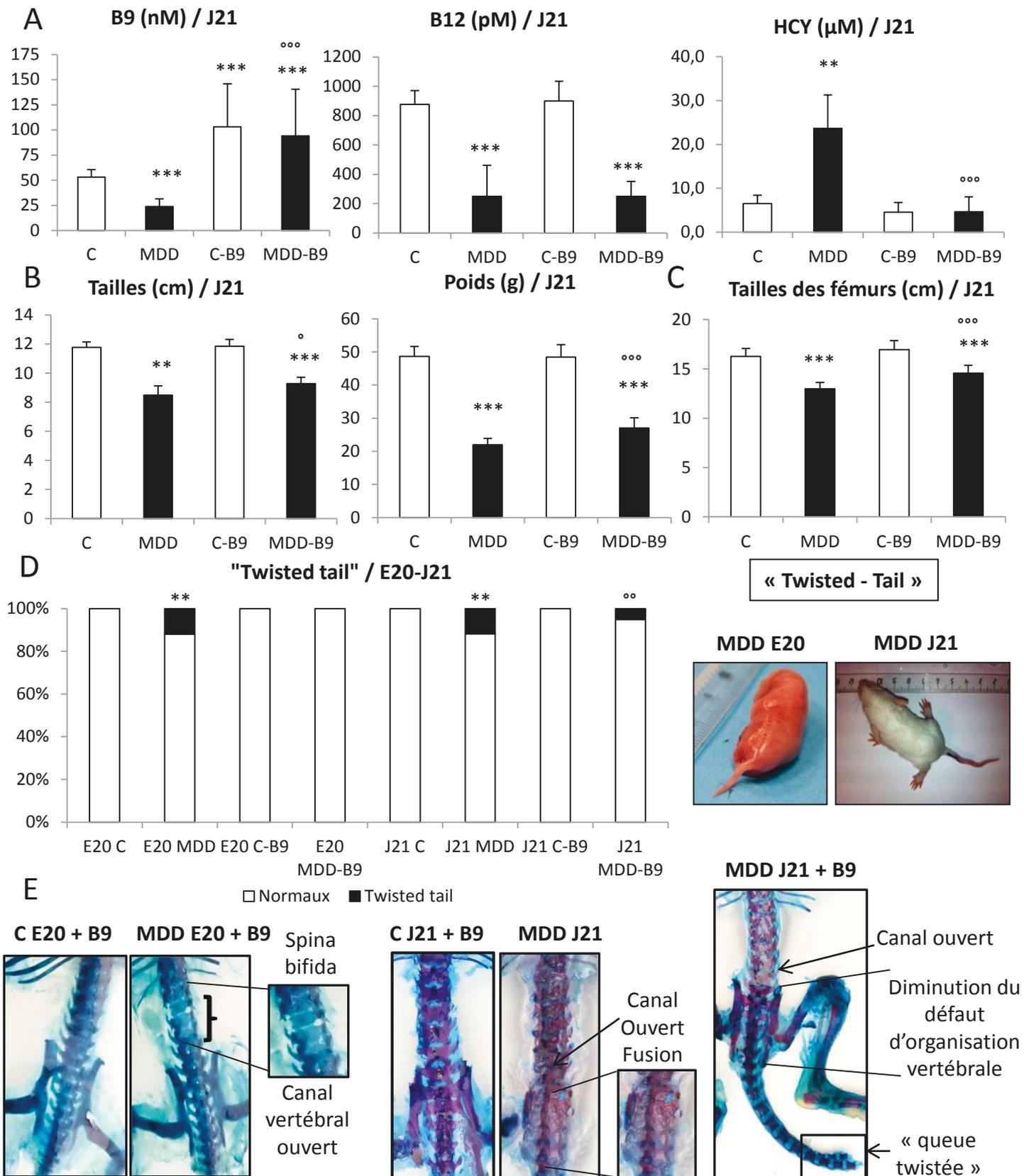


Figure 41 : Dosages métaboliques et analyses morphométriques des individus controls (C), controls supplémentés (C-B9), carencés (MDD) et carencés supplémentés (MDD-B9). **A** - Dosages métaboliques : B9 (nM), B12 (pM) et Hcy (nM) sur plasmas de rats J21. **B** - Analyses morphométriques: tailles et poids des rats J21 C -. Longueurs des fémurs des rats J21. **D** - Phénotype « Twisted-tail » chez les embryons E20 et les rats J21. **E** - Spina bifida et anomalies vertébrales chez les embryons E20 et les rats J21. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; °: groupe vs NC, °°: groupe vs MDD.

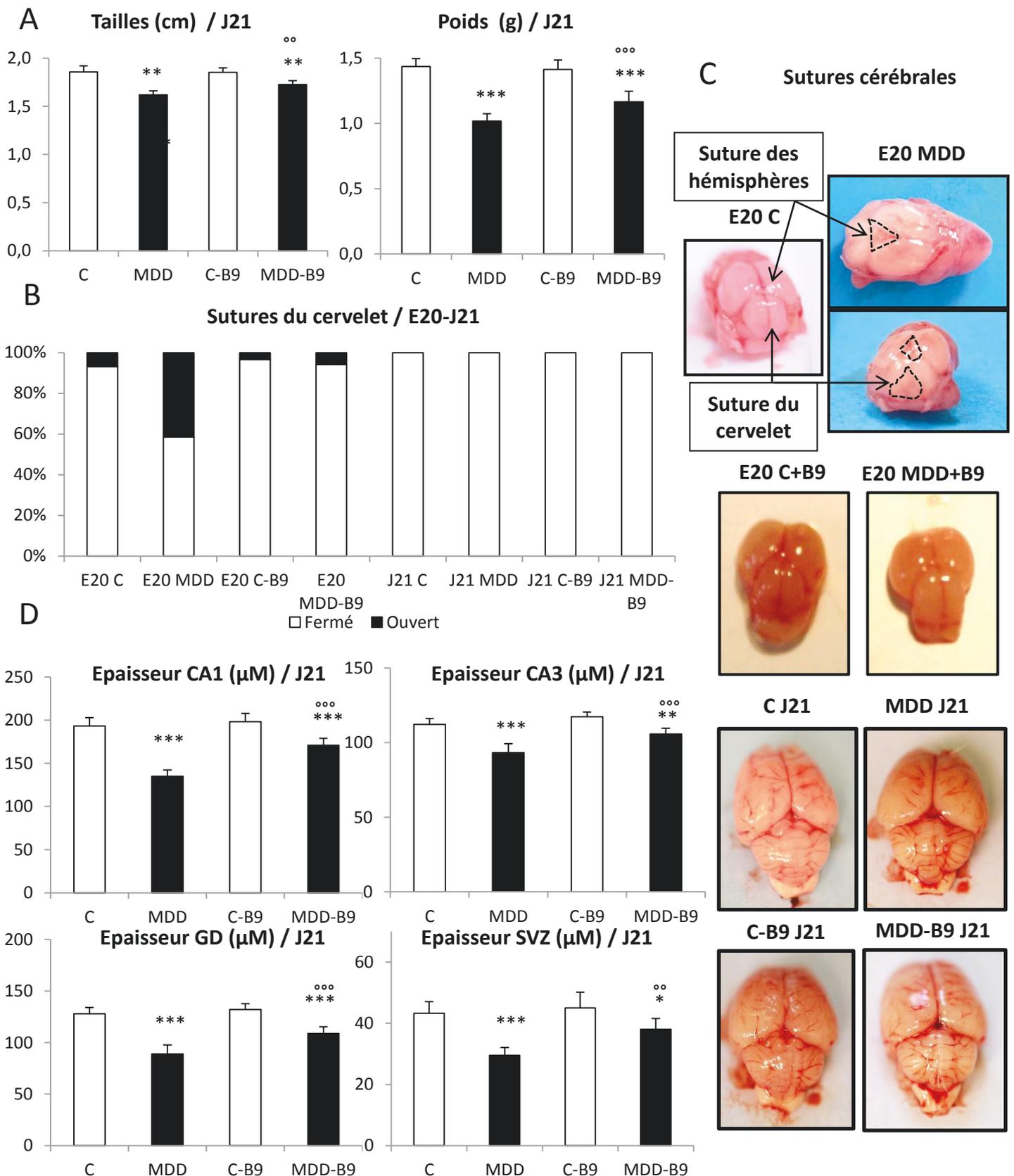


Figure 42 : Analyses morphométriques et anomalies des cerveaux des individus controls (C), controls supplémentés (C-B9), carencés (MDD) et carencés supplémentés (MDD-B9). A - Analyses morphométriques: tailles et poids des cerveaux des rats J21. B - Etat des sutures cérébrales des embryons E20 et des rats J21. C- Taux d'ouverture de la suture du cervelet chez les embryons E20 et des rats J21. D - Epaisseurs des couches intracérébrales des embryons E20 et des rats J21. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; *: groupe vs NC, °: groupe vs MDD.

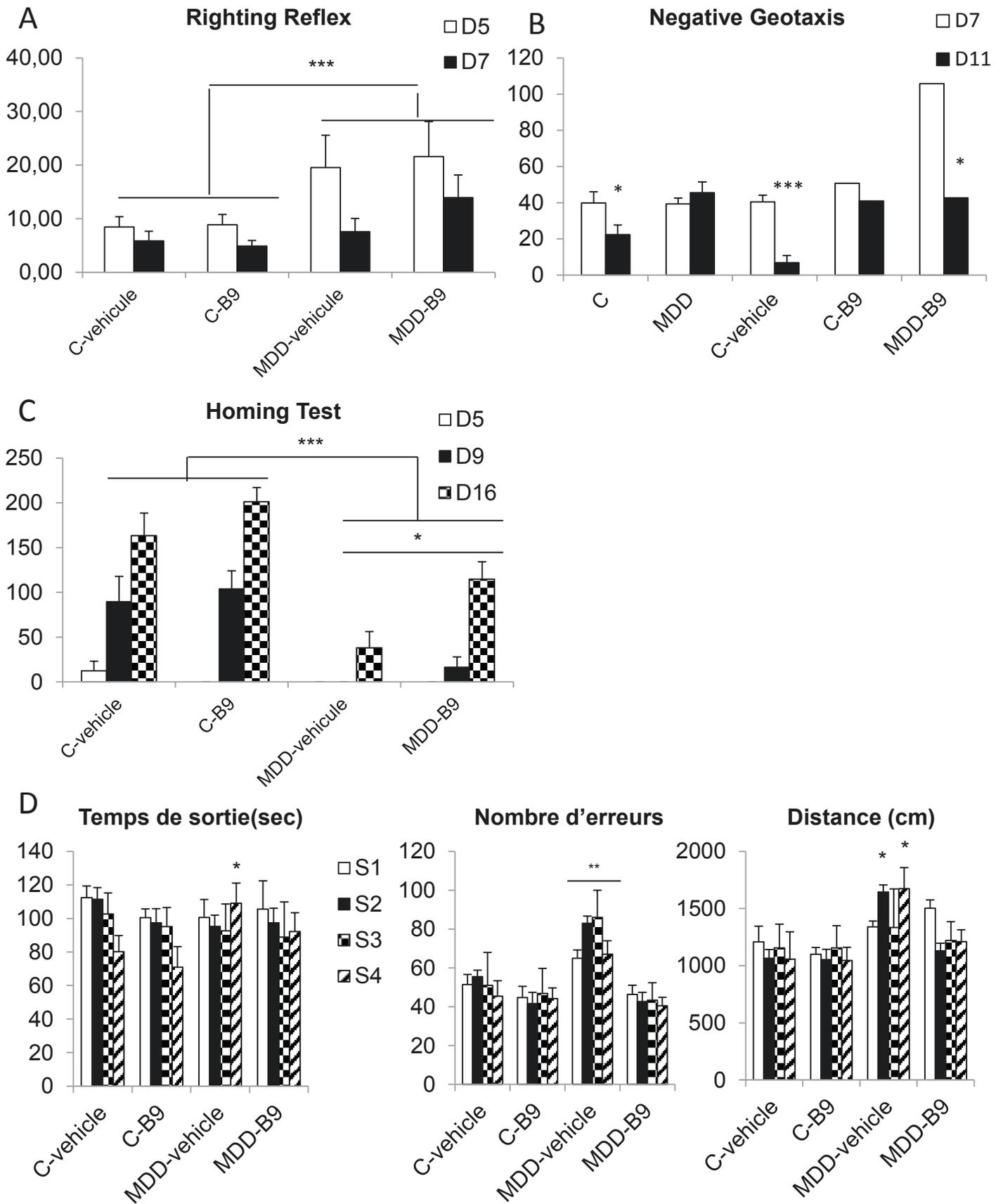


Figure 43 : Tests comportementaux de motricité, d'apprentissage et de mémorisation des individus J15 à J21 contrôles (C), contrôls supplémentés (C-B9), carencés (MDD) et carencés supplémentés (MDD-B9). A - Righting reflex. B - Negative geotaxis. C - Homing. D - Multi-T maze. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; *: groupe vs NC, °: groupe vs MDD.

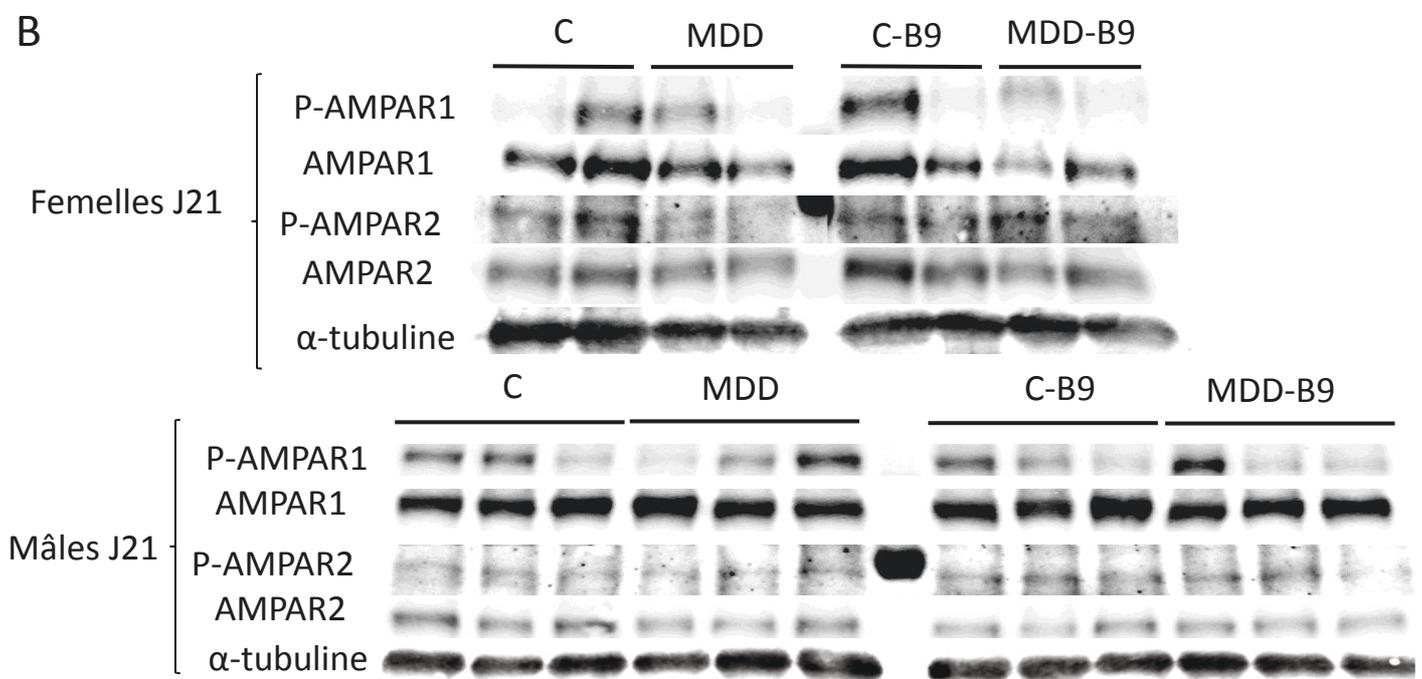
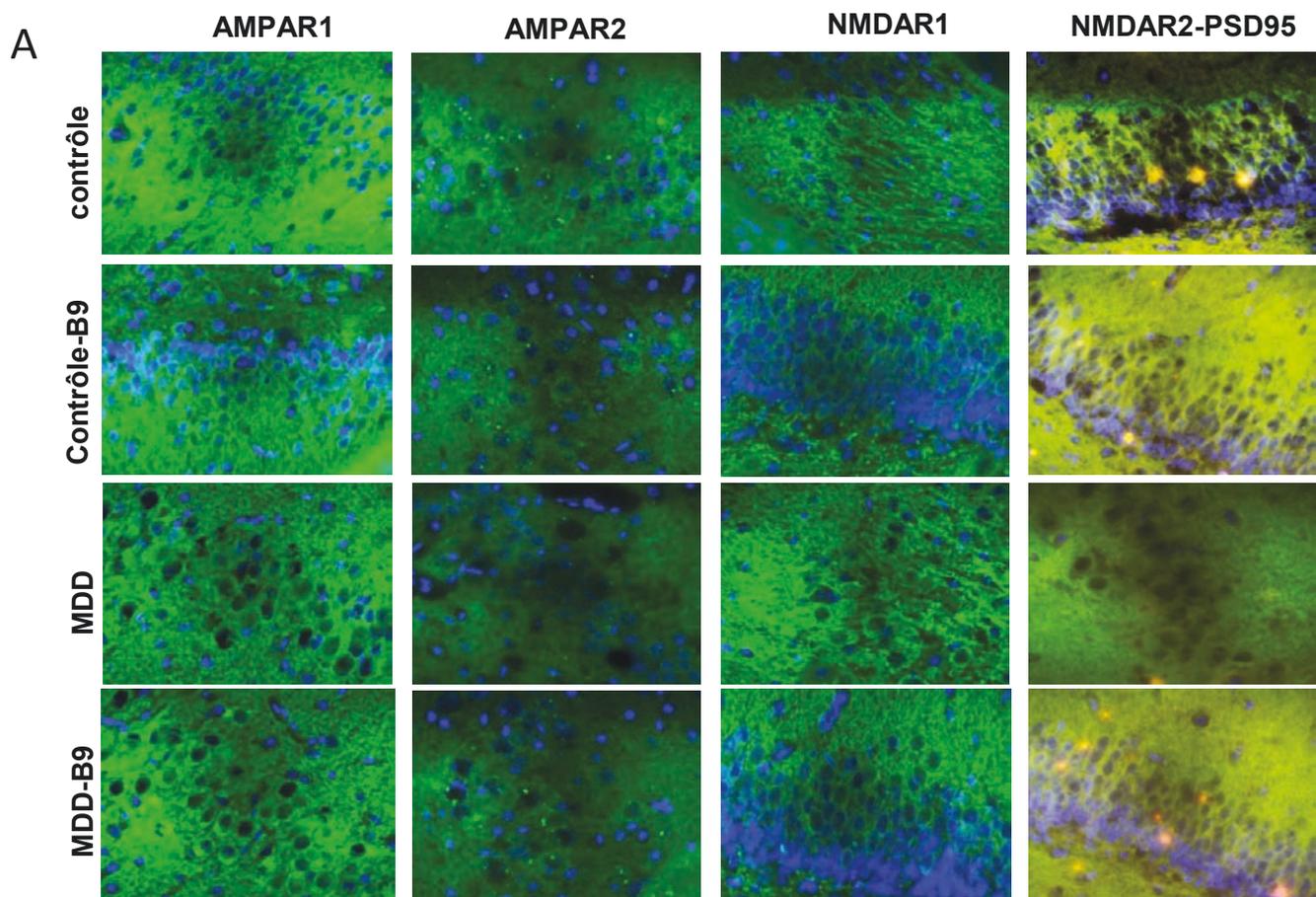


Figure 44 : Voies de signalisation AMPAR/NMDAR chez les rats J21 contrôls (C), contrôls supplémentés (C-B9), carencés (MDD) et carencés supplémentés (MDD-B9). **A** - Immunohistochimie des récepteurs glutamatergiques (vert), de PSD-95 (rouge) et des noyaux (bleu) au niveau de la CA1 (x60, échelle: 50µm). **B** - Expression des récepteurs glutamatergiques et des protéines liées à la transduction du signal suite à l'activation des récepteurs glutamatergiques, normalisée à la GAPDH.

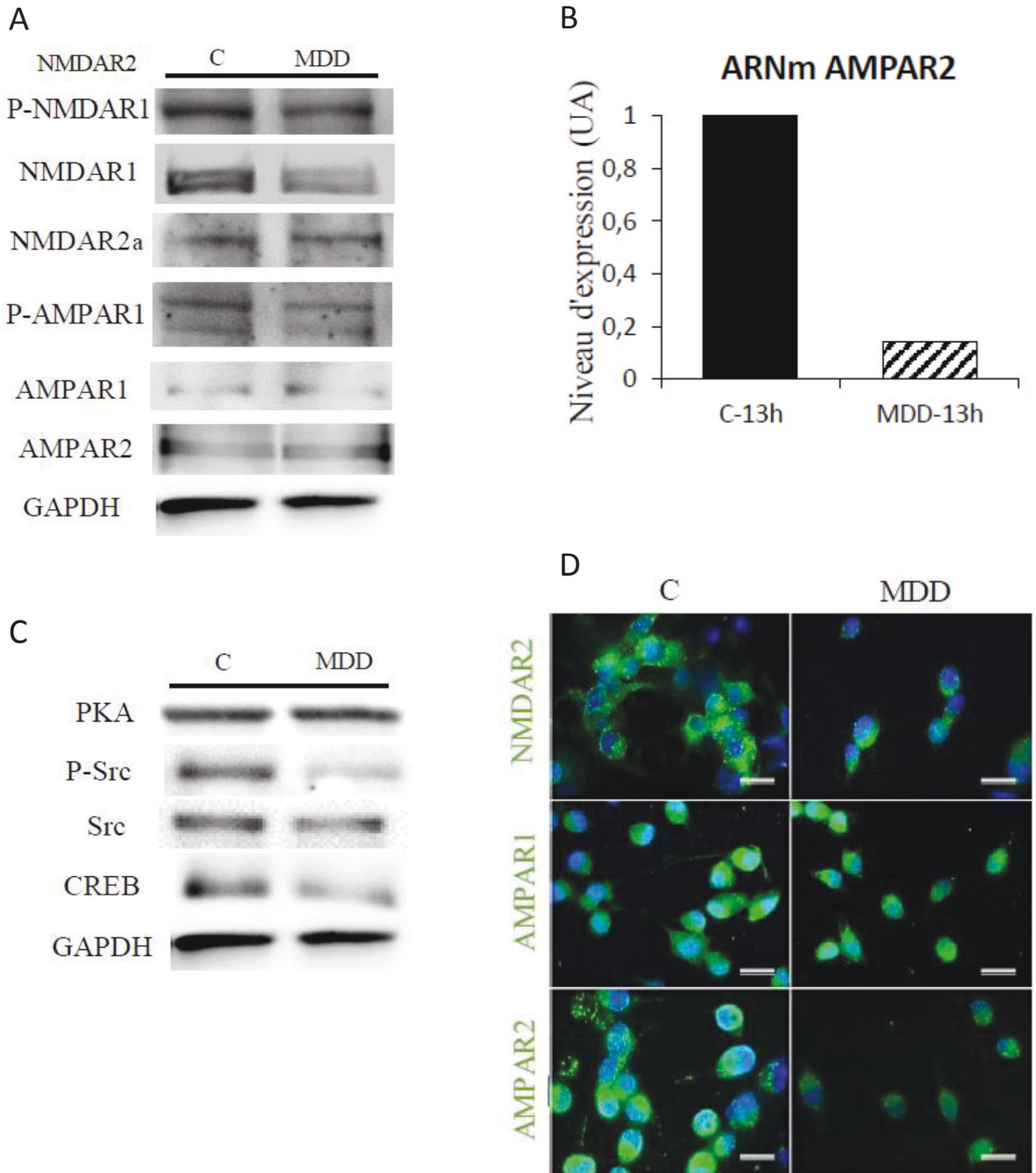
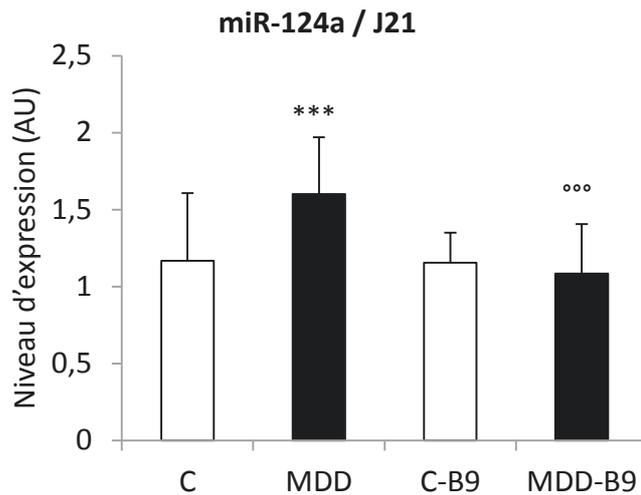
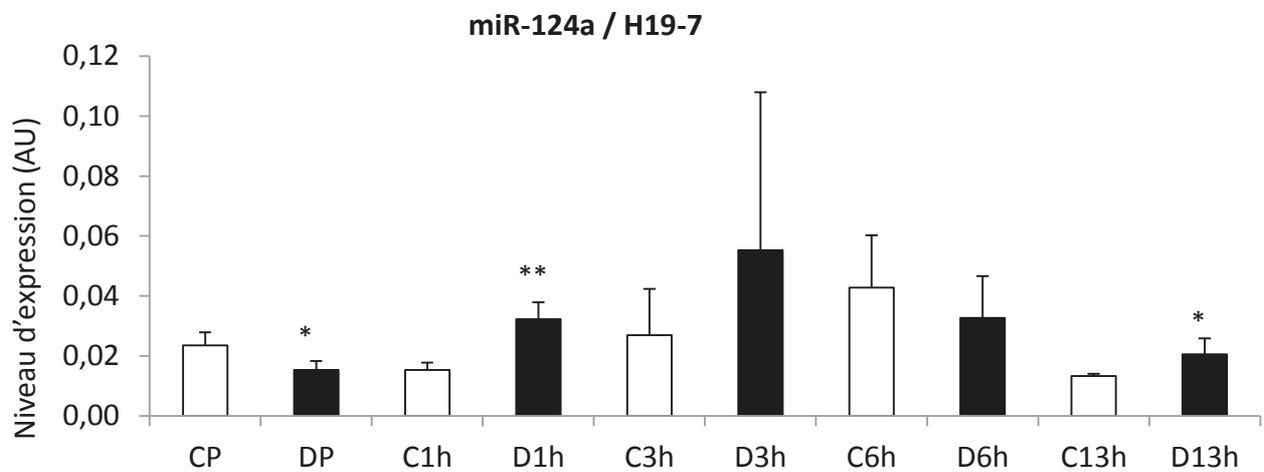


Figure 45 : Voies de signalisation AMPAR/NMDAR dans les cellules H19-7 contrôles (C) ou carencées (MDD), à 13h de différenciation. **A** - Expression des récepteurs glutamatergiques et de leurs formes phosphorylées, normalisée à la GAPDH. **B** - Taux d'expression d'AMPA2 relativisé par rapport au groupe contrôle. **C** - Expression des protéines liées à la transduction du signal suite à l'activation des récepteurs glutamatergiques, normalisée à la GAPDH. **D** - Immunocytochimie des récepteurs glutamatergiques (vert) et des noyaux (bleu) (x60, échelle: 10µm).

A



B



C

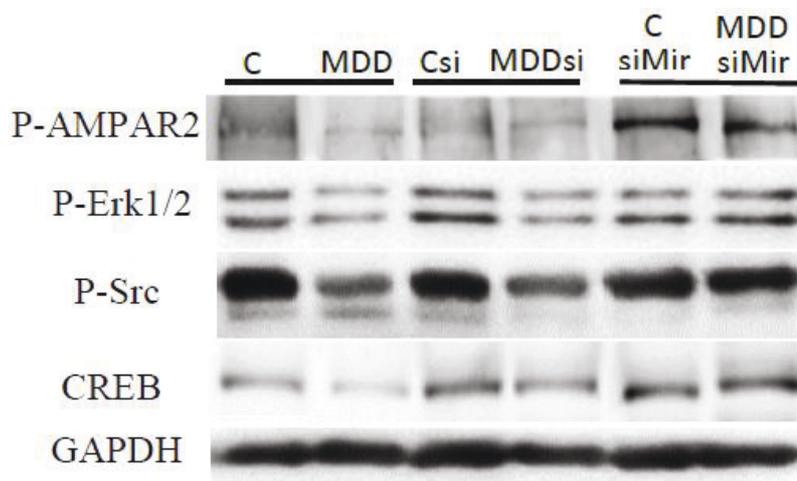


Figure 46 : Expression de miR-124a, régulateur de la plasticité synaptique, chez les rats J21 contrôls (C), contrôls supplémentés (C-B9), carencés (MDD) et carencés supplémentés (MDD-B9) ainsi que sur les cellules H19-7 contrôles (C) ou carencées (MDD). A - Expression de miR-124a dans les hippocampes de rats J21, normalisé au snoRNP U6. B - Expression de miR-124a en cinétique de la prolifération à 13h de différenciation dans les cellules H19-7, normalisé au snoRNP U6. C - Expression de P-AMPA2 et des protéines liées à la transduction du signal suite à l'activation des récepteurs glutamatergiques après transfection par siRNA dirigé contre miR-124a, normalisées à la GAPDH. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; *: groupe vs NC, °: groupe vs MDD.

**DISCUSSION,
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

I. Facteurs environnementaux et développement

Le développement de l'embryologie moderne a conduit à l'émergence d'une nouvelle vision de l'embryon. L'individu est considéré comme un organisme dont le développement répond à une succession d'étapes déterminées dans le temps et dans l'espace. Les modifications morphologiques sont la résultante d'un déterminisme qui met en jeu un ensemble de processus biologiques harmonieusement régulés. L'étude d'embryologie comparée qu'a réalisée Von Baer entre 1828 et 1837 met en évidence la forte conservation des mécanismes impliqués au sein du règne animal puisque les premiers stades de développement sont communs aux différentes espèces. Cette notion est enrichie par Streeter dès 1940 et O'Rahilly et Müller de 1970 à 1990, qui décrivent précisément les étapes du développement de l'embryon humain selon les 23 stades de Carnegie, qui restent aujourd'hui la référence dans le domaine. Les études comparées de fœtus humains et animaux s'accompagnent de l'émergence de la tératologie, qui marque le début des études sur les malformations congénitales.

En 1986, Barker et Osmond mettent en avant l'influence de nombreux facteurs sur le développement et le devenir des individus. Parmi eux, les facteurs environnementaux, notamment l'apport en macro- et micro-nutriments. Sans altération du génome, le déséquilibre des mécanismes de régulation de l'expression des gènes peut aboutir à une altération phénotypique. Le concept de la « programmation fœtale » repose sur l'hypothèse que les anomalies physiologiques pourraient faire intervenir des ajustements au niveau moléculaire, susceptibles d'être transmis à la descendance avec des conséquences à court et/ou à long terme. Les mécanismes sous-jacents sont encore peu élucidés, et les possibilités curatives réduites. Cependant, les instances de santé publique s'appliquent à mettre en place des stratégies préventives. Actuellement, les carences en vitamine B sont classées en priorité II par l'OMS. Ce type de carence est courant, notamment chez la femme enceinte. Il est alors associé à un retard de croissance intra-utérin chez l'Homme et chez l'animal (Molina et al., 2008, Molloy et al., 2008). Un grand nombre d'études ont mis en évidence le rôle de la vitamine B9 (folates) et de la vitamine B12 (cobalamine) dans la survenue d'anomalies du développement, comme les spina bifida ou les fentes labio-maxillo-palatines. Les anomalies de fermeture du tube neural associées

à une carence en folates aboutissent à des malformations congénitales dont la gravité est variable. Les anomalies mineures, spina-bifida occulta, ont des conséquences variables et peuvent être asymptomatiques ; les anomalies majeures, spina bifida aperta, peuvent conduire à des handicaps lourds nécessitant une intervention chirurgicale à la naissance, tandis que les formes extrêmes, exencéphalie ou anencéphalie, conduisent à un arrêt spontané du développement et à une mort fœtale. Dans ce contexte, les instances de santé publiques préconisent une supplémentation en folates en période périconceptionnelle puis pendant le premier trimestre de grossesse de sorte à pallier les risques de malformations. La dose recommandée est de 0.5mg/jour mais peut être augmentée à 5mg/jour pour les femmes à risque présentant des antécédents de grossesse avec des anomalies de fermeture du tube neural. L'efficacité de ce procédé est prouvée mais des questions persistent concernant la durée et la périodicité de la supplémentation, notamment aux cours des phases de maturation cérébrale qui se déroulent pendant la période périnatale. La carence est également néfaste chez l'adulte, en particulier chez les personnes âgées, où elle constitue un facteur de risque pour le développement prématuré de différentes pathologies liées à l'âge (Mattson et Shea, 2003). Actuellement, des questions émergent concernant le bénéfice d'une supplémentation en folates et/ou vitamine B12 chez ces personnes. Les études sur l'amélioration des fonctions cognitives en condition de supplémentation présentent des résultats mitigés, voire contradictoires (Ford et al., 2010, Durga et al., 2007, Malouf et al., 2003). Cependant, l'hypothèse de la « programmation fœtale », qui soutient la possibilité d'altérations très précoces, pourrait en partie expliquer l'aspect mitigé de l'efficacité du traitement.

II. Conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement cérébral

Les altérations de la programmation fœtale sous l'influence de l'apport en micronutriments, sont en lien avec la régulation des mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Faulk et Dolinoy, 2011, Gabory et al., 2011). Les folates et la vitamine B12 sont des acteurs centraux du cycle des monocarbones. Ce sont des acteurs fondamentaux de la régulation des

gènes par leur contribution dans les mécanismes épigénétiques et épigénomiques, de méthylation de l'ADN et des histones, qui interviennent au cours de la programmation fœtale, du développement cérébral et de la croissance (Stover et al., 2011, Forges et al., 2007).

Les études du laboratoire ont démontré sur un modèle de carence périconceptionnelle et gestationnelle en donneurs de méthyles chez le rat, que l'exposition précoce à la carence conduit à des anomalies du développement fœtal qui persistent au-delà du sevrage. Les individus sevrés de 21 jours, nés de mères carencées, présentent un retard de croissance et des troubles fonctionnels du système nerveux central (Blaise et al., 2007). L'étude d'embryons aux 16^{ème} et 20^{ème} jours de développement (E16 et E20) a permis de mettre en évidence l'influence précoce de la carence. Les portées obtenues de mères carencées présentent un taux élevé d'anomalies. La présence d'avortons révèle un taux important d'arrêts spontanés du développement qui souligne l'importance des folates très tôt au cours de la gestation. Les altérations de la capacité de synthèse de l'ADN et la susceptibilité accrue aux cassures peuvent en partie expliquer ce phénomène, en diminuant les capacités de prolifération cellulaire. D'autant que la carence a été associée à un défaut de croissance des blastocystes et à un défaut de transition des différents stades du développement (Ikeda et al., 2010, O'Neill, 1998). Parmi les animaux viables, un certain nombre d'anomalies sont visibles. Il peut s'agir de siamois, de syndactylie ou de défaut de fermeture du tube neural postérieur comme les spina bifida. La survenue de spina bifida occulta est associée à un phénotype de « queue twistée », que l'on observe déjà au 20^{ème} jour embryonnaire et qui perdure au cours de la croissance post-natale. L'étude des squelettes met en évidence un retard d'ossification qui s'accompagne d'anomalies vertébrales (ouverture du canal vertébral, fusions, malformations) et d'une désorganisation étendue dans la région lombo-sacrée. Jusqu'à présent, aucun spina bifida aperta (ouverture de la colonne, du muscle et de la peau mettant au jour le système nerveux) n'a été observé dans ce type de modèle. A la naissance, la prévalence des anomalies est diminuée ; cela peut s'expliquer par l'arrêt spontané du développement des embryons sujets à une anomalie majeure et à leur résorption, ainsi que par le fait qu'après la parturition, les femelles éliminent le plus souvent les ratons qui présentent des anomalies. Les embryons présentent également un retard de croissance, qui se manifeste par un plus petit poids et une plus petite taille, ce qui a été confirmé par la mesure de la longueur du fémur, caractéristique de la croissance fœtale, et qui est significativement inférieure aux témoins au

stade E20. Par la suite, le retard de croissance persiste puisqu'il est toujours présent chez les rats âgés de 21 jours nés de mères carencées. Le taux de folates a déjà été documenté comme un facteur limitant au cours de la période embryonnaire où il est nécessaire à la progression développementale et à la croissance (Burren et al., 2008). La B12 a également été impliquée puisqu'elle est liée au poids de la progéniture (Molina et al., 2008). Le retard de croissance global des individus s'accompagne d'un retard de croissance du cerveau, qui présente un poids également réduit. La texture des cerveaux embryonnaires très riches en eau ne permet pas l'étude de leur taille, cependant les données chez les individus à J21 montrent que la taille et le poids demeurent affectés en période post-natale. On recense également des défauts de fermeture du tube neural qui se manifestent au niveau cérébral dans les portées carencées. Les embryons présentent un retard de fermeture des sutures inter-hémisphérique et du cervelet dans les proportions de 42%. Au niveau intra-cérébral, les anomalies se manifestent sous la forme d'atrophies de certaines couches spécifiques. Parmi celles-ci, sont concernées les couches CA1 et CA3 de l'hippocampe de même que les couches neurogéniques (gyrus denté de l'hippocampe et zone subventriculaire), dont l'atrophie persiste à l'âge adulte. Un défaut de prolifération et une réduction du pool de progéniteurs neuronaux pourrait expliquer les observations morphologiques intra-cérébrales et contribuer au retard de fermeture des sutures.

III. Carence précoce et altération du programme neurogénique

La mise en place du système nerveux central débute par la neurulation qui se poursuit par la fermeture du tube neural. Les différentes étapes de ces processus nécessitent l'expression harmonieuse des acteurs du programme neurogénique qui regroupe l'ensemble des gènes du neurodéveloppement (prolifération/différenciation), du maintien de l'identité neuronale, de la survie ainsi que de la plasticité cérébrale. Elles font intervenir des mécanismes épigénomiques et épigénétiques, comme la méthylation ou l'acétylation de l'ADN et des histones, mais également la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les microARNs non-codants (miRs) (Shookhoff et Gallicano, 2010). Il a été démontré que la carence en donneurs de méthyles est associée à une réduction du potentiel de méthylation (index SAM/SAH) ainsi qu'à une accumulation d'homocystéine qui conduit à des défauts de méthylation et à une altération de la

différenciation des progéniteurs neuronaux (Hoffman et al., 1980). D'autres part, il est documenté que la carence est un répresseur de la prolifération des progéniteurs neuronaux, que ce soit in vitro sur des cellules hippocampiques ou in vivo sur des cellules progénitrices chez l'adulte (Kruman et al., 2005). L'altération de l'équilibre prolifération/différenciation peut faire intervenir des modifications épigénétiques responsables de l'inhibition ou de l'activation inappropriées des gènes impliqués (Copp et al., 2003). En effet, la carence en folates altère le profil d'expression de miRs dans des cellules humaines en culture (Marsit et al., 2006) et une régulation épigénétique de l'expression des miRs a été décrite (Sato et al., 2011).

Dans nos modèles, le laboratoire a déjà démontré une réduction de l'index SAM/SAH représentatif de la capacité de méthylation cellulaire susceptible d'altérer l'expression de gènes par l'intermédiaire des méthyltransférases et des histone-désacétylases (Akchiche et al., 2012, Garcia et al., 2011). Au cours de notre étude, nous avons démontré que la carence est associée à un profil d'hypométhylation globale. Les phénotypes observés pourraient être en lien avec une perturbation de la régulation de la survie cellulaire, des processus apoptotiques, de la balance prolifération/différenciation, de la synaptogenèse ou encore de la plasticité synaptique. Les travaux du laboratoire ont précédemment démontré une sensibilité accrue de certaines régions cérébrales à l'apoptose suite à l'augmentation d'homocystéine associée à la carence (Blaise et al., 2007). L'étude en screening de 84 gènes impliqués dans le neurodéveloppement a mis en évidence la modification de 41 gènes associés à différents réseaux, dont le plus représentatif correspond à un ensemble de gènes impliqués dans le « Développement et fonctionnement du système nerveux, assemblage et organisation cellulaire ». Parmi les gènes impliqués, STAT3 et les facteurs de transcription bHLH, comme Hes1 et Mash1, semblaient importants. Parallèlement, nous avons étudié l'expression d'un panel de microARNs spécifiques du cerveau, décrits dans la littérature comme fortement impliqués dans le développement et la plasticité synaptique et régulés pour la plupart par méthylation. Aux stades E16 et E20, les profils d'expression en condition de carence par rapport aux témoins sont variables : inchangé pour miR-137, diminué pour miR-9 et miR-23a, et augmenté pour Let-7a, miR-34a et miR-124a. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans les progéniteurs neuronaux H19-7 carencés en folates. Les miRs sont connus pour être exprimés de manière très dynamique et prédominante à certains stades du développement ou de la maturation cérébrale, ce qui explique que les profils soient très

hétérogènes dans les progéniteurs neuronaux en différenciation et différents dans l'hippocampe des rats de 21 jours. A l'heure actuelle sur l'ensemble des miRs étudiés à 21 jours post-nataux en situation de carence nous n'avons relevé qu'une augmentation significative de miR124a, tandis que miR137, miR23a et miR34a seraient réprimés.

IV. La carence en donneurs de méthyle altère l'expression de Trim71 et Dll1/Notch, deux acteurs de la fermeture du tube neural antérieur et postérieur

L'étude morphométrique des embryons issus de mères carencées a mis en évidence deux grandes manifestations de défauts de fermeture touchant la partie antérieure et la partie postérieure du tube neural : le retard de fermeture des sutures cérébrales ainsi que les spina bifida évoqués par un phénotype de queue twistée. Let-7a et miR-34a sont des microARNs connus pour réguler de manière chronologique les processus de prolifération et différenciation intervenant dans la fermeture du tube neural. L'étude en screening de 84 gènes régulés par Let-7a ou miRs-34a a révélé que plus de 90% de leurs gènes cibles sont altérés en condition de carence, ce qui confirme, en lien avec leur surexpression aux stades embryonnaires, l'implication de ces miRs dans nos modèles.

1. La régulation de miR-34a/Notch contribue à la fermeture du tube neural postérieur et à l'organisation de la colonne vertébrale

Parmi les cibles altérées de miR-34a, la voie Dll1/Notch a retenu notre attention puisque ces résultats recourent les données obtenues lors de l'étude des gènes du neurodéveloppement où de nombreux acteurs de cette voie sont altérés, tels que Hes1, Mash1 ainsi que les neurogénines. Il a été rapporté que Hes1 et Mash1 peuvent être dérégulés par des mécanismes épigénétiques

dépendants des folates (Ichi et al., 2010), tandis que miR-34 est documenté comme étant un régulateur de l'expression de Dll1 (de Antonellis et al., 2011). Or, la littérature mentionne des défauts de fermeture du tube neural, dus à l'expression inappropriée de marqueurs de la différenciation, à la suite d'une expression précoce de Mash1, concomitante à l'inhibition de Hes1 (Copp et al., 2003). La voie Notch est une pièce maîtresse de la régulation de la balance prolifération/différenciation qui doit être parfaitement régulée lors de la fermeture du tube neural. Un défaut de prolifération qui limiterait le taux de progéniteurs et une différenciation inappropriée pourraient expliquer l'apparition de spina bifida associée au phénotype de queue twistée observée dans nos modèles. Au cours du développement, la fixation de Dll1 à son récepteur Notch assure l'expression transcriptionnelle de Hes1, qui exerce un effet répressif sur Mash1. Or Mash1 contrôle la mise en place temporelle de la différenciation (Sugimori et al., 2007) puisqu'il est nécessaire à l'expression de gènes pro-neuronaux, acteurs de la différenciation, tels que les neurogénines (Fode et al., 2000). Par son activation et son interaction avec les acteurs impliqués dans les mécanismes de proliférations et de différenciation, la voie Notch assure le maintien de la prolifération et le renouvellement cellulaire (Nagao et al., 2007).

Dans nos modèles, miR-34a est surexprimé en condition de carence, ce qui conduit à une répression de Dll1/Notch et de Hes1. La diminution du taux de Hes1 conduit à une augmentation de l'expression de Mash1. Ce déséquilibre est responsable de l'expression prématurée des gènes proneuronaux, en faveur de la différenciation et au détriment de la prolifération. Ces données sont cohérentes avec les observations anatomiques faites au niveau de la colonne vertébrale, qui présente pour 12% des individus carencés, des spina bifida avec un phénotype de queue twistée. Une stratégie expérimentale par siRNA conduit aux mêmes observations concernant l'expression des acteurs de la voie Notch sur les progéniteurs hippocampiques H19-7. L'étude a confirmé l'implication de miR-34a dans les altérations observées puisque le siRNA dirigé contre miR-34a normalise, dans les cellules déplétées en folates, l'expression des protéines cibles à un niveau comparable aux contrôles. De plus, cette normalisation s'accompagne d'une amélioration du phénotype cellulaire en favorisant la croissance neuritique et axonale. Puisque la carence est associée à une augmentation du taux de miR-34a, il est cohérent de penser que la normalisation du taux de folates chez la mère pourrait au moins en partie restaurer les profils d'expression des différents acteurs. Pour tester cette hypothèse nous avons appliqué une supplémentation

périnatale en folates, qui couvre le pic de maturation cérébrale. Cette supplémentation s'est avérée efficace au niveau cellulaire puisqu'elle permet la normalisation de l'expression des différents acteurs de la voie Notch, en lien avec celle de miR-34a dans les embryons au stade E20. Ceci rejoint les résultats d'une autre étude portant sur la normalisation de l'expression de miRs à la suite d'une supplémentation en acide folique (Ichi et al., 2010).

Nous avons également montré que, même appliquée en dehors des périodes de recommandation actuellement en vigueur, la supplémentation périnatale en folates exerce un effet bénéfique sur les paramètres morphométriques. En condition de supplémentation, le poids et la taille des individus étaient augmentés, mais restaient toutefois inférieurs aux contrôles. La réduction du retard de croissance a été confirmée par la mesure de la longueur des fémurs. En dehors du premier tiers de gestation, la supplémentation ne pallie pas le retard de croissance mais apparaît comme une stratégie efficace pour le limiter. Le taux d'anomalies observées dans les portées est par ailleurs significativement réduit. De manière surprenante, la supplémentation au cours du troisième tiers de gestation permet la réduction du phénotype de queue twistée, qui n'est plus visible à E20 mais que l'on arrive encore à identifier à J21 chez 5% des rats carencés supplémentés en folates. Il s'agit pourtant d'une anomalie survenant pendant le premier tiers de la gestation et qui, par conséquent, ne devrait pas être modifiée par le traitement. L'ouverture du canal vertébral qui s'étend jusqu'à 7 vertèbres chez les individus carencés est restreinte à 2 ou 3 vertèbres chez les animaux supplémentés. Cette amélioration du phénotype des animaux peut être due en partie à une amélioration des phénomènes d'ossifications que nous avons constatée lors de la supplémentation en folate. En effet, les transitions cartilage/os sont des phénomènes tardifs pouvant bénéficier de la supplémentation. Dans une situation où l'expression des gènes du développement serait restaurée, les phénomènes d'inductions réciproques entre tissus pourraient avoir lieu et expliquer la réduction de l'ouverture du canal vertébral et la diminution du phénotype « queue twistée ». Ainsi, la supplémentation permet de réduire la gravité des atteintes sans pour autant prévenir les anomalies liées aux défauts de fermeture du tube neural. Dans le cas particulier des femmes à risque, l'application d'un traitement interventionnel sur une durée définie, au-delà des prescriptions d'usage, pourrait être efficace pour la réduction de la gravité de la pathologie.

2. La dérégulation de Let-7a/Trim71 contribuerait aux anomalies de fermeture de la suture du cervelet, au niveau du tube neural antérieur

Trim71 contribue à l'initiation et à la fermeture du tube neural. Son régulateur post-transcriptionnel, Let-7, est exprimé au niveau de la jonction mésencéphale/rhombencéphale (Kloosterman et al., 2006) ; ce qui fait de ce duo un acteur d'intérêt pour l'étude des défauts de fermeture de la suture du cervelet observés dans notre modèle de carence. Au cours du développement, Trim71 est exprimé de manière précoce dans les progéniteurs du neuroépithélium où il assure les processus de prolifération et réprime la différenciation (Slack et al., 2000). Au cours de la neurulation, son expression est régulée chronologiquement par Let-7 pour assurer la fermeture du tube neural (Maller Schulman et al., 2008). Par ailleurs, son inhibition totale conduit à des altérations de la fermeture du tube neural qui sont létales pour l'embryon (Maller Schulman et al., 2008).

Dans notre modèle, Let-7a est surexprimé dans le cerveau embryonnaire en condition de carence, ce qui conduit à une répression de Trim71. Ces données sont cohérentes avec les observations anatomiques faites au niveau de la suture du cervelet, qui présente un retard de fermeture chez les individus carencés. Une stratégie par siRNA permet de restaurer l'expression de Trim71 dans les progéniteurs carencés et confirme l'importance de la régulation de Let-7a. De la même manière que pour miR-34a, une amélioration du phénotype cellulaire, favorisant la croissance neuritique et axonale, a été observée dans les cellules carencées et transfectées par siRNA.

En condition de supplémentation en acide folique au cours du dernier tiers de gestation, le taux d'ouverture de la suture du cervelet chez les animaux carencés est comparable à celui observé chez les individus contrôles. Cette amélioration anatomique pourrait être liée à la restauration de l'expression de Trim71, consécutivement à celle de Let-7a. Toutefois, les défauts observés en situation de carence précoce traduiraient un simple retard de fermeture des sutures, et non des anomalies durables, puisqu'au stade de 21 jours post-natals, l'ensemble des individus carencés présentaient une suture cérébelleuse correctement fermée.

V. La carence en donneurs de méthyles provoque une atrophie des structures cérébrales via une altération de la voie STAT3

Suite au screening des gènes du développement altérés en condition de carence en donneurs de méthyles, STAT3 est apparu comme l'un des gènes les plus réprimés dans nos deux modèles expérimentaux. La phosphorylation de STAT3 sur la sérine727 et la tyrosine705, indispensable à son activité, est une réaction dépendante de la voie Notch (Gouti et Gavalas, 2008). Au cours du développement, STAT3 est un acteur majeur des processus de prolifération (Murase et al., 2012 ; Cheng et al., 2011, Deverman et Patterson, 2009, Dziennis et Alkayed, 2008) et contribue également à la survie et la différenciation des cellules (Cheng et al., 2011; Deverman et Patterson, 2009). miR 124 est décrit dans la littérature comme fortement impliqué dans le développement cérébral, et régulé par méthylation (Wang et al., 2013a). Il s'agit du miR le plus abondamment exprimé au niveau cérébral (Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2005). Il a été impliqué dans la régulation de l'expression et de l'activité de STAT3 (Krichevsky et al., 2006). miR-124a est à l'origine d'une inhibition de STAT3 par répression de la phosphorylation Tyr705 (Krichevsky et al., 2006) ou par fixation au niveau de sa région 3'UTR, de sorte à réprimer l'expression de la protéine (Cai et al., 2012). L'altération de la voie de signalisation STAT3 a été associée à certaines pathologies cérébrales (Abou-Ghazal et al., 2008; Priester et al., 2013; Rummel et al., 2004). Au cours de nos travaux, les animaux exposés à une carence en donneurs de groupements méthyles étaient sujets à un retard d'acquisition des fonctions motrices, d'apprentissage et de mémorisation qui persistaient jusqu'à 450 jours post-natals. Parallèlement, un certain nombre de couches intracérébrales étaient atrophiées chez les individus carencés, notamment les zones neurogéniques (gyrus denté et SVZ). A l'âge adulte, la protéine STAT3 n'est exprimée que dans les zones neurogéniques où son expression est stimulée dans certains contextes, comme la présence de lésions (Xia et al., 2002). La voie de signalisation impliquant STAT3 fait intervenir un ensemble de protéines kinases. La phosphorylation de la Tyr705 peut faire suite à l'action directe de récepteurs en amont tels que le récepteur à l'EGF ou suite à l'action de tyrosine kinases telles que Src (Zorina et al., 2010). La phosphorylation de la Ser727 repose principalement sur l'activité des MAP kinases (ERK1/2), soutenue par d'autre serine-

thréonine kinases telles qu'Akt (Decker et Kovarik, 2000). STAT3 est au centre des processus de survie cellulaire, de maintien de l'état indifférencié, et de neuroprotection (Zhao et al., 2011). Il favorise les processus anti-apoptotiques en agissant directement sur des acteurs tels que Bcl2, ou par son rôle de facteur de transcription sur d'autres, tels que Bcl-xl. De manière concomitante, il contribue à l'atténuation des processus pro-apoptotiques par son action sur des protéines telles que Bax.

Dans nos modèles, miR-124a est surexprimé en condition de carence. L'ARN messenger de STAT3, la protéine ainsi que ses formes phosphorylées (Tyr705/Ser727) sont réprimées, en association avec une diminution du marquage nucléaire de phospho-STAT3. Parmi les kinases impliquées dans l'activation de la voie, les réponses à la surexpression de miR-124a sont variées. Phospho-ERK1/2, phospho-Src et phospho-p38 sont réprimées, phospho-JNK est augmentée et Akt reste inchangée. Le rôle potentiel de JNK dans la répression de STAT3 avait déjà été évoqué (Lim et Cao, 1999). La répression de la voie STAT3 est associée à une répression de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl et à une augmentation des facteurs pro-apoptotiques caspases 3 et 9 clivées ainsi que Bax. Nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la répression de la signalisation STAT3 contribuerait à un défaut de prolifération couplé à une différenciation prématurée, et ce déséquilibre pourrait être associé à une altération de la survie cellulaire. Comme dans les cas précédemment évoqués, les résultats ont été confirmés par une stratégie siRNA dans les progéniteurs H19-7 déplétés en folates. La persistance des défauts de prolifération, associée à une différenciation prématurée qui aboutit à la mort cellulaire pourrait faire partie des mécanismes impliqués dans la persistance des atrophies cérébrales à 21 jours puisqu'à ce stade l'expression de miR-124a était toujours augmentée. Ces résultats supportent les précédentes études du laboratoire au cours desquelles il a été montré une augmentation de l'apoptose neuronale chez les rats carencés à J21 (Blaise et al., 2007), ainsi qu'un taux élevé de mort cellulaire par apoptose dans les cellules H19-7 carencées en folates (Akchiche et al., 2012). Alors que miR-124 est connu pour être un régulateur de ERK1/2 (Yamane et al., 2013), cette étude était la première démonstration d'une régulation de l'activité de Src par miR-124a. Chez les animaux ayant reçu une supplémentation périnatale en acide folique, l'épaisseur des couches intracérébrales est améliorée par rapport aux individus carencés. Toutefois, elle n'atteint pas les valeurs contrôles. Comme pour miR-34a et let-7a dans le cadre de la spina, la supplémentation

périnatale normalise le taux de miR-124a et permet ainsi une amélioration du phénotype sans restauration morphologique complète. Ce phénomène est certainement dû au fait que la fenêtre développementale temporelle en termes de prolifération est dépassée et ne sera donc pas modifiée par une supplémentation tardive en folate. Au cours de la période post-natale, l'expression de STAT3 doit être augmentée du 3^{ème} au 21^{ème} jour post-natal dans les conditions physiologiques pour permettre la survie et la sélection neuronale (Dziennis et Alkayed, 2008). La supplémentation périnatale peut agir sur le phénomène d'apoptose qui intervient dans la sélection neuronale. En normalisant l'expression de miR-124a, elle va permettre la restauration de la voie de survie STAT3 chez les animaux carencés, minimiser la perte neuronale et finalement améliorer les épaisseurs des couches intracérébrales affectées par la carence précoce.

VI. La régulation de miR-124a/CREB contribuerait à la plasticité synaptique chez l'adulte

L'hippocampe est une structure primordiale dans les processus de mémorisation. Son rôle est notamment d'associer les informations provenant des différents cortex. Ce fonctionnement passe par des processus de potentialisation à long terme ou « long term potentiation (LTP) », mettant en jeu des acteurs synaptiques glutamatergiques. Les miRs font partie des intervenants dans la régulation de ces mécanismes (Wang et al., 2012). Nous avons montré que l'expression de miR-124a était modifiée en situation de carence en donneurs de méthyles, et intervenait sur la voie STAT3 au cours du développement (Kerek, 2013). Or, miR-124 est également un acteur fondamental dans la plasticité synaptique (Rajasethupathy et al., 2009). L'atrophie des couches de l'hippocampe couplée à une altération de la plasticité synaptique pourrait expliquer les défauts d'acquisition motrice, d'apprentissage et de mémorisation observés chez nos animaux carencés.

Les performances réduites au test psychomoteur dans les premiers jours post-natals chez les animaux carencés, y compris pour le groupe supplémenté bien qu'elles soient améliorées, pourraient contribuer à la différence taille/poids observée par rapport aux contrôles. En effet, les rats carencés pourraient avoir plus de mal à se déplacer, s'orienter et donc accéder à la

mamelle. Ceci est confirmé par les performances moindres au test de « homing » et de « learning » en Multi-T Maze chez les rats carencés qui, associées à une diminution de l'épaisseur des couches CA1, CA3, GD et SVZ, permettent de mettre en évidence un défaut du développement structural et fonctionnel de l'hippocampe. Les expériences en immunohistochimie ont montré une tendance à la diminution du marquage cytoplasmique des récepteurs AMPAR2 et NMDAR2a en condition de carence à l'âge de 21 jours. Les analyses par western blot des récepteurs AMPAR1 et AMPAR2 semblent en accord avec ces résultats et montrent que ce sont principalement leurs formes phosphorylées qui sont affectées. Ces résultats restent à être confirmés, en augmentant les effectifs, et élargis à l'étude des récepteurs NMDA. On retrouve également ces variations d'expression des récepteurs glutamatergiques dans le modèle cellulaire H19-7. Dans notre étude, les formes actives, c'est-à-dire phosphorylées des récepteurs sont moins exprimées en cas de carence. La carence en donneurs de méthyles semble donc altérer les mécanismes de phosphorylation intervenant dans la plasticité synaptique. La phosphorylation des récepteurs glutamatergiques fait intervenir les kinases Src et MAPK. Or, comme nous l'avons décrit précédemment, l'activité de ces deux types de kinases est affectée par miR-124. Le facteur de transcription CREB est également une cible directe de miR-124 (Rajasethupathy et al., 2009) et l'acteur final de la voie de signalisation des récepteurs glutamatergiques permettant, via l'expression de ses gènes cibles, la plasticité synaptique à long terme. Son activation et sa localisation nucléaire nécessitent sa phosphorylation, notamment par les kinases Src et MAPK. La surexpression de miR-124 qui perdure jusqu'au 21^{ème} jour post-natal s'accompagne ainsi d'une diminution de l'expression et de l'activité du facteur de transcription CREB. L'utilisation de la stratégie siRNA ciblant miR-124a dans les progéniteurs neuronaux H19-7 carencés en folate permet, comme nous l'avons déjà vu, de restaurer le niveau d'expression et d'activité des kinases mais restaure aussi le niveau de phosphorylation du récepteur AMPA2 et le niveau d'expression de CREB.

Les anomalies morphologiques cérébrales associées à des anomalies fonctionnelles de la plasticité synaptique en lien avec les altérations de l'expression, de l'activité et des voies de signalisations des récepteurs glutamatergiques en situation de carence en donneurs de méthyles pourraient expliquer la persistance des défauts cognitifs dans le modèle animal, et ce malgré le retour à une alimentation normale à partir de 21 jours. Dans ce contexte, nous avons également

étudié l'influence d'une supplémentation en acide folique au cours de la période périnatale. Au niveau comportemental, la supplémentation n'a pas d'effet sur les tests précoces effectués avant 11 jours, comme le « righting reflex ». Par contre, on observe une amélioration des performances au test du « negative geotaxis » à 11 jours et du « homing » à 16 jours, mais surtout une récupération des capacités d'apprentissage, comme le montre le test de Multi-T Maze à partir de 21 jours, les résultats des rats carencés supplémentés étant comparables à ceux des contrôles.

Les défauts cognitifs observés en condition de carence pourraient ainsi être causés par une altération des processus de potentialisation à long terme. La plasticité synaptique permet de réguler la qualité et la puissance de la transmission neuronale, par une modulation de la quantité de récepteurs glutamatergiques à la membrane synaptique (Gan et al., 2014). Le transport et le maintien des récepteurs à la surface membranaire se fait grâce à un système d'activation par phosphorylation. Le récepteur AMPA2 est phosphorylé par la kinase Src au niveau de la tyrosine876 (Gan et al., 2014) pour permettre sa stabilisation au niveau de la synapse en inhibant la liaison de BRAG2-AMPA2. L'expression de Src et de CREB est régulée par miR-124 (Kerek et al., 2013, Rajasethupathy et al., 2009). Bien que la voie de régulation ne soit pas encore définie, il a été montré que miR-124 est lui-même régulé par les MAP Kinases (Rajasethupathy et al., 2009). De plus, ces kinases et Src phosphorylent CREB pour permettre son internalisation dans le noyau et renforcer la transmission synaptique (Balschun et al., 2003). La répression de la voie de consolidation CREB dans le noyau pourrait expliquer la diminution de l'expression des récepteurs glutamatergiques au niveau des neurones hippocampiques. Certaines études utilisant du resvératrol ou des bacosides dans des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer ont montré leurs effets positifs sur les capacités de mémorisation et d'apprentissage impliquant la voie miR124a-CREB (Zhao et al., 2013, Preethi et al., 2012). La supplémentation en folates, en normalisant l'expression de miR124a dans notre modèle de carence, permettrait de récupérer une signalisation glutamatergique fonctionnelle au niveau de la synapse hippocampique. Les résultats comportementaux suggèrent que l'hippocampe récupère une certaine capacité fonctionnelle, ce qui pourrait être lié à un rétablissement des mécanismes intervenant dans la plasticité synaptique.

VII. Conclusions et Perspectives

Au cours de nos travaux, nous avons montré qu'une altération du métabolisme des monocarbone engendrée par une carence gestationnelle en folates/vitamine B12 contribue à la survenue de divers défauts anatomiques, notamment en lien avec une altération des mécanismes impliqués dans la fermeture du tube neural antérieur et postérieur. La carence induit une diminution de l'expression des acteurs de la prolifération et de la survie cellulaire, associée à une expression inappropriée des gènes pro-neuronaux impliqués dans la différenciation, avec une altération du profil d'expression de microARNs régulateurs. Ces modifications conduisent à un déséquilibre de la balance prolifération/différenciation, associé à la dérégulation de gènes susceptibles d'affecter le développement du système nerveux central (**Schéma de synthèse 3**).

Nos travaux montrent qu'une carence précoce en donneurs de méthyles affecte la neurogenèse et induit des troubles de la différenciation neuronale en perturbant l'expression des acteurs du programme neurogénique. Ces modifications mettent en jeu des mécanismes épigénomiques impliquant la méthylation, l'acétylation, avec l'implication des histone désacétylases (Akchiche et al., 2012) et les microARNs. La carence aboutit à l'altération de voies de signalisation dont l'harmonie est cruciale au cours du développement du système nerveux central, notamment concernant les voies STAT3 et Notch1. Il en découle une perturbation de la mise en place des réseaux neuronaux associée à une atrophie cérébrale. De manière plus tardive, la carence engendre une altération des voies de signalisation impliquant les récepteurs NMDA et AMPA, acteurs majeurs de la plasticité synaptique. Ces défauts de différenciation et de maturation affectent la croissance des neurites et le bon fonctionnement synaptique, à l'origine de troubles fonctionnels persistants. Les effets néfastes d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur le développement du cerveau sont de plus en plus documentés dans la littérature scientifique. Ils sont également associés à un risque accru de neuropathologie au cours du vieillissement. Cette étude apporte de nouvelles données pour la compréhension des mécanismes sous-jacents. Les instances de santé publiques recommandent une supplémentation en folates chez les femmes enceintes avant la conception et jusqu'à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse, principalement pour pallier les risques d'anomalies de fermeture du tube neural. Les doses prescrites ont fait preuve de leur efficacité, mais la question de la durée et de la périodicité du

traitement reste néanmoins ouverte. Notre étude montre l'effet bénéfique potentiel d'une supplémentation plus tardive, au cours de la période périnatale, pour réduire la gravité des atteintes précoces de mise en place du système nerveux central. Ce type de supplémentation, dans le cas particulier des femmes à risque, pourrait être un traitement interventionnel efficace.

La plasticité synaptique intervient dans les processus de mémorisation en adaptant la quantité de récepteurs glutamatergiques présents à la surface synaptique, en particulier le couple de récepteurs AMPA/NMDA. Il apparaît qu'une carence en donneurs de méthyles altère les mécanismes intervenant dans la transduction du signal. De façon à compléter ces aspects encore préliminaires, il faudra par la suite confirmer nos résultats par l'étude de l'expression et de la localisation des acteurs de la transmission synaptique glutamatergique sur le cerveau de rats âgés de 21 jours, en microscopie confocale et électronique. Nous pourrions ainsi évaluer les mécanismes d'adressage des récepteurs à la surface de la synapse.

Puisque la supplémentation périnatale semble être efficace dans la réduction des anomalies anatomiques et apporter une amélioration des performances cognitives, il paraît important de confirmer ces résultats au niveau des mécanismes de plasticité synaptique de sorte à renforcer la prise en charge des grossesses pour lesquelles une carence maternelle en donneurs de méthyles serait découverte tardivement. La plasticité synaptique est un processus complexe qui fait intervenir un grand nombre de voies de signalisation agissant en synergie. Par exemple, la régulation des récepteurs par la protéine Arc intervient directement sur la localisation et le transport des récepteurs glutamatergiques (Plath et al., 2006). Or, la régulation de son expression fait intervenir miR-34a (Ryan et al., 2015), que nous avons montré comme étant surexprimé en condition de carence chez les fœtus. Il serait donc judicieux de regarder l'influence d'une altération du cycle des monocarbones sur cette voie de régulation. Afin de compléter l'étude, il apparaît nécessaire d'analyser le niveau de méthylation global de l'ADN au stade J21, d'autant que différents acteurs de la plasticité synaptique sont régulés par méthylation de leur promoteur, comme c'est le cas pour le récepteur NMDA (Lee et al., 2008). Le niveau de méthylation des promoteurs en condition de carence est donc un paramètre important à prendre en considération.

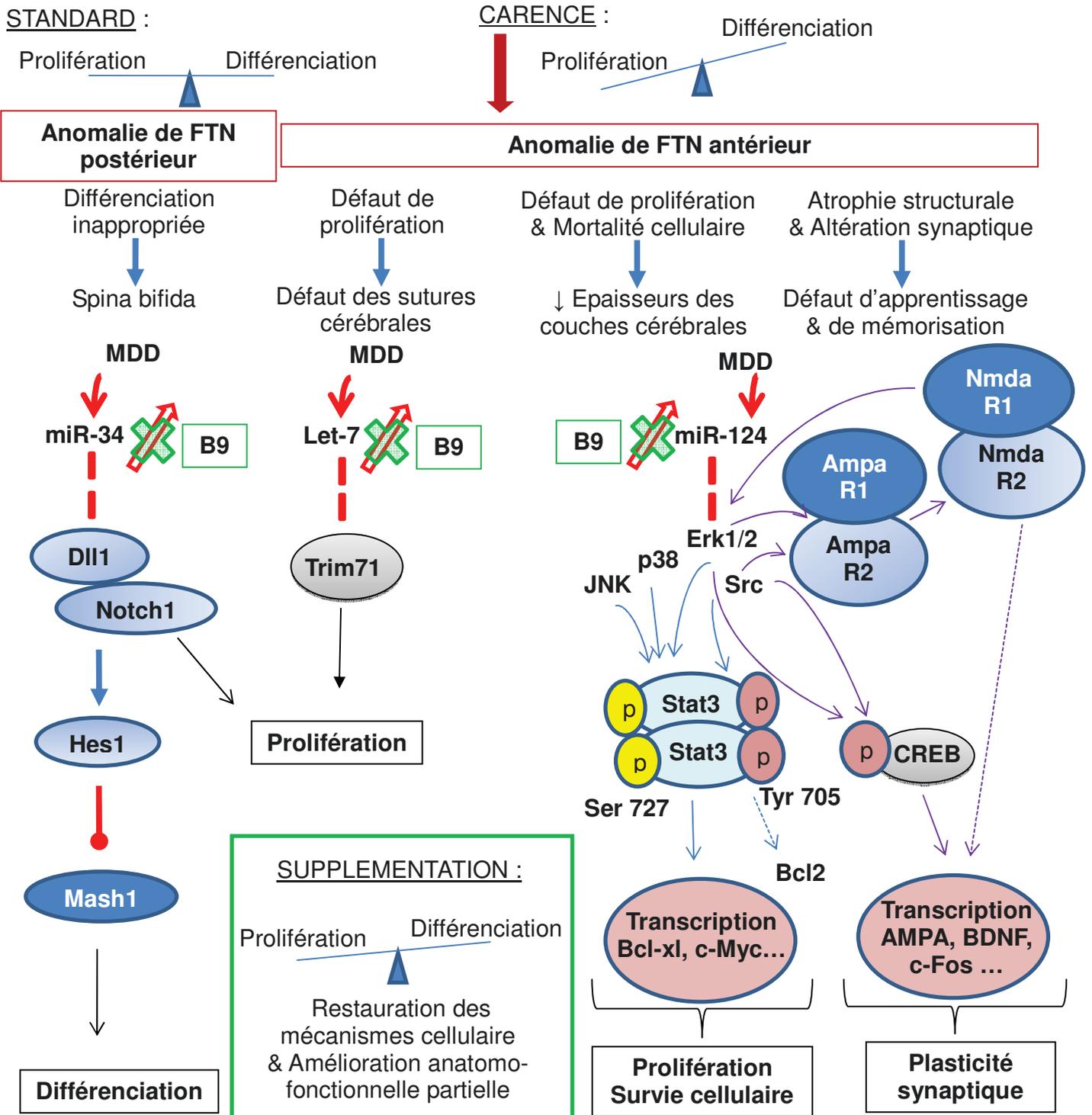


Schéma de synthèse 3 : La carence en donneurs de groupement méthyle aboutit à différentes pathologies, par la dérégulation de voies de signalisation dont l'expression peut être partiellement restaurée par une supplémentation périnatale en acide folique.

BIBLIOGRAPHIE

Aaronson DS, Horvath CM (2002) A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653–1655.

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

Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, Rougvie AE (2003) The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell.* 4(5):625-37.

Akaneya Y (2007) The remarkable mechanism of prostaglandin E2 on synaptic plasticity. *Gene Regul. Syst Biol* 1 83–89.

Akbulut S, Altiparmak E, Topal F, Ozaslan E, Kucukazman M, Yonem O (2010) Increased levels of homocysteine in patients with ulcerative colitis. *WJG* 16: 2411-2416.

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

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

Akerblom M, Sachdeva R, Barde I, Verp S, Gentner B, Trono D, Jakobsson J (2012) MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant. *J Neurosci* 32:8879-8889.

Allain P, Le Bouil A, Cordillet E, Le Quay L, Bagheri H, Montastruc JL (1995) Sulfate and cysteine levels in the plasma of patients with Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 16: 527-529.

Allen RH, Seetharam B, Podell E, Alpers DH (1978) Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *JCI* 61: 47-54.

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

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

Ambros V (2008) The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med* 14:1036–1040.

Anand KJ, Scalzo FM (2000) Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate* 77(2):69-82.

- Andersson A, Brattstrom L, Israelsson B, Isaksson A, Hamfelt A, Hultberg B (1992) Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age gender and menopausal status. *Eur J Clin Invest* 22:79-87.
- Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloisel F, Schlienger JL, Blicklé JF (2004) Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 171(3):251-259.
- Anello G, Gueant-Rodriguez RM, Bosco P, Gueant JL, Romano A, Namour B, Spada R, Caraci F, Pourie G, Daval JL, Ferri R (2004) Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 15:859-861.
- Antony AC, Kane MA, Portillo RM, Elwood PC, Kolhouse JF (1985) Studies of the role of a particulate folate-binding protein in the uptake of 5-methyltetrahydrofolate by cultured human KB cells. *JBC* 260:14911-14917.
- Araki A, Sako Y, Ito H (1993) Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis* 103:149-157.
- Aranha MM, Santos DM, Solá S, Steer CJ, Rodrigues CMP (2011) miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. *PLoS One* 6:e21396.
- Aschrafi A, Cunningham BA, Edelman GM, Vanderklish PW (2005) The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *PNAS* 102(6):2180-2185.
- Aschrafi A, Natera-Naranjo O, Gioio AE, Kaplan BB (2010) Regulation of axonal trafficking of cytochrome c oxidase IV mRNA. *Mol Cell Neurosci* 43(4):422-430.
- Asli NS, Kessel M (2010) Spatiotemporally restricted regulation of generic motor neuron programs by miR-196-mediated repression of Hoxb8. *Dev Biol.* 15;344(2):857-68.
- Assaraf YG, Goldman ID (1997) Loss of folic acid exporter function with markedly augmented folate accumulation in lipophilic antifolate-resistant mammalian cells. *JBC* 272:17460-17466.
- Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jorgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merkenschlager M, Fisher AG (2006) Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8:532-538.
- Ba M, Kong M, Ma G (2014) Postsynaptic density protein 95-regulated NR2B tyrosine phosphorylation and interactions of Fyn with NR2B in levodopa-induced dyskinesia rat models. *Drug Des Devel Ther.* 9:199-206.
- Babiarz J, Hsu R, Melton C, Thomas M, Ullian E, Blelloch R (2011) A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing. *RNA* 17:1489-1501.
- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R (2008) Mouse ES cells express endogenous shRNAs siRNAs and other Microprocessor-independent Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22(20):2773-2785.

- Bae Y, Yang T, Zeng HC, Campeau PM, Chen Y, Bertin T, Dawson BC, Munivez E, Tao J, Lee BH (2012) miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Hum Mol Genet* 21 2991-3000.
- Bak M, Silahtaroglu A, Meller M (2008) MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 14:432–444 31.
- Baker-Andresen D, Ratnu VS, Bredy TW (2013) Dynamic DNA methylation: a prime candidate for genomic metaplasticity and behavioral adaptation. *Trends Neurosci* 36(1):3-13.
- Balschun D, Wolfer DP, Gass P, Mantamadiotis T, Welzl H, Schütz G, Frey JU, Lipp HP, (2003) Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *J. Neurosci.* 23: 6304-14.
- Banerjee RV, Johnston NL, Sobeski JK, Datta P, Matthews RG (1989) Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli* metH gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *J Biol Chem* 264 13888-13895.
- Banka S, Blom HJ, Walter J, Aziz M, Urquhart J, Clouthier CM, Rice GI, de Brouwer AP, Hilton E, Vassallo G, Will A, Smith DE, Smulders YM, Wevers RA, Steinfeld R, Heales S, Crow YJ, Pelletier JN, Jones S, Newman WG (2011) Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 88 216-225.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2005) Reversing histone methylation. *Nature* 436 1103–1106.
- Barker DJ (2004) Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 58 114-115.
- Barker DJ, Osmond C (1986) Infant mortality childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1 1077-1081.
- Barre B, Vigneron A, Coqueret O (2005) The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem* 280 15673-15681.
- Bartel DP, Lee R, Feinbaum R (2004) MicroRNAs: genomics biogenesis mechanism and function genomics: the miRNA genes. *Cell* 116:281e97.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215e33.
- Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, Martinez-Fong D, Daval JL, Gueant JL (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A proNGF and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 21930-21935.
- Beaumont V, Zhong N, Fletcher R, Froemke RC, Zucker RS (2001) Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation. *Neuron* 32(3):489–501.
- Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK (2010) Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 115 1632-1639.

- Benkhalifa M, Montjean D, Cohen-Bacrie P, Menezo Y (2010) Imprinting: RNA expression for homocysteine recycling in the human oocyte. *Fertil Steril* 93:1585-1590.
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28(2):328–336.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315–326.
- Bertolo RF, McBreairty LE (2013) The nutritional burden of methylation reactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16:102-108.
- Bezold G, Lange M, Peter RU (2001) Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *N Engl J Med*. 344:1172-3.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579–583.
- Bialecka M, Kurzawski M, Roszmann A, Robowski P, Sitek EJ, Honczarenko K, Gorzkowska A, Budrewicz S, Mak M, Jarosz M, Golab-Janowska M, Kozirowska-Gawron E, Drozdik M, Slawek J (2012) Association of COMT MTHFR and SLC19A1(RFC-1) polymorphisms with homocysteine blood levels and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 22:716-724.
- Bienvenu F, Barre B, Giraud S, Avril S, Coqueret O (2005) Transcriptional regulation by a DNA-associated form of cyclin D1. *Mol Biol Cell* 16:1850-1858.
- Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170:667-679.
- Blandini F, Fancellu R, Martignoni E, Mangiagalli A, Pacchetti C, Samuele A, Nappi G, (2001) Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease. *Clin Chem* 47:1102-04.
- Blaylock RL (2013) Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. *Surg Neurol Int* 18;4:118.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH (2006) Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 7, 724-731.
- Blondel B, Lelong N, Kermarrec M, Goffinet F, National Coordination Group of the National Perinatal Surveys (2012) Trends in perinatal health in France from 1995 to 2010. Results from the French National Perinatal Surveys. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 41(4):e1-e15.
- Blondel B, Kermarrec M (2011) Les naissances en 2010 et leur évolution depuis 2003. France, Enquête Nationale Périnatalité, 2010.
- Boeke J, Ammerpohl O, Kegel S, Moehren U, Renkawitz R (2000) The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* 275:34963–34967.

- Boeuf H, Merienne K, Jacquot S, Duval D, Zeniou M, Hauss C, Reinhardt B, Huss-Garcia Y, Dierich A, Frank DA, Hanauer A, Kedinger C (2001) The ribosomal S6 kinases cAMP-responsive element-binding and STAT3 proteins are regulated by different leukemia inhibitory factor signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 276:46204–46211.
- Bonaldi T, Imhof A, Regula JT (2004) A combination of different mass spectroscopic techniques for the analysis of dynamic changes of histone modifications. *Proteomics* 4:1382–1396.
- Bonev B, Stanley P, Papalopulu N (2012) MicroRNA-9 modulates hes1 ultradian oscillations by forming a double-negative feedback loop. *Cell Rep* 2:10-18.
- Bonev B, Pisco A, Papalopulu N (2011) MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev Cell* 20 19–32.
- Bonjour JP (1980) Vitamins and alcoholism. II. folate and vitamin B12. *Int J Vitam Nutr Res.* 50(1):96-121.
- Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Gueant JL (2003) Methionine synthase (MTR) 2756 (A →G) polymorphism double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet A*121A 219-224.
- Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Spada R, Romano A, Fajardo A, Caraci F, Ferri R, Gueant JL (2006) Association of homocysteine (but not of MTHFR 677 C>T MTR 2756 A>G MTRR 66 A>G and TCN2 776 C>G) with ischaemic cerebrovascular disease in Sicily. *ThrombHaemost*96 154-159.
- Bostom AG, Lathrop L (1997)Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence etiology and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int*52(1): 10-20.
- Botez MI, Young SN, Bachevalier J, Gauthier S (1982) Effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindoleacetic acid in human cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 12:479-84.
- Bottiglieri T (2005) Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*29 1103-1112.
- Bottiglieri T, Arning E, Wasek B, Nunbhakdi-Craig V, Sontag JM, Sontag E (2012) Acute administration of L-DOPA induces changes in methylation metabolites reduced protein phosphatase 2A methylation and hyperphosphorylation of Tau protein in mouse brain. *J Neurosci*32 9173-9181.
- Bottiglieri T, Godfrey P, Flynn T, Carney MW, Toone BK, Reynolds EH (1990) Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*53 1096-1098.
- Bottiglieri T, Laundy M, Crellin R, Toone BK, Carney MW, Reynolds EH (2000) Homocysteine folate methylation and monoamine metabolism in depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*69 228-232.

- Boyles AL, Hammock P, Speer MC (2005) Candidate gene analysis in human neural tube defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C 9-23.
- Bramham CR, Wells DG (2007) Dendritic mRNA: transport translation and function. *Nat Neurosci* 8:776–789 60.
- Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L (1998). Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 98(23): 2520-2526.
- Breder CD, Dewitt D, Kraig RP (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355 296–315.
- Broca P (1861) Remarks on the Seat of the Faculty of Articulated Language Following an Observation of Aphemia (Loss of Speech). *Bulletin Society Anatomique* 6 330–357.
- Brooks PJ, Marietta C, Goldman D (1996) DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J Neurosci* 16: 939-45.
- Brouwer IA (2000) Folic acid folate and homocysteine: human intervention studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92:183-4.
- Bruniquel D, Schwartz RH (2003) Selective stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process *Nat Immunol* 4; 235–240.
- Brzozka MM, Radyushkin K, Wichert SP, Ehrenreich H, Rossner MJ (2010) Cognitive and sensorimotor gating impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene *Tcf4* in the brain. *Biol Psychiatry* 68 33–40.
- Burke G, Robinson K, Refsum H, Stuart B, Drumm J, Graham I (1992) Intrauterine growth retardation perinatal death and maternal homocysteine levels. *N Engl J Med* 326 69-70.
- Burren KA, Savery D, Massa V, Kok RM, Scott JM, Blom HJ, Copp AJ, Greene ND (2008) Gene-environment interactions in the causation of neural tube defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of *Pax3* function. *Hum Mol Genet* 17 3675-3685.
- Burren KA, Scott JM, Copp AJ, Greene ND (2010) The genetic background of the curly tail strain confers susceptibility to folate-deficiency-induced exencephaly. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88 76-83.
- Cai S, Chen R, Li X, Cai Y, Ye Z, Li S, Li J, Huang H, Peng S, Wang J, Tao Y, Huang H, Wen X, Mo J, Deng Z, Wang J, Zhang Y, Gao X, Wen X (2015) Downregulation of microRNA-23a suppresses prostate cancer metastasis by targeting the PAK6-LIMK1 signaling pathway. *Onco target* 28;6(6):3904-17.
- Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho R, Correia SS, Backos DS, Carvalho AL, Esteban JA, Duarte CB (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 27;282(17):12619-28.
- Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho RF, Carvalho AL, Duarte CB (2007) BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 35(2):208-19.

- Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN (2001) Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19 475-479.
- Campbell DS, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32(6):1013–1026.
- Campbell DS, Regan AG, Lopez JS, Tannahill D, Harris WA, Holt CE (2001) Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse turning and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *J Neurosci* 21(21):8538–8547.
- Candito M, Bedoucha P, Jambou D, Appert-Flory A, Fisher F, Parrot-Roulaud F, Bayle J, Van Obberghen E, Chatel M (1997) [Cerebral vascular complication of hyperhomocysteinemia. Controlling thromboembolic complications with folates]. *Presse Med* 26(27): 1289-1291.
- Cankurtaran M, Yesil Y, Kuyumcu ME, Ozturk ZA, Yavuz BB, Halil M, Ulger Z, Cankurtaran ES, Ariogul S (2013) Altered levels of homocysteine and serum natural antioxidants links oxidative damage to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33 1051-1058.
- Cario H, Bode H, Debatin KM, Opladen T, Schwarz K (2009) Congenital null mutations of the FOLR1 gene: a progressive neurologic disease and its treatment. *Neurology* 73 2127-2129.
- Cario H, Smith DE, Blom H, Blau N, Bode H, Holzmann K, Pannicke U, Hopfner KP, Rump EM, Ayric Z, Kohne E, Debatin KM, Smulders Y, Schwarz K (2011) Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. *Am J Hum Genet* 88 226-231.
- Carmel R, Aurangzeb I, Qian D (2001) Associations of food-cobalamin malabsorption with ethnic origin, age, *Helicobacter pylori* infection and serum markers of gastritis. *Am J Gastroenterol* 96(1): 63-70.
- Carmel R (2000) Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 51: 357-375.
- Carson NA, Neill DW (1962) Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 37, 505-513.
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10 105-115.
- Chakraborty P, Goswami SK, Rajani S, Sharma S, Kabir SN, Chakravarty B, Jana K (2013) Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PLoS One* 8 e64446.
- Chamberlin ME, Ubagai T, Mudd SH, Thomas J, Pao VY, Nguyen TK, Levy HL, Greene C, Freehauf C, Chou JY (2000) Methionine adenosyltransferase I/III deficiency: novel mutations and clinical variations. *Am J Hum Genet* 66 347-355.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2006) Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor-

alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* 147 2909–2915.

Chen J, Evans AN, Liu Y, Honda M, Saavedra JM, Aguilera G (2012) Maternal deprivation in rats is associated with corticotropin releasing hormone (Crh) promoter hypomethylation and enhances Crh transcriptional responses to stress in adulthood. *J Neuroendocrinol* 24 1055–1064.

Chen JS, Pedro MS, Zeller RW (2011) miR-124 function during *Ciona intestinalis* neuronal development includes extensive interaction with the Notch signaling pathway. *Development* 138:4943e53.

Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B (1997) Human methionine synthase. cDNA cloning genelocalization and expression. *J BiolChem*272(6): 3628-3634.

Chen Q, Xu J, Li L, Li H, Mao S, Zhang F, Zen K, Zhang CY, Zhang Q (2014) MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death Dis* 20;5:e1132.

Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP (2005) Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33(4):1290-7.

Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci* 12 399–408.

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

Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmouttaleb I, Gerard P, Barbarino P, Boutroy JL, Gueant JL (2002) Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 40:1105-1108.

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

Cho W, Choi J, Park CH, Yoon SO, Jeoung DI, Kim YM, Choe J (2008) Expression of CD320 in human B cells in addition to follicular dendritic cells. *BMB reports* 41: 863-867.

Choi HJ, Lee JH, Park SY, Cho JH, Han JS (2009) STAT3 is involved in phosphatidic acid-induced Bcl-2 expression in HeLa cells. *Exp Mol Med*41 94-101.

Chorna LB, Akopian HR, Makukh HV, Fedoryk IM (2011) [Allelic polymorphism of MTHFR MTR and MTRR genes in patients with cleft lip and/or palate and their mothers]. *Tsitol Genet*45 51-56.

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

- Christman JK, Sheikhnejad G, Dizik M, Abileah S, Wainfan E (1993) Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. *Carcinogenesis* 14:551-557.
- Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA, Giraldez AJ (2010) A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328(5986):1694–1698.
- Clark A, Goldstein L, Tevlin M, Shaham S, Tavaré S, Miska E (2010) The microRNA miR-124 controls gene expression in the sensory nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 38:3780-3793.
- Clarke R, Birks J, Nexo E, Ueland PM, Schneede J, Scott J, Molloy A, Evans JG (2007) Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *The American journal of clinical nutrition* 86: 1384-1391.
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM (1998) Folate vitamin B12 and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 55: 1449-1455.
- Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM (2004) Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 33(1):34-41.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH, Helin K (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* 442: 307–311.
- Cochella L, Hobert O (2012) Diverse functions of microRNAs in nervous system development. *Curr Top Dev Biol* 99:115-143.
- Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, Suormala T, Burda P, Frapolli M, Stucki M, Nurnberg P, Thiele H, Robenek H, Hohne W, Longo N, Pasquali M, Mengel E, Watkins D, Shoubridge EA, Majewski J, Rosenblatt DS, Fowler B, Rutsch F, Baumgartner MR (2012) Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nature genetics* 44: 1152-1155
- Cole MG, Prechal JF (1984) Low serum vitamin B12 in Alzheimer-type dementia. *Age and ageing* 13: 101-105
- Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G (2006) Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2422-2427.
- Conti L, Cattaneo E (2010) Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci* 11 176–187.
- Conway G (2006) STAT3-dependent pathfinding and control of axonal branching and target selection. *Dev Biol* 296: 119–136.
- Coolen M, Katz S, Bally-Cuif L (2013) miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Front Cell Neurosci* 20;7:220.
- Coolen M, Bally-Cuif L (2009) MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol* 19 461–470.

- Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN (2003) The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet* 4:784-793. 151.
- Cortese R, Lewin J, Bäckdahl L, Krispin M, Wasserkort R, Eckhardt F, Beck S (2011) Genome-wide screen for differential DNA methylation associated with neural cell differentiation in mouse. *PLoS ONE* 2011; 6(10):e26002.
- Cox LJ, Hengst U, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Jaffrey SR (2008) Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. *Nat Cell Biol* 10(2):149–159.
- Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH (2004) Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* 134:162-166.
- Cravo ML, Camilo ME (2000) Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status. *Nutrition* 16(4): 296-302.
- Cravo ML, Glória LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitão CN, Mira FC (1996) Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate vitamin B-12 and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr* 63(2): 220-224.
- Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A (1997) A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 16:256-9.
- Cuellar TL, Davis TH, Nelson PT, Loeb GB, Harfe BD, Ullian E, McManus MT (2008) Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5614e9.
- Cylwik B, Chrostek L (2011) [Disturbances of folic acid and homocysteine metabolism in alcohol abuse]. *Pol Merkur Lekarski* 30: 295-299.
- Czapski GA, Maruszak A, Styczynska M, Zekanowski C, Safranow K, Strosznajder JB (2012) Association between plasma biomarkers CDK5 polymorphism and the risk of Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp* 72: 397-411.
- Czeizel AE, Dudas I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327: 1832-1835.
- Dajas-Bailador F, Bonev B, Garcez P, Stanley P, Guillemot F, Papalopulu N (2012) microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat Neurosci* 15:697-699.
- Dasen JS, De Camilli A, Wang B, Tucker PW, Jessell TM (2008) Hox repertoires for motor neuron diversity and connectivity gated by a single accessory factor FoxP1. *Cell* 134(2):304-16.
- Dasen JS, Jessell TM (2009) Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol* 88: 169–200.
- Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, Ullian EM (2008) Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci* 28:4322e30.

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

de Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen RP (1997) Folate intake in Europe: recommended actual and desired intake. *Eur J Clin Nutr* 51(10): 643-660.

De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ (2002). Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 54(4): 599-618.

de Carvalho SC, Muniz MT, Siqueira MD, Siqueira ER, Gomes AV, Silva KA, Bezerra LC, D'Almeida V, de Oliveira CP, Pereira LM (2013) Plasma higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrition journal* 12: 37

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

DeFronzo RA (1992) Insulin resistance hyperinsulinemia and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 11:S1-16.

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

de Pietri Tonelli D, Pulvers J, Haffner C, Murchison E, Hannon G, Huttner W (2008) miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development* 135:3911-3921.

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

Defossez PA, Stancheva I (2011) Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 101:377-98.

Deguchi T, Barchas J (1971) Inhibition of transmethylation of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem.* 25; 246(10):3175-81.

Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, van Geijn HP (1995) Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 173 1042-1048.

Delabar U, Kloor D, Luippold G, Muhlbauer B (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.

Delaloy C, Liu L, Lee JA, Su H, Shen F, Yang GY, Young WL, Ivey KN, Gao FB (2010) MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Cell Stem Cell* 6(4):323-35.

Delaval K, Feil R (2004) Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Dev Genet* 14:188–195

Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature* 432:231–235

Deo M, Yu JY, Chung KH, Tippens M, Turner DL (2006) Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Dev Dyn* 235 2538–2548.

De-Regil LM, Fernandez-Gaxiola AC, Dowswell T, Pena-Rosas JP (2010) Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst Rev* CD007950.

Derkach VA, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 8(2):101-13.

Detich N, Theberge J, Szyf M (2002) Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 277:35791–35794.

Deverman BE, Patterson PH (2009) Cytokines and CNS development. *Neuron* 64 61-78.

Dhasarathy A, Wade PA (2008) The MBD protein family-reading an epigenetic mark? *Mutat Res* 1;647(1-2):39-43.

Dhonukshe-Rutten RA, Lips M, de Jong N, Chin APMJ, Hiddink GJ, van Dusseldorp M, De Groot LC, van Staveren WA (2003) Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *The Journal of nutrition* 133: 801-807.

Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA (2005) Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers broadband ultrasound attenuation and fractures in healthy elderly people. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20: 921-929

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

Dicker-Brown A, Fonseca VA, Fink LM, Kern PA (2001) The effect of glucose and insulin on the activity of methylene tetrahydrofolate reductase and cystathionine-beta-synthase: studies in hepatocytes. *Atherosclerosis* 158:297-301.

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

Dixon WE, Halliburton WD (1913) The cerebro-spinal fluid: I. Secretion of the fluid. *J Physiol.* 47(3):215-42.

Do DV, Ueda J, Messerschmidt DM, Lorthongpanich C, Zhou Y, Feng B, Guo G, Lin PJ, Hossain MZ, Zhang W, Moh A, Wu Q, Robson P, Ng HH, Poellinger L, Knowles BB, Solter

- D, Fu XY (2013) A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes Dev* 27 1378-1390.
- Dogini DB, Ribeiro PA, Rocha C, Pereira TC, Lopes-Cendes I (2008) MicroRNA expression profile in murine central nervous system development *J Mol Neurosci* 35; 331–337.
- Doolin MT, Barbaux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE (2002) Maternal genetic effects exerted by genes involved in homocysteine remethylation influence the risk of spina bifida. *Am J Hum Genet* 71 1222-1226.
- Dringen R, Hamprecht B (1999) N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4-carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain. *Neurosci Lett* 259(2):79-82.
- Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132 4645–4652.
- Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP (2002) Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 80 101-110.
- Ducros V, Belva-Besnet H, Casetta B, Favier A (2006) A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice. *Clin Chem Lab Med* 44 987-990.
- Durand P, Fortin LJ, Lussier-Cacan S, Davignon J, Blache D (1996) Hyperhomocysteinemia induced by folic acid deficiency and methionine load--applications of a modified HPLC method. *Clin Chim Acta* 252 : 83-93.
- Durga J, van Boxtel MP, Schouten EG, Kok FJ, Jolles J, Katan MB, Verhoef P (2007) Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised double blind controlled trial. *Lancet* 369 208-216.
- Dziennis S, Alkayed NJ (2008) Role of signal transducer and activator of transcription 3 in neuronal survival and regeneration. *Rev Neurosci* 19: 341–361.
- Ebert M, Sharp P (2012) Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149:515-524.
- Ebisch IM, Thomas CM, Peters WH, Braat DD, Steegers-Theunissen RP (2007) The importance of folate zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 13 163-174.
- Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang CF, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M (2010) Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* 65(3):373-84.
- Ehninger D, Li W, Fox K, Stryker MP, Silva AJ (2008) Reversing neurodevelopmental disorders in adults. *Neuron* 60 950–960.
- El Maghraoui A, Ghozlani I, Mounach A, Rezqi A, Oumghar K, Achemlal L, Bezza A, Ouzzif Z (2012) Homocysteine folate and vitamin B12 levels and vertebral fracture risk in postmenopausal women. *J Clin Densitom* 15 328-333.

- Evans HE (1928) The effect of inadequate vitamin B upon sexual physiology in the male. *J Nutr* 1:1-21.
- Eves EM, Tucker MS, Roback JD, Downen M, Rosne MR, Wainer BH (1992) Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4373-4377.
- Fan G, Beard C, Chen RZ, Csankovszki G, Sun Y, Siniaia M, Biniszkiewicz D, Bates B, Lee PP, Kuhn R, Trumpp A, Poon C, Wilson CB, Jaenisch R (2001) DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. *J Neurosci* 21:788-97.
- Farkas M, Keskitalo S, Smith DE, Bain N, Semmler A, Ineichen B, Smulders Y, Blom H, Kulic L, Linnebank M (2013a) Hyperhomocysteinemia in Alzheimer's disease: the hen and the egg? *J Alzheimers Dis* 33 1097-1104.
- Farkas SA, Bottiger AK, Isaksson HS, Finnell RH, Ren A, Nilsson TK (2013b) Epigenetic alterations in folate transport genes in placental tissue from fetuses with neural tube defects and in leukocytes from subjects with hyperhomocysteinemia. *Epigenetics* 8 303-316.
- Farrell BC, Power EM, Mc Dermott KW (2011) Developmentally regulated expression of Sox9 and microRNAs 124, 128 and 23 in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 29(1):31-6.
- Faulk C, Dolinoy DC (2011) Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics* 6 791-797.
- Fedosov SN (2012) Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *SubcellBiochem* 56 347-367.
- Fekete K, Berti C, Trovato M, Lohner S, Dullemeijer C, Souverein OW, Cetin I, Decsi T (2012) Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: a systematic review and metaanalysis on birth weight placental weight and length of gestation. *Nutr J* 11:75.
- Feng J, Chang H, Li E, Fan G (2005) Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res* 79:734-46.
- Feng J, Fouse S, Fan G (2007) Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res*. 61 R58–R63.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G (2010) Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13 423–430.
- Fernandez LL, Scheibe RM (2005) Is MTHFR polymorphism a risk factor for Alzheimer's disease like APOE? *ArqNeuropsiquiatr* 63(1):1-6.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Bicchiega V (2010) Effect of homocysteinylated high density lipoprotein physico-chemical properties. *ChemPhys Lipids* 163 228-235.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473 398–402.

- Finkelstein JD (2007) Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *ClinChem Lab Med*45 1694-1699.
- Finkelstein JD (1998) The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2:S40-44.
- Fiore R, Siegel G, Schrott G (2008) MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta* 1779(8):471-8.
- Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ, Guillemot F (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *GenesDev*14 67-80.
- Fong CS, Shyu HY, Shieh JC, Fu YP, Chin TY, Wang HW, Cheng CW (2011) Association of MTHFR MTR and MTRR polymorphisms with Parkinson's disease among ethnic Chinese in Taiwan. *Clin Chim Acta*412 332-338.
- Fonseca VA (2000) Risk factors for coronary heart disease in diabetes. *Ann Intern Med* 133(2):154-6.
- Ford AH, Flicker L, McCaul K, van Bockxmeer F, Hegarty S, Hirani V, Fenner S, Almeida OP (2010) The B-VITAGE trial: a randomized trial of homocysteine lowering treatment of depression in later life. *Trials*11 8.
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL (2007) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update* 13: 225-238
- Forges T, Pellanda H, Diligent C, Monnier P, Guéant JL (2008) [Do folates have an impact on fertility?]. *Gynecol Obstet Fertil* 36:930-9.
- Franco RF, Araújo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA (1998) Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost*79(1): 119-121.
- Frankfurt OS, Krishan A (2001) Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 49: 369–378.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuve LP, Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*10 111-113.
- Frye RE, Sequeira JM, Quadros EV, James SJ, Rossignol DA (2013) Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*18 369–381.
- Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM (1993) Homocysteine a risk factor for premature vascular disease and thrombosis induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb*13:1327-1333.
- Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T, Nakao M (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278:24132– 24138.

- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 278:4035-40.
- Fyfe JC, Hemker SL, Venta PJ, Fitzgerald CA, Outerbridge CA, Myers SL, Giger (2013) An exon 53 frameshift mutation in CUBN abrogates cuban function and causes Imlerslund-Grasbeck syndrome in dogs. *Mol Genet Metab* 109 390-396.
- Gabory A, Attig L, Junien C (2011) Epigenetic mechanisms involved in developmental nutritional programming. *World J Diabetes* 2 164-175.
- Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D (2000) Glutamyl hydrolase. pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacol Ther* 85:207-215.
- Gan Q, Salussolia CL, Wollmuth LP (2014) Assembly of AMPA receptors: mechanisms and regulation. *J Physiol* 593: 39-48.
- Garaschuk O, Schneggenburger R, Schirra C, Tempia F, Konnerth A (1996) Fractional Ca²⁺ currents through somatic and dendritic glutamate receptor channels of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* 15;491 (Pt 3):757-72.
- Garcia MM, Gueant-Rodriguez RM, Pooya S, Brachet P, Alberto JM, Jeannesson E, Maskali F, Gueguen N, Marie PY, Lacolley P, Herrmann M, Juilliere Y, Malthiery Y, Gueant JL (2011) Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *The Journal of pathology* 225: 324-335
- Gaustadnes M, Rudiger N, Rasmussen K, Ingerslev J (2000) Familial thrombophilia associated with homozygosity for the cystathionine beta-synthase 833T \rightarrow C mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1392-1395.
- Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308(5723):833e8.
- Girgenti MJ, LoTurco JJ, Maher BJ (2012) ZNF804a regulates expression of the schizophrenia-associated genes PRSS16 COMT PDE4B and DRD2. *PLoS One* 7 e32404.
- Giuditta A, Kaplan BB, van Minnen J, Alvarez J, Koenig E (2002) Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci* 25:400e4.
- Giustarini D, Dalle-Donne I, Lorenzini S, Selvi E, Colombo G, Milzani A, Fanti P, Rossi R (2012) Protein thiolation index (PTI) as a biomarker of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 53 907-915.
- Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, Refsum H, Drevon CA, Gjessing HK, Tell GS (2006) Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. *Archives of internal medicine* 166: 88-94
- Glasgow NG, Siegler Retchless B, Johnson JW (2015) Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties. *J Physiol.* 1;593(1):83-95.
- González E, Danehower D, Daub ME (2007) Vitamins levels, stress response, enzyme activity, and gene regulation of Arabidopsis lines mutant in the pyridoxine/pyridoxamine 5'-phosphate

oxidase (PDX3) and the pyridoxal kinase (SOS4) genes involved in the vitamin B6 salvage pathway. *Plant Physiol* 145(3):985-96.

Goto K, Numata M, Komura JI, Ono T, Bestor TH, Kondo H (1994) Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation* 56(1-2):39-44.

Gottfries CG, Lehmann W, Regland B (1998). Early diagnosis of cognitive impairment in the elderly with the focus on Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105(8-9): 773-786.

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

Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R (1998). Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mamm Genome* 9(8): 652-656.

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

Grau C, Arato K, Fernandez-Fernandez JM, Valderrama A, Sindreu C, Fillat C, Ferrer I, De la Luna S, Altafaj X (2014) DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser(1048) regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors. *Front Cell Neurosci* 17:8:331.

Gray JA, Shi Y, Usui H, Durrin MJ, Sakimura K, Nicoll RA (2011) Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion in vivo. *Neuron* 22:71(6):1085-101.

Greene ND, Stanier P, Copp AJ (2009) Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* 18 R113-129.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2003) The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432:235–240.

Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106(1):23–34.

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

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

Grosshans H, Johnson T, Reinert KL, Gerstein M, Slack FJ (2005) The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell* 8(3):321-30.

Growdon JH (2001). Incorporating biomarkers into clinical drug trials in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 3(3): 287-292.

Guadagnoli V, Stansbie D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S (1998) C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. *EARS group. Atherosclerosis* 136(2): 347-354.

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

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

Gueant JL, Champigneulle B, Gaucher P, Nicolas JP (1990) Malabsorption of vitamin B12 in pancreatic insufficiency of the adult and of the child. *Pancreas* 5:559-567.

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

Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL (2013b) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in endocrinology and metabolism* 24:279-289.

Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Candito M, Adjalla CE, Gibelin P, Herbeth B, Van Obberghen E, Gueant JL (2005) Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C MTRR2756G TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb Haemostasis* 94: 510-515.

Gueant-Rodriguez RM, Juilliere Y, Nippert M, Abdelmoutaleb I, Herbeth B, Aliot E, Danchin N, Gueant JL (2007) Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. *Journal of thrombosis and haemostasis* 5: 1209-1216.

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

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

Guilland JC, Lequeu B (1992) *Les vitamines: Du nutriment au médicament*. EM internationales. Paris.

Guilland J (2003) [Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 1. Basic data.] *Pathologie Biologie* 51(2): 101-110.

- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466(7308):835e40.
- Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang MH, Bonaguidi MA, Balazer JA, Eaves HL, Xie B, Ford E, Zhang K, Ming GL, Gao Y, Song H (2011) Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 14 1345–1351.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145 423–434.
- Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD, Paylor RE, Lubin FD (2010) Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci* 30 3589–3599.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, Mcgaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20(11):3993–4001.
- Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Doglio A, Bertrand E, Macara IG, Dargemont C (2002) Exportin-5 mediates nuclear export of mini-helix-containing RNAs. *J Biol Chem* 278(8):5505–5508.
- Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT (1998) Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* 273 9987-9993.
- Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA (2002) Epigenetic reprogramming in primordial germ cells. *Mech Dev* 117:15–23.
- Hall CA (1990) Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. *Am J Hematol* 34:121-7.
- Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Niemelä O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S, James SJ (2002) Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10072-7.
- Hamada S, Ogawai I, Yamasaki M, Kiyama Y, Kassai H, Watabe AM, Nakao K, Aiba A, Watanabe M, Manabe T (2014) The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. *Eur J Neurosci* 40(8):3136-46.
- Hamilton WJ, Boyd JD (1960) Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J Anat* 94:297-328.
- Hamm S, Just G, Lacoste N, Moitessier N, Szyf M, Mamer O (2008) On the mechanism of demethylation of 5-methylcytosine in DNA. *Bioorg Med Chem Lett* 18 ; 1046–1049.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2 a link between genetic and biochemical analysis of RNAi. *Science* 293(5532):1146–1150.
- Han J, Li Y, Wang D, Wei C, Yang X, Sui N (2010) Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prefrontal cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol* 642 93–98.

- Hanley JG (2014) Subunit-specific trafficking mechanisms regulating the synaptic expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. *Semin Cell Dev Biol* 27:14-22.
- Hansen KF, Karelina K, Sakamoto K, Wayman GA, Impey S, Obrietan K (2013) miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity. *Brain Struct Funct* 218(3):817-31.
- Hanz S, Perlson E, Willis D, Zheng JQ, Massarwa R, Huerta JJ, Koltzenburg M, Kohler M, Van-Minnen J, Twiss JL, Fainzilber M (2003) Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* 40(6):1095–1104.
- Haramati S, Chapnik E, Sztainberg Y, Eilam R, Zwang R, Gershoni N, McGlenn E, Heiser PW, Wills AM, Wirguin I, Rubin LL, Misawa H, Tabin CJ, Brown R, Jr Chen A, Hornstein E (2010) miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:13111-13116.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signaling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11(10) : 682-96
- Hargreaves DC, Horng T, Medzhitov R (2009) Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* 138 129–145.
- Hasegawa T, Ukai W, Jo DG, Xu X, Mattson MP, Nakagawa M, Araki W, Saito T, Yamada T (2005) Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 80 869-876.
- Hatada I, Namihira M, Morita S, Kimura M, Horii T, Nakashima K (2008) Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. *PLoS ONE* 11;3(9):e3189.
- Hawkins K, Mohamet L, Ritson S, Merry CL, Ward CM (2012) E-cadherin and in its absence N-cadherin promotes Nanog expression in mouse embryonic stem cells via STAT3 phosphorylation. *Stem Cells* 30 1842-1851.
- Haworth JC, Dilling LA, Surtees RA, Seargeant LE, Lue-Shing H, Cooper BA, Rosenblatt DS (1993) Symptomatic and asymptomatic methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in two adult brothers. *Am J Med Genet* 45:572-6.
- Hawthorne VS, Huang WC, Neal CL, Tseng LM, Hung MC, Yu D (2009) ErbB2-mediated Src and signal transducer and activator of transcription 3 activation leads to transcriptional up-regulation of p21Cip1 and chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7, 592-600.
- He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA, Iyengar R (2005) The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem* 280: 33426–33434.
- He X, Zhang Q, Liu Y, Pan X (2007) Cloning and identification of novel microRNAs from rat hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin* 39(9):708–714.
- Headstrom PD, Rulyak SJ, Lee SD (2008) Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 14: 217-223.
- Heider I, Lehmensiek V, Lenk T, Muller T, Storch A (2004) Dopaminergic neurotoxicity of homocysteine and its derivatives in primary mesencephalic cultures. *J Neural Transm Suppl* 1-13.

- Hellman A, Chess A (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome *Science* 315 1141–1143.
- Hengst U, Cox LJ, Macosko EZ, Jaffrey SR (2006) Functional and selective RNA interference in developing axons and growth cones. *J Neurosci* 26(21):5727–5732.
- Hernandez-Rapp J, Smith PY, Filali M, Goupil C, Planel E, Magill ST, Goodman RH, Hébert SS (2015) Memory formation and retention are affected in adult miR-132/212 knockout mice. *Behav Brain Res* 1;287:15-26.
- Herrmann W, Obeid R (2011) Biomarkers of neurodegenerative diseases. *Clinical chemistry and laboratory medicine / FESCC* 49: 343-344.
- Hirabayashi Y, Gotoh Y (2010) Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci* 11 377–388.
- Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB, Rogers E (2003) Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 14:32-42.
- Hoffman DR, Marion DW, Cornatzer WE, Duerre JA (1980) S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine L-homocystein and adenosine. *JBiolChem*255 10822-10827.
- Holt RL, Mikati MA (2011) Care for child development: basic science rationale and effects of interventions. *Pediatr Neurol* 44(4):239-53.
- Hornstein E, Mansfield JH, Yekta S, Hu JK, Harfe BD, McManus MT, Baskerville S, Bartel DP, Tabin CJ (2005). The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature* 438 671–674.
- Hu Y, Chen E, Mu Y, Li J, Chen R (2011) BHMT gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate in a Chinese population. *Biomed Environ Sci*24 89-93.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-42.
- Huang T, Liu Y, Huang M, Zhao X, Cheng L (2010) Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *J Mol Cell Biol* 2:152e63.
- Huang WW, Yang JS, Lin MW, Chen PY, Chiou SM, Chueh FS, Lan YH, Pai SJ, Tsuzuki M, Ho WJ, Chung JG (2012) Cucurbitacin E Induces G(2)/M Phase Arrest through STAT3/p53/p21 Signaling and Provokes Apoptosis via Fas/CD95 and Mitochondria-Dependent Pathways in Human Bladder Cancer T24 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*2012 952762.
- Huang Y, Qi Y, Du JQ, Zhang DF (2014) MicroRNA-34a regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting Smad4. *Expert Opin Ther Targets* 18(12):1355-65.
- Huettner JE (2003) Kainate receptors and synaptic transmission *Prog Neurobiol* 70(5):387-407.

- Hultberg B, Berglund M, Andersson A, Frank A (1993) Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 687-689.
- Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12(2):99–110.
- Hussein WI, Green R, Jacobsen DW, Faiman C (1999) Normalization of hyperhomocysteinemia with L-thyroxine in hypothyroidism. *Ann Intern Med* 131: 348-351.
- Hutvagner G, Mclachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293(5531):834–838.
- Hwang JY, Kaneko N, Noh KM, Pontarelli F, Zukin RS (2014) The gene silencing transcription factor REST represses miR-132 expression in hippocampal neurons destined to die. *J Mol Biol.* 9;426(20):3454-66.
- Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen YW, Boshnjaku V, Sharma S, Mania-Farnell B, McLone DG, Tomita T, Soares MB, Mayanil CS (2010) Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* 285: 36922-36932.
- Ihle JN (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* 13: 211–217.
- Ihrle RA, Alvarez-Buylla A (2008) Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res* 331(1):179-91.
- Ikeda S, Koyama H, Sugimoto M, Kume S (2012) Roles of one-carbon metabolism in preimplantation period-effects on short-term development and long-term programming. *J Reprod Dev* 58: 38-43.
- Ikeda S, Namekawa T, Sugimoto M, Kume S (2010) Expression of methylation pathway enzymes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 313: 129-136.
- Inada M, Toyoshima M, Kameyama M (1982) Cobalamin contents of the brains in some clinical and pathologic states. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale* 52: 423-429.
- Inamdar NM, Ehrlich KC, Ehrlich M (1991) CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea wheat soybean and cauliflower. *Plant Mol Biol* 17; 111–123
- 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 (2010) Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J Clin Invest* 120:1603-16.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion ES-cell self-renewal and inner cell mass specification *Nature* 466 ; 1129–1133

Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Geschwind DH, Kato T (2011) Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with nonneurons. *Genome Res* 21 688–696.

Iyer R, Tomar SK (2009) Folate: a functional food constituent. *Journal of food science* 74: R114-122.

Jacobsen DW (1998) Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 44 (Pt 2): 1833-1843.

Jacques PF, Bostom AG, Selhub J, Rich S, Ellison RC, Eckfeldt JH, Gravel RA, Rozen R, National Heart L, Blood Institute N.I.o.H. (2003) Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 166 49-55.

Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93 7-9.

Jain AK, Allton K, Iacovino M, Mahen E, Milczarek RJ, Zwaka TP, Kyba M, Barton MC (2012) p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS Biol*, 10, e1001268.

Jakovcevski M, Akbarian S (2012) Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med* 18(8):1194-204.

Jakubowski H (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem* 272 1935-1942.

Jakubowski H (2000) Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 130 377S-381S.

Jakubowski H (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 61 470-487.

Jakubowski H (2005) Anti-N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 43 1011-1014.

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

Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res* 87 45-51.

James SJ, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Caudill MA (2002) Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *J Nutr* 132 (8 Suppl): 2361S-2366S.

Jessell TM (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1 20–29.

- Jiang K, Ren C, Nair VD (2013) MicroRNA-137 represses Klf4 and Tbx3 during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 11 1299–1313.
- Jiang W, Nakayama Y, Sequeira JM, Quadros EV (2013) Mapping the functional domains of TCblR/CD320 the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *FASEB* (8): 2988-94.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 11;120(5):635-47.
- Johnston MV, Nishimura A, Harum K, Pekar J, Blue ME (2001) Sculpting the developing brain. *Adv Pediatr* 48:1-38.
- Joilin G, Guévremont D, Ryan B, Claudianos C, Cristino AS, Abraham WC, Williams JM (2014) Rapid regulation of microRNA following induction of long-term potentiation in vivo. *Front Mol Neurosci* 9;7:98.
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3 415-428.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187-91.
- Joosten E, Lesaffre E, Riezler R, Ghekiere V, Dereymaeker L, Pelemans W, Dejaeger E (1997) Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52(2): M76-79.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC (1999) Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction cognitive and motor behavioral deficits with blueberry spinach or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 19(18): 8114-8121.
- Joseph R (1999) Environmental influences on neural plasticity the limbic system emotional development and attachment: a review. *Child Psychiatry Hum Dev* 29(3):189-208.
- Jost JP (1993) Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine *Proc Natl Acad Sci USA* 90 ; 4684–4688.
- Ju W, Morishita W, Tsui J, Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Garner CC, Tsien RY, Ellisman MH, Malenka RC (2004) Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* 7(3):244-53.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep* 21(5):477–522.
- Kane MA, Elwood PC, Portillo RM, Antony AC, Kolhouse JF (1986) The interrelationship of the soluble and membrane-associated folate-binding proteins in human KB cells. *The Journal of biological chemistry* 261: 15625-15631.
- Kangaspeska S, Stride B, Metivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452; 112–115.

- Kapadia CR (1995) Vitamin B12 in health and disease: part I - inherited disorders of function, absorption and transport. *The Gastroenterologist* 3: 329-344.
- Kaplan BB, Gioio AE, Hillefors M, Aschrafi A (2009) Axonal protein synthesis and the regulation of local mitochondrial function. *Results Probl Cell Differ* 48:225–242.
- Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW (2007) MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol* 8; R173.
- Karnaze DS, Carmel R (1987) Low serum cobalamin levels in primary degenerative dementia. Do some patients harbor atypical cobalamin deficiency states? *Archives of internal medicine* 147: 429-431
- Kaut O, Schmitt I, Wullner U (2012) Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics* 13 87-91.
- Kawase-Koga Y, Low R, Otaegi G, Pollock A, Deng H, Eisenhaber F, Maurer-Stroh S, Sun T (2010) RNAase-III enzyme Dicer maintains signaling pathways for differentiation and survival in mouse cortical neural stem cells. *J Cell Sci* 123:586-594.
- Kawase-Koga Y, Otaegi G, Sun T (2009) Different timings of Dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. *Dev Dyn* 238:2800-2812.
- Kawashima H, Numakawa T, Kumamaru E, Adachi N, Mizuno H, Ninomiya M, Kunugi H, Hashido K (2010) Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression. *Neuroscience* 17;165(4):1301-11.
- Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM (2005) In fertility in 510-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol Reprod* 72:667-77.
- Kelsch W, Li Z, Wieland S, Senkov O, Herb A, Gongrich C, Monyer H (2014) GluN2B-containing NMDA receptors promote glutamate synapse development in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 26;34(48):16022-30.
- Kempisty B, Sikora J, Lianeri M, Szczepankiewicz A, Czerski P, Hauser J, Jagodzinski PP (2007) MTHFD 1958G>A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 17 177-181.
- Kerek R, Geoffroy A, Bison A, Martin N, Akchiche N, Pourié G, Helle D, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL (2013) Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis* 4 : 1-11.
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15(20):2654–2659.
- Khazaei S, Yousefi R, Alavian-Mehr MM (2012) Aggregation and fibrillation of eye lens crystallins by homocysteinylation; implication in the eye pathological disorders. *Protein* 13 717-727.

- Khodadadi S, Riazi GH, Ahmadian S, Hoveizi E, Karima O, Aryapour H (2012) Effect of N-homocysteinylation on physicochemical and cytotoxic properties of amyloid beta-peptide. *FEBS Lett* 586:127-131.
- Kim BJ, Koh JM, Ahn SH, Lee SH, Kim EH, Bae SJ, Kim HK, Choe JW, Lim KH, Pyun KH, Kim TH, Kim SY, Kim GS (2013) High serum total homocysteine levels accelerate hip bone loss in healthy premenopausal women and men. *Bone* 52:56-62.
- Kim HJ, Cho HK, Kwon YH (2008) Synergistic induction of ER stress by homocysteine and beta-amyloid in SH-SY5Y cells. *J Nutr Biochem* 19:754-761.
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti W, Voronov S, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007) A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317:1220-1224.
- Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G (2004) Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(1):360-365.
- Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Schöler HR (2009) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461(7264):649-3.
- Kim VN (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:376.
- Kim YZ (2014) Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res Treat* 2(1):7-21.
- Kim EJ, Ables JL, Dickel LK, Eisch AJ, Johnson JE (2011) *Ascl1* (*Mash1*) defines cells with long-term neurogenic potential in subgranular and subventricular zones in adult mouse brain. *PLoS One* 6, e18472.
- Kirke PN, Molloy AM, Daly LE, Burke H, Weir DG, Scott JM (1993) Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med* 86:703-8.
- Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimatsu M, Mizuno K, Hibi M, Hirano T (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the *c-myc* gene. *J Exp Med* 189:63-73.
- Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH (2006) In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods* 3:27-29.
- Knox R, Brennan-Minnella AM, Lu F, Yang D, Nakazawa T, Yamamoto T, Swanson RA, Ferriero DM, Jiang X (2014) NR2B phosphorylation at tyrosine 1472 contributes to brain injury in a rodent model of neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke* 45(10):3040-7.
- Kobus K, Ammar D, Nazari EM, Muller YM (2013) Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 97:386-397.
- Kolhouse JF, Allen RH (1977) Recognition of two intracellular cobalamin binding proteins and their identification as methylmalonyl-CoA mutase and methionine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:921-925.

- Kong YW, Cannell IG, de Moor CH, Hill K, Garside PG, Hamilton TL, Meijer HA, Dobbyn HC, Stoneley M, Spriggs KA, Willis AE, Bushell M (2008) The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 105; 8866–8871.
- Koshy AS, Kumari SJ, Ayyar V, Kumar P (2012) Evaluation of serum vitamin B12 levels in type 1 diabetics attending a tertiary care hospital: A preliminary cross-sectional study. *Indian journal of endocrinology and metabolism* 16 Suppl 1: S79-82.
- Kosik KS, Krichevsky AM (2005) The elegance of the microRNAs: a neuronal perspective. *Neuron* 47 779–782.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128 693–705.
- Krapels IP, van Rooij IA, Ocke MC, West CE, van der Horst CM, Steegers-Theunissen RP (2004) Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *J Nutr* 134:3106-3113.
- Kriaucionis S, Tahiliani M (2014) Expanding the epigenetic landscape: novel modifications of cytosine in genomic DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1;6(10):a018630.
- Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS (2006) Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24 857–864.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-84.
- Kronenberg G, Colla M, Endres M (2009) Folic acid neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Curr Mol Med* 9:315-23.
- Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP (2000) Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20 6920-6926.
- Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y, Haughey N, Lee J, Evans M, Mattson MP (2002) Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1752-1762.
- Kruman II, Mouton PR, Emokpae R, Jr. Cutler RG, Mattson MP (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* 16 1055-1059.
- Kubova H, Folbergrova J, Mares P (1995) Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. *Epilepsia* 36: 750-756.
- Kuhn W, Roebroek R, Blom H, van Oppenraaij D, Przuntek H, Kretschmer A, Buttner T, Voitalla D, Muller T (1998) Elevated plasma levels of homocysteine in Parkinson's disease. *European neurology* 40: 225-227.
- Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, Yagasaki Y, Izumi A, Niyaz M, Kudo M, Kunugi H (2008) Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 22(3):546-58.

- Kumari P, Ali A, Sukla KK, Singh SK, Raman R (2013) Lower incidence of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in females: is homocysteine a factor? *J Biosci* 38 21-26.
- Kumthekar AA, Gidwani HV, Kumthekar AB (2012) Metformin associated B12 deficiency. *The Journal of the Association of Physicians of India* 60: 58-60.
- Kutzbach C, Stokstad EL (1971) Mammalian methylenetetrahydrofolatereductase. Partial purification properties and inhibition by S-adenosylmethionine. *BiochimBiophysActa* 250 459-477.
- Kwon E, Wang W, Tsai LH (2011) Validation of schizophrenia-associated genes CSMD1 C10orf26 CACNA1C and TCF4 as miR-137 targets. *Mol Psychiatry* 18 11–12.
- Kwong WY, Adamiak SJ, Gwynn A, Singh R, Sinclair KD (2010) Endogenous folates and single-carbon metabolism in the ovarian follicle oocyte and pre-implantation embryo. *Reproduction* 139 705-715.
- Kye MJ, Liu T, Levy SF (2007) Somatodendritic microRNAs identified by laser capture and multiplex RT-PCR. *RNA* 13:1224–1234.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12 735–739.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129 ; 1401–1414.
- Laneve P, Gioia U, Andriotto A, Moretti F, Bozzoni I, Caffarelli E (2010) A minicircuitry involving REST and CREB controls miR-9-2 expression during human neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res* 38:6895-6905.
- LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, 3rd Dumitriu D, Feng J, Warren BL, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iñiguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthall W, Hollis F, Wang H, Noonan MA, Ren Y, Eisch AJ, Bolaños CA, Kabbaj M, Xiao G, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan G, Morrison JH, Nestler EJ (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13 1137–1143.
- Laraqui A, Allami A, Carrie A, Raisonnier A, Coiffard AS, Benkouka F, Bendriss A, Benjouad A, Bennouar N, El Kadiri N, Benomar A, Fellat S, Benomar M (2007) Relation between plasma homocysteine gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes and angiographically proven coronary artery disease. *Eur J Intern Med* 18 474-483.
- Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H (1981) Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J (Clin Res Ed)* 282(6275): 1509-1511.
- Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA (1998) Cloning and mapping of a cDNA for

methionine synthase reductase a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3059-3064.

Lee S, Kim W, Ham BJ, Chen W, Bear MF, Yoon BJ (2008) Activity-dependent NR2B expression is mediated by MeCP2-dependent epigenetic regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 930-4.

Leeda M, Riyazi N, de Vries JJ, Jakobs C, van Geijn HP, Dekker GA (1998) Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 179: 135-139.

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

Lentz SR (2005) Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3: 1646-1654.

Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C, Sakamaki T, Pestell R, Bromberg J (2006) Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res* 66: 2544-2552.

Lessard J, Wu J, Ranish J, Wan M, Winslow M, Staahl B, Wu H, Aebersold R, Graef I, Crabtree G (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55:201-215.

Leucht C, Stigloher C, Wizenmann A, Klafke R, Folchert A, Bally-Cuif L (2008) MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat Neurosci* 11: 641-648.

Leung KM, Horck FP, Lin AC, Allison R, Standart N, Holt CE (2006) Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* 9(10):1247-1256

Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, Malone LM, Sweatt JD (2006) Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 281: 15763-15773.

Levin J, Botzel K, Giese A, Vogeser M, Lorenzl S (2010) Elevated levels of methylmalonate and homocysteine in Parkinson's disease progressive supranuclear palsy and amyotrophic lateral sclerosis. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 29: 553-559.

Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992) Purification sequence and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69:905-14.

Li B, Sun M, Gao F, Liu W, Yang Y, Liu H, Cheng Y, Liu C, Cai J (2013) Up-regulated expression of miR-23a/b targeted the pro-apoptotic Fas in radiation-induced thymic lymphoma. *Cell Physiol Biochem* 32(6):1729-40.

Li R, Shi X, Ling F, Wang C, Liu J, Wang W, Li M (2015) MiR-34a suppresses ovarian cancer proliferation and motility by targeting AXL. *Tumour Biol* Ahead of print.

- Li X, Jin P (2010) Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nat Rev Neurosci* 11 329–338.
- Li Y, Wang F, Lee JA, Gao FB (2006) MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes Dev* 15;20(20):2793-805.
- Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD (1996) Cloning mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Mol Genet* 5(12): 1851-1858.
- Li Z, Sheng M (2003) Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:833-841.
- Liang P, Song F, Ghosh S, Morien E, Qin M, Mahmood S, Fujiwara K, Igarashi J, Nagase H, Held WA (2011) Genome-wide survey reveals dynamic widespread tissue-specific changes in DNA methylation during development. *BMC Genomics* 11;12(1):231
- Lièvre V, Becuwe P, Bianchi A, Bossenmeyer-Pourrié C, Koziel V, Franck P, Nicolas MB, Dauça M, Vert P, Daval JL (2001) Intracellular generation of free radicals and modifications of detoxifying enzymes in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. *Neuroscience* 105(2):287-97.
- Lildballe DL, Mutti E, Birn H, Nexø E (2012) Maximal load of the vitamin B12 transport system: a study on mice treated for four weeks with high-dose vitamin B12 or cobinamide. *PloS one* 7: e46657
- Lillien L (1998) Neuronal progenitors and stem cells: mechanisms of progenitor heterogeneity. *Curr Opin Neurobiol* 8:37-44
- Lim A, Sengupta S, McComb ME, Theberge R, Wilson WG, Costello CE, Jacobsen DW (2003) In vitro and in vivo interactions of homocysteine with human plasma transthyretin. *J Biol Chem* 278 49707-49713.
- Lim CP, Cao X (1999) Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK. *J Biol Chem* 274 31055-31061.
- Lim KH, Pyun KH, Kim TH, Kim SY, Kim GS (2013) High serum total homocysteine levels accelerate hip bone loss in healthy premenopausal women and men. *Bone* 52 56-62.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433 769-773.
- Lin ST, Fu YH (2009) miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis Model Mech* 2 178–188.
- Lin ST, Heng MY, Ptáček LJ, Fu YH (2014) Regulation of Myelination in the Central Nervous System by Nuclear Lamin B1 and Non-coding RNAs. *Transl Neurodegener* 5;3(1):4.
- Lin ST, Huang Y, Zhang L, Heng MY, Ptáček LJ, Fu YH (2013) MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 22;110(43):17468-73.
- Lin WF, Chen CJ, Chang YJ, Chen SL, Chiu IM, Chen L (2009) SH2B1 β enhances fibroblast growth factor 1 (FGF1)-induced neurite outgrowth through MEK-ERK1/2-STAT3-Egr1 pathway. *Cell Signal* 21 1060-1072.

Lind J (1983) Nutrition classics. A treatise of the scurvy by James Lind MDCCLIII. *Nutr Rev* 41(5):155-7.

Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH (1988) Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *The New England journal of medicine* 318: 1720-1728.

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNAmethylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462 315–322.

Liu A, Niswander LA (2005) Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6(12):945-54.

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

Liu J, Githinji J, McLaughlin B, Wilczek K, Nolte J (2012) Role of miRNAs in neuronal differentiation from human embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Stem Cell Rev* 8:1129-1137.

Liu XX, Wilson K, Charlton CG (2000) Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life sciences* 66: 2277-2288.

Lohmann C, Kessels HW (2014) The developmental stages of synaptic plasticity. *J Physiol* 1;592(Pt 1):13-31.

López-Quesada EL, Vilaseca MA, González S (2000). [Homocysteine and pregnancy]. *Med Clin (Barc)* 115(9): 352-356.

Lovblad K, Ramelli G, Remonda L, Nirkko AC, Ozdoba C, Schroth G (1997) Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol* 27 155-158.

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

Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429 883–891.

Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28 10576–10586.

Lucarelli M, Fusco A, Strom R, Scarpa S (2001) The dynamics of myogenin site-specific demethylation is strongly correlated with its expression and with muscle differentiation *J Biol Chem* 276; 7500–7506.

Ludwig ML, Matthews RG (1997) Structure-based perspectives on B12-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 66 269-313.

Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010) Quiescent and active hippocampal neural stem cells with

distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6:445-456.

Lugli G, Torvik VI, Larson J, Smalheiser NR (2008) Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J Neurochem* 106:650–661.

Luikart BW, Bensen AL, Washburn EK, Perederiy JV, Su KG, Li Y, Kernie SG, Parada LF, Westbrook GL (2011) miR-132 mediates the integration of newborn neurons into the adult dentate gyrus. *PLoS One* 6:e19077.

Lungu G, Stoica G, Ambrus A (2013) MicroRNA profiling and the role of microRNA-132 in neurodegeneration using a rat model. *Neurosci Lett* 11;553:153-8.

Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H (2009) Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 323 1074–1077.

Mabrouk H, Douki W, Mechri A, Younes MK, Omezzine A, Bouzlama A, Gaha L, Najjar MF (2011) [Hyperhomocysteinemia and schizophrenia: case control study]. *Encephale* 37 308-313.

Magill ST, Cambronne XA, Luikart BW, Liou DT, Leighton BH, Westbrook GL, Mandel G, Goodman RH (2010) microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(47):20382-7.

Mahalle N, Kulkarni MV, Garg MK, Naik SS (2013) Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia as correlates of cardiovascular risk factors in Indian subjects with coronary artery disease. *J Cardiol* 61 289-294.

Maiorano NA, Mallamaci A (2009) Promotion of embryonic cortico-cerebral neuronogenesis by miR-124. *Neural Dev* 2;4:40.

Majors AK, Sengupta S, Willard B, Kinter MT, Pyeritz RE, Jacobsen DW (2002) Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 1354-1359.

Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27 435–448.

Maller Schulman BR, Liang X, Stahlhut C, DelConte C, Stefani G, Slack FJ (2008) The let-7 microRNA target gene Mlin41/Trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle* 7 3935-3942.

Malouf M, Grimley EJ, Areosa SA (2003) Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia. *Cochrane Database Syst Rev* CD004514.

Manakov SA, Grant SG, Enright AJ (2009) Reciprocal regulation of microRNA and mRNA profiles in neuronal development and synapse formation. *BMC Genom* 10:419.

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

- Margueron R, Trojer P, Reinberg D (2005) The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15: 163–176.
- Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT (2006) MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res* 66: 10843-10848.
- Martin DC, Francis J, Protetch J, Huff FJ (1992) Time dependency of cognitive recovery with cobalamin replacement: report of a pilot study. *Journal of the American Geriatrics Society* 40: 168-172
- Martin KC, Casadio A, Zhu H, Yaping E, Rose JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1997) Synapse-specific long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* 91(7):927–938.
- Martin YN, Salavaggione OE, Eckloff BW, Wieben ED, Schaid DJ, Weinshilboum RM (2006) Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacogenet Genomics* 16: 265-277.
- Martinez NJ, Gregory RI (2010) MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell Stem Cell* 7(1):31–35.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302: 890–893.
- Matherly LH, Hou Z, Deng Y (2007) Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 26: 111-128.
- Mathonnet G, Fabion MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrich WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiating in vitro by targeting the cap binding complex eIF4F. *Science* 317:1764–1767.
- Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, Pajares MA (1997) S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther* 73: 265-280.
- Matsunaga E, Araki I, Nakamura H (2000) Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* 127: 2357-2365.
- Matthews PM (2001) Editorial commentary to Narayanan et al. Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *J Neurol* 248:987.
- Matthews RG, Ross J, Baugh CM, Cook JD, Davis L (1982) Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry* 21: 1230-1238.
- Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF (2000) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 301: 173-187.
- Mattson MP, Shea TB (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26: 137-146.

- McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK, Prior TW (1996) The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res* 15;83(2):195-8.
- McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S, Cattell H (1998) Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *International journal of geriatric psychiatry* 13: 235-239.
- McCully KS, Wilson RB (1975) Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 22 215-227.
- McGlenn E, Yekta S, Mansfield JH, Soutschek J, Bartel DP, Tabin CJ (2009) In ovo application of antagomiRs indicates a role for miR-196 in patterning the chick axial skeleton through Hox gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 18610–18615.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12; 342–348.
- McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *The New England journal of medicine* 350: 2042-2049.
- Meier C, Harbrecht U, Liedtke R, Oldenburg J, Conrad R, Imbierowicz K, Klingmuller D, Geiser F (2010) Relative hyperhomocysteinemia in patients with panic disorder: a case-control study. *Neuropsychobiology* 62 164-170.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454(7205):766-70.
- Mellanby E (1919) Nutrition Classics. *The Lancet* 1:407-12. An experimental investigation of rickets. *Nutr Rev* 1976 34(11):338-40.
- Melton ME, Kochman ML (1994) Reversal of severe osteoporosis with vitamin B12 and etidronate therapy in a patient with pernicious anemia. *Metabolism: clinical and experimental* 43: 468-469.
- Menezo Y, Khatchadourian C, Gharib A, Hamidi J, Greenland T, Sarda N (1989) Regulation of S-adenosyl methionine synthesis in the mouse embryo. *Life Sci* 44 1601-1609.
- Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M (2012) IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 122 143-159.
- Mikaëlsson MA, Miller CA (2011) DNA methylation: a transcriptional mechanism co-opted by the developed mammalian brain? *Epigenetics* 6 548–551.
- Miller BH, Zeier Z, Xi L, Lanz TA, Deng S, Strathmann J, Willoughby D, Kenny PJ, Elsworth JD, Lawrence MS, Roth RH, Edbauer D, Kleiman RJ, Wahlestedt C (2012) MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21;109(8):3125-30.
- Miller CA, Sweatt JD (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53; 857–869.

- Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD (2008) DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 89 599–603.
- Miller CA, Gavin CF, White JA, Parrish RR, Honasoge A, Yancey CR, Rivera IM, Rubio MD, Rumbaugh G, Sweatt JD (2010) Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* 13 664–666.
- Miller JW (1999) Homocysteine and Alzheimer's disease. *Nutr Rev* 57(4): 126-129.
- Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R (2002) Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 100:718-720.
- Miller JW, Selhub J, Nadeau MR, Thomas CA, Feldman RG, Wolf PA (2003) Effect of L-dopa on plasma homocysteine in PD patients: relationship to B-vitamin status. *Neurology* 60: 1125-1129
- Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA (1997) Effect of L-Dopa and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clinical neuropharmacology* 20: 55-66.
- Mills JL, McPartlin JM, Kirke PN, Lee YJ, Conley MR, Weir DG, Scott JM (1995) Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *Lancet* 345: 149-151.
- Mills JL, Scott JM, Kirke PN, McPartlin JM, Conley MR, Weir DG, Molloy AM, Lee YJ. (1996) Homocysteine and neural tube defects. *J Nutr* 126(3):756S-760S.
- Ming GL, Wong ST, Henley J, Yuan XB, Song HJ, Spitzer NC, Poo MM (2002) Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* 417(6887):411–418.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10(12):850-60.
- Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5(9):R68.
- Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ (1941) The concentration of 'folic acid'. *Journal of the American Chemistry Society* 63 2284.
- Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB, Bibel M, Schübeler D (2008) Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30 755–766.
- Molina V, Medici M, Taranto MP, Font de Valdez G (2008) Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. *Arch Anim Nutr* 62 162-168.
- Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL (2008) Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal infant and child development. *Food Nutr Bull* 29 S101-111; discussion S112-105.

- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279 52353–52360.
- Morgan MW (1988) Vision through my aging eyes. *J Am Optom Assoc* 59:278-280.
- Morin I, Platt R, Weisberg I, Sabbaghian N, Wu Q, Garrow TA, Rozen R (2003) Common variant in betaine-homocysteinemethyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. *Am J Med Genet A* 119A 172-176.
- Morris MS, Jacques PF, Selhub J (2005) Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 37: 234-242
- Mott FW (1894) The Sensory Motor Functions of the Central Convolutions of the Cerebral Cortex. *J Physiol* 15(6):464-i2.
- Motti D, Bixby JL, Lemmon VP (2012) MicroRNAs and neuronal development. *Semin Fetal Neonatal Med.* 17(6):347-52.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16:720–728.
- Moyers S, Bailey LB (2001) Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. *Nutr Rev* 59:215-24.
- Mudd SH (1985) Vascular disease and homocysteine metabolism. *N Engl J Med* 313 751-753.
- Mudd SH, Cantoni GL (1958) Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' yeast. *J Biol Chem* 231 481-492.
- Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR, Jacobsen DW, Brattstrom L, Wilcken B, Wilcken DE, Blom HJ, Stabler SP, Allen RH, Selhub J, Rosenberg IH (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *ArteriosclerThrombVascBiol* 20 1704-1706.
- 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 (1985) The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 37:1-31.
- Mueller BR, Bale TL (2008) Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci* 28 9055–9065.
- Mulla MJ, Myrtolli K, Brosens JJ, Chamley LW, Kwak-Kim JY, Paidas MJ, Abrahams VM (2010) Antiphospholipid antibodies limit trophoblast migration by reducing IL-6 production and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 63 339-348.
- Müller F, O'Rahilly R (1980) The human chondrocranium at the end of the embryonic period proper with particular reference to the nervous system. *Am J Anat* 159(1):33-58.
- Müller F, O'Rahilly R (1983) The first appearance of the major divisions of the human brain at stage 9. *Anat Embryol (Berl)* 168(3):419-32.
- Müller F, O'Rahilly R (1985) The first appearance of the neural tube and optic primordium in the human embryo at stage 10. *Anat Embryol (Berl)* 172(2):157-69.

- Müller F, O'Rahilly R (1986) The development of the human brain and the closure of the rostral neuropore at stage 11. *Anat Embryol (Berl)* 175(2):205-22.
- Müller F, O'Rahilly R (1988) The development of the human brain from a closed neural tube at stage 13. *Anat Embryol (Berl)* 177(3):203-24.
- Müller F, O'Rahilly R (1988) The first appearance of the future cerebral hemispheres in the human embryo at stage 14. *Anat Embryol (Berl)* 177(6):495-511.
- Müller F, O'Rahilly R (1989) The human brain at stage 16 including the initial evagination of the neurohypophysis. *Anat Embryol (Berl)* 179(6):551-69.
- Müller F, O'Rahilly R (1990) The human brain at stages 21-23 with particular reference to the cerebral cortical plate and to the development of the cerebellum. *Anat Embryol (Berl)* 182(4):375-400.
- Müller F, O'Rahilly R (1987) The development of the human brain the closure of the caudal neuropore and the beginning of secondary neurulation at stage 12. *Anat Embryol (Berl)* 176(4):413-30.
- Muller T, Werne B, Fowler B, Kuhn W (1999) Nigral endothelial dysfunction homocysteine and Parkinson's disease. *Lancet* 354: 126-127.
- Murase S, Kim E, Lin L, Hoffman DA, McKay RD (2012) Loss of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling during elevated activity causes vulnerability in hippocampal neurons. *J Neurosci* 31;32(44):15511-20.
- Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmühl Y, Fischer D, Holsboer F, Wotjak CT, Almeida OF, Spengler D (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci* 12 1559–1566.
- Murphy JA, Stein IS, Lau CG, Peixoto RT, Aman TK, Kaneko N, Aromolaran K, Saulnier JL, Popescu GK, Sabatini BL, Hell JW, Zukin RS (2014) Phosphorylation of Ser1166 on GluN2B by PKA is critical to synaptic NMDA receptor function and Ca²⁺ signaling in spines. *J Neurosci* 15;34(3):869-79.
- Murray PJ (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178, 2623-2629.
- Mychasiuk R, Zahir S, Schmolz N, Ilnytsky S, Kovalchuk O, Gibb R (2012) Parental enrichment and offspring development: modifications to brain behavior and the epigenome. *Behav Brain Res* 228 294–298.
- Nagao M, Sugimori M, Nakafuku M (2007) Cross talk between notch and growth factor/cytokine signaling pathways in neural stem cells. *Mol Cell Biol* 27 3982-3994.
- Naharci I, Bozoglu E, Karadurmus N, Emer O, Kocak N, Kilic S, Doruk H, Serdar M (2012) Vitamin B(12) and folic acid levels as therapeutic target in preserving bone mineral density (BMD) of older men. *Archives of gerontology and geriatrics* 54: 469-472.
- Najib S, Sanchez-Margalet V (2005) Homocysteine thiolactone inhibits insulin-stimulated DNA and proteinsynthesis: possible role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) glycogen synthase kinase-3(GSK-3) and p70 S6K phosphorylation. *J Mol Endocrinol* 34:119-126.

- Namekata K, Enokido Y, Ishii I, Nagai Y, Harada T, Kimura H (2004) Abnormal lipid metabolism in cystathioninebeta-synthase-deficient mice an animal model for hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 279:52961-52969.
- Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Gueant J (2001) Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 97:1092-1098.
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88:471-81.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-9.
- Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, den Heijer M, Thomas CM, Eskes TK (2000) Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol* 95(4): 519-524.
- Nelson PT, Hatzigeorgiou AG, Mourelatos Z (2004) miRNP: mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA* 10 ; 387–394.
- Nervo M, Lubini A, Raimundo FV, Faulhaber GA, Leite C, Fischer LM, Furlanetto TW (2011) Vitamin B12 in metformin-treated diabetic patients: a cross-sectional study in Brazil. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 57: 46-49.
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23:58–61.
- Nguyen TT, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM (1997) Human intestinal folate transport:cloning expression and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* 112:783-791.
- Nicolas JP, Gueant JL (1995) Gastric intrinsic factor and its receptor. *BaillieresClinHaematol* 8 515-531.
- Nicolas JP, Gueant JL (1994) [Absorption distribution and excretion of vitamin B12]. *Annales de gastroenterology et d'hepatologie* 30: 270-276 281; discussion 281-272.
- Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK (2012) Vitamin B12transport from food to the body's cells - a sophisticated multistep pathway. *Nature reviews Gastroenterology &hepatology* 9: 345-354.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison S (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf expression. *Cell* 135:227-239.
- Novikova SI, He F, Bai J, Cutrufello NJ, Lidow MS, Undieh AS (2008) Maternal cocaine administration in mice alters DNA methylation and gene expression in hippocampal neurons of neonatal and prepubertal offspring. *PLoS ONE* 3 e0001919.
- Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20 ; 214–220.

- Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010) BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol* 25(2):237-58.
- Obeid R, Schadt A, Dillmann U, Kostopoulos P, Fassbender K, Herrmann W (2009) Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin Chem* 55: 1852-1860.
- Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J (2006) Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 12;1161–1167.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130(1):89–100.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99; 247–257.
- Olde Loohuis NF, Kos A, Martens GJ, Van Bokhoven H, Nadif Kasri N, Aschrafi A (2012) MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell Mol Life Sci* 69: 89-102.
- O'Leary F, Samman S (2010) Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients* 2(3):299-316.
- Olsen L, Klausen M, Helboe L, Nielsen FC, Werge T (2009) MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One* 4(10):1–7.
- Oltean S, Banerjee R (2003) Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J Biol Chem* 278: 20778-20784.
- O'Neill C (1998) Endogenous folic acid is essential for normal development of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 13: 1312-1316.
- O'Rahilly R (1970) The manifestation of the axes of the human embryo. *Z Anat Entwicklungsgesch* 132(1):50-7.
- O'Rahilly R (1979) Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 9(4):273-80.
- O'Rahilly R, Bossy J, Müller F (1981) [Introduction to the study of embryonic stages in man]. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 65(189):141-236.
- O'Rahilly R, Gardner E (1979) The initial development of the human brain. *Acta Anat (Basel)* 104(2):123-33.
- O'Rahilly R, Müller F (1981) The first appearance of the human nervous system at stage 8. *Anat Embryol (Berl)* 163(1):1-13.
- O'Rahilly R, Müller F (1984) Embryonic length and cerebral landmarks in staged human embryos. *Anat Rec* 209(2):265-71.
- O'Rahilly R, Müller F (1986) The meninges in human development. *J Neuropathol Exp Neurol* 45(5):588-608.
- O'Rahilly R, Müller F (1990) Ventricular system and choroid plexuses of the human brain during the embryonic period proper. *Am J Anat* 189(4):285-302.

- O'Rahilly R, Muller F, Meyer DB (1980) The human vertebral column at the end of the embryonic period proper. 1. The column as a whole. *J Anat* 131(Pt 3):565-75.
- O'Rahilly R, Müller F (2010) Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs* 192(2):73-84.
- O'Rahilly R, Muller F (1987) Stages in early human development. In Feichtinger W. and Kemeter P. (ed.). *Future Aspects in Human in vitro Fertilization*. Springer Berlin.
- Orozco-Barrios CE, Battaglia-Hsu SF, Arango-Rodriguez ML, Ayala-Davila J, Chery C, Alberto JM, Schroeder H, Daval JL, Martinez-Fong D, Gueant JL (2009) Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PloS one* 4: e8268.
- O'Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Lacritz L, Dewey RB Jr., Bottiglieri T, Diaz-Arrastia R (2004) Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor affective and cognitive associations. *Archives of neurology* 61: 865-868.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10; 475–478.
- Otaegi G, Pollock A, Hong J, Sun T (2011) MicroRNA miR-9 modifies motor neuron columns by a tuning regulation of FoxP1 levels in developing spinal cords. *J Neurosci* 31:809-818.
- Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL (2008) The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 28 14341–14346.
- Pai B, Siripornmongcolchai T, Berentsen B, Pakzad A, Vieuille C, Pallesen S, Pajak M, Simpson TI, Armstrong JD, Wibrand K, Bramham CR (2014) NMDA receptor-dependent regulation of miRNA expression and association with Argonaute during LTP in vivo. *Front Cell Neurosci* 13;7:285.
- Panza F, Frisardi V, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Vendemiale G, Capurso A, Solfrizzi V (2009) Possible role of S-adenosylmethionine S-adenosylhomocysteine and polyunsaturated fatty acids in predementia syndromes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16(3): 467-470.
- Paoli P, Sbrana F, Tiribilli B, Caselli A, Pantera B, Cirri P, De Donatis A, Formigli L, Nosi D, Manao G, Camici G, Ramponi G (2010) Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils. *J Mol Biol* 400 889-907.
- Papakostas GI, Shelton RC, Zajecka JM, Etemad B, Rickels K, Clain A, Baer L, Dalton ED, Sacco GR, Schoenfeld D, Pencina M, Meisner A, Bottiglieri T, Nelson E, Mischoulon D, Alpert JE, Barbee JG, Zisook S, Fava M (2012) L-methylfolate as adjunctive therapy for SSRI-resistant major depression: results of two randomized double-blind parallel-sequential trials. *Am J Psychiatry* 169 1267-1274.
- Park S, Kim D, Kaneko S, Szewczyk KM, Nicosia SV, Yu H, Jove R, Cheng JQ (2005) Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *J Biol Chem* 280 38932-38941.

- Park SJ, Shin EJ, Min SS, An J, Li Z, Hee Chung Y, Hoon Jeong J, Bach JH, Nah SY, Kim WK, Jang CG, Kim YS, Nabeshima Y, Nabeshima T, Kim HC (2013) Inactivation of JAK2/STAT3 signaling axis and downregulation of M1 mAChR cause cognitive impairment in klotho mutant mice a genetic model of aging. *Neuropsychopharmacology* 38 1426-1437.
- Pasquinelli A (2012) MicroRNAs and their targets: recognition regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13:271-282.
- Pathania M, Torres-Reveron J, Yan L, Kimura T, Lin TV, Gordon V, Teng ZQ, Zhao X, Fulga TA, Van Vactor D, Bordey A (2012) miR-132 enhances dendritic morphogenesis spine density synaptic integration and survival of newborn olfactory bulb neurons. *PLoS One* 7(5):e38174.
- Pedersen GA, Chakraborty S, Steinhauser AL, Traub LM, Madsen M (2010) AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B(12) receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic* 11 706-720.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A (2010) Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328 753–756.
- Pelizzola M, Koga Y, Urban AE, Krauthammer M, Weissman S, Halaban R, Molinaro AM (2008) MEDME: an experimental and analytical methodology for the estimation of DNA methylation levels based on microarray derived MeDIPenrichment. *Genome Res* 18; 1652–1656
- Pereira AC, Lambert HK, Grossman YS, Dumitiru D, Waldman R, Jannetty SK, Calakos K, Janssen WG, McEwen BS, Morrison JH (2014) Glutamatergic regulation prevents hippocampal-dependent age-related cognitive decline through dendritic spine clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* 30; 111(52):18733-8.
- Perez-Duenas B, Toma C, Ormazabal A, Muchart J, Sanmarti F, Bombau G, Serrano M, Garcia-Cazorla A, Cormand B, Artuch R (2010) Progressive ataxia and myoclonic epilepsy in a patient with a homozygous mutation in the FOLR1 gene. *J Inherit Metab Dis* 33 795-802.
- Perla-Kajan J, Jakubowski H (2012) Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism. *Amino Acids* 43 1405-1417.
- Perna AF, Satta E, Acanfora F, Lombardi C, Ingrosso D, De Santo NG (2006) Increased plasma protein homocysteinylolation in hemodialysis patients. *KidneyInt* 69 869-876.
- Peter ME (2010) Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene* 29:2161-2164.
- Pflipsen MC, Oh RC, Saguil A, Seehusen DA, Seaquist D, Topolski R (2009) The prevalence of vitamin B(12) deficiency in patients with type 2 diabetes: a cross –sectional study. *Journal of the American Board of Family Medicine* 22:528-534.
- Plath N, Ohana O, Dammermann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, Mao X, Engelsberg A, Welzl H, Kobalz Stawrakakis A, Waltereit R, Therstappen E, Cooke SF, Kuhl D (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52: 437-44.

- Poehlmann TG, Busch S, Mussil B, Winzer H, Weinert J, Mebes I, Schaumann A, Fitzgerald JS, Markert UR (2005) The possible role of the Jak/STAT pathway in lymphocytes at the fetomaternal interface. *Chem Immunol Allergy* 89: 26-35.
- Poirier LA, Brown AT, Fink LM, Wise CK, Randolph CJ, Delongchamp RR, Fonseca VA (2001) Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism* 50:1014-1018.
- Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, Giudicelli J, Alberto JM, Gueant-Rodriguez RM, Jeannesson E, Gueguen N, Bressenot A, Nicolas B, Malthiery Y, Daval JL, Peyrin-Biroulet L, Bronowicki JP, Gueant JL (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α ERR- α and HNF-4 α in the rat liver. *Journal of hepatology* 57: 344-351.
- Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463; 1101–1105.
- Preethi J, Singh HK, Charles PD, Rajan KE (2012) Participation of microRNA 124-CREB pathway: a parallel memory enhancing mechanism of standardised extract of *Bacopa monniera* (BESEB CDRI-08). *Neurochem Res* 37(10):2167-77.
- Priester M, Copanaki E, Vafaizadeh V, Hensel S, Bernreuther C, Glatzel M, Seifert V, Groner B, Kogel D, Weissenberger J (2013) STAT3 silencing inhibits glioma single cell infiltration and tumor growth. *NeuroOncol* 15 840-852.
- Pront R, Margalioth EJ, Green R, Eldar-Geva T, Maimoni Z, Zimran A, Elstein D (2009) Prevalence of low serum cobalamin in infertile couples. *Andrologia* 41 46-50.
- Przybyla LM, Theunissen TW, Jaenisch R, Voldman J (2013) Matrix remodeling maintains embryonic stem cell self-renewal by activating Stat3. *Stem Cells* 31 1097-1106.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127 917-928.
- Qu Q, Sun G, Li W, Yang S, Ye P, Zhao C, Yu R, Gage F, Evans R, Shi Y (2010) Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/betacatenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol* 12:31-40.
- Quadros EV, Sequeira JM (2013) Cellular uptake of cobalamin: transcobalamin and the TCblR/CD320 receptor. *Biochimie* 95 1008-1018.
- Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM (2009) The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood* 113 186-192.
- Quere I, Paul V, Rouillac C, Janbon C, London J, Demaille J, Kamoun P, Dufier JL, Abitbol M, Chasse JF (1999) Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. *Biochem Biophys Res Commun* 254 127-137.
- Qureshi GA, Qureshi AA, Devrajani BR, Chippa MA, Syed SA (2008) Is the deficiency of vitamin B12 related to oxidative stress and neurotoxicity in Parkinson's patients? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7 20-27.

- Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR (2008) DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase a glycosylase and gadd45. *Cell* 135;1201–1212.
- Rajaseethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, Betel D, Puthanveetil S, Russo J, Sander C, Tuschl T, Kandel E (2009) Characterization of small RNAs in *Aplysia* reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB. *Neuron* 63:803-817.
- Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR (1997) Elevated homocysteine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 90 168-171.
- Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D (2010) *Ascl1a* regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol* 12(11):1101-7.
- Ramaekers VT, Blau N, Sequeira JM, Nassogne MC, Quadros EV (2007) Folate receptor autoimmunity and cerebral folate deficiency in low-functioning autism with neurological deficits. *Neuropediatrics* 38 276-81.
- Ramaekers VT, Thöny B, Sequeira JM, Ansseaud M, Philippe P, Boemer F, Bours V, Quadros EV (2014) Folinic acid treatment for schizophrenia associated with folate receptor autoantibodies. *Molecular Genetics and Metabolism* 113 307–314.
- Ramaekers VT, Quadros EV, Sequeira JM (2013) Role of folate receptor autoantibodies in infantile autism. *Molecular Psychiatry* 18 270-271.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci USA* 96; 6107–6112.
- Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP (2009) A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 106; 671–678.
- Ray L, Khemka VK, Behera P, Bandyopadhyay K, Pal S, Pal K, Basu D, Chakrabarti S (2013) Serum Homocysteine Dehydroepiandrosterone Sulphate and Lipoprotein (a) in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Aging Dis* 4 57-64.
- Razin A, Cedar H (1977) Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 2725–2728.
- Razin A, Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. *Science* 210 604–610.
- Razin A, Shemer R (1995) DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet* 4 1751–1755.
- Razin A, Szyf M (1984) DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochim Biophys Acta* 782 331–342.
- Razin A, Szyf M, Kafri T, Roll M, Giloh H, Scarpa S, Carotti D, Cantoni GL (1986) Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA demethylation during differentiation *Proc Natl Acad Sci USA* 83 2827–2831.
- Rebeille F, Jabrin S, Bligny R, Loizeau K, Gambonnet B, Van Wilder V, Douce R, Ravel S (2006) Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a gamma-cleavage process

and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 15687-15692.

Refsum H, Guttormsen AB, Fiskerstrand T, Ueland PM (1998) Hyperhomocysteinemia in terms of steady-state kinetics. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2 S45-49.

Regland B, Johansson BV, Grenfeldt B, Hjelmgren LT, Medhus M (1995) Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J Neural Transm Gen Sect* 100 165-169.

Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29;361(1473):1545-64.

Remenyi J, Hunter CJ, Cole C, Ando H, Impey S, Monk CE, Martin KJ, Barton GJ, Hutvagner G, Arthur JS (2010) Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins. *Biochem J* 13; 428(2):281-91.

Remenyi J, van den Bosch MW, Palygin O, Mistry RB, McKenzie C, Macdonald A, Hutvagner G, Arthur JS, Frenguelli BG, Pankratov Y (2013) miR-132/212 knockout mice reveal roles for these miRNAs in regulating cortical synaptic transmission and plasticity. *PLoS One* 26;8(4):e62509.

Reynolds EH, Preece JM, Bailey J, Coppen A (1970) Folate deficiency in depressive illness. *Br J Psychiatry* 117 287-292.

Reynolds EH (1992) Multiple sclerosis and vitamin B12 metabolism. *Journal of neuroimmunology* 40: 225-230.

Robert K, Nehme J, Bourdon E, Pivert G, Friguet B, Delcayre C, Delabar JM, Janel N (2005) Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver. *Gastroenterology* 128, 1405-1415.

Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK (1989) Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 161 1200-1204.

Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1:11-9.

Roblin X, Pofelski J, Zarski JP (2007b) [Steatosis chronic hepatitis virus C infection and homocysteine]. *Gastroenterologie clinique et biologique* 31: 415-420.

Roblin X, Phelip JM, Genevois M, Ducros V, Bonaz B (2007a) Hyperhomocysteinaemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 25: 797-804.

Rodgers GM, Kane WH (1986) Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* 77:1909-1916.

Rodriguez-Esparragon F, Serna-Gomez JA, Hernandez-Velazquez E, Buset-Rios N, Hernandez-Trujillo Y, Garcia-Bello MA, Rodriguez-Perez JC (2012) Homocysteinylated protein levels in internal mammary artery (IMA) fragments and its genotype-dependence. S-homocysteine-induced methylation modifications in IMA and aortic fragments. *Mol Cell Biochem* 369 235-246.

- Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, Kaller M, Horst D, Ziegler PK, Schwitalla S, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Greten FR, Hermeking H (2014) IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest* 124(4):1853-67.
- Rosenberg IH (1990) 1989 Herman Award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers. *The American journal of clinical nutrition* 51: 531-534.
- Roth TL, Sweatt JD (2011) Annual Research Review: Epigenetic mechanisms and environmental shaping of the brain during sensitive periods of development. *J Child Psychol Psychiatry* 52 398–408.
- Rouso DL, Gaber ZB, Wellik D, Morrisey EE, Novitch BG (2008) Coordinated actions of the forkhead protein Foxp1 and Hox proteins in the columnar organization of spinal motor neurons. *Neuron* 59 226–240.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448(7149):83–86.
- Rummel C, Hubschle T, Gerstberger R, Roth J (2004) Nuclear translocation of the transcription factor STAT3 in the guinea pig brain during systemic or localized inflammation. *J Physiol* 557 671-687.
- Russell-Jones GJ, Alpers DH (1999) Vitamin B12 transporters. *Pharmaceutical biotechnology* 12: 493-520
- Russi AE, Brown MA (2015) The meninges: new therapeutic targets for multiple sclerosis. *Transl Res* 165(2):255-69.
- Russo C, Morabito F, Luise F, Piromalli A, Battaglia L, Vinci A, Trapani Lombardo V, de Marco V, Morabito P, Condino F, Quattrone A, Aguglia U (2008) Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. *Journal of neurology* 255: 64-69.
- Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagne C, Toliat MR, Nurnberg G, Wittkamp T, Buers I, Sharifi A, Stucki M, Becker C, Baumgartner M, Robenek H, Marquardt T, Hohne W, Gasnier B, Rosenblatt DS, Fowler B, Nurnberg P (2009) Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B12 metabolism. *Nature genetics* 41: 234-239.
- Ruzov A, Tsenkina Y, Serio A, Dudnakova T, Fletcher J, Bai Y, Chebotareva T, Pells S, Hannoun Z, Sullivan G, Chandran S, Hay DC, Bradley M, Wilmut I, De Sousa P (2011) Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* 21 1332–1342.
- Ryan B, Joilin G, Williams JM (2015) Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. *Front Mol Neurosci* 23;8:4.
- Ryu H, Lee J, Hagerty SW, Soh BY, McAlpin SE, Cormier KA, Smith KM, Ferrante RJ (2006) ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 19176–19181.
- Safi J, Joyeux L, Chalouhi GE (2012) Periconceptional folate deficiency and implications in neural tube defects. *J Pregnancy* 2012:295083.

- Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* 116:1e9.
- Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, Petrelli NJ, Dunn SP, Krueger LJ (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 15;67(20):9762-70.
- Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith J, van Heyningen V, Rubenstein JL, Livesey FJ (2009) The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* 5:e1000511.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419; 407–411.
- Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K (2011) MicroRNAs and epigenetics. *Febs J* 278:1598-1609.
- Saunders L, Sharma A, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, Willenbring H, Verdin E (2010) miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging* 2:415-431.
- Schacher S, Wu F (2002) Synapse formation in the absence of cell bodies requires protein synthesis. *J Neurosci* 22(5):1831–1839.
- Schade SG, Schilling RF (1967) Effect of pepsin on the absorption of food vitamin B12 and iron. *Am J Clin Nutr* 20:636-40.
- Schaefer A, O'Carroll DN, Tan C, Hillman D, Sugimori M, Llinas R, Greengard P (2007) Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J Exp Med* 204:1553-1558.
- Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tassone F, Hertz-Picciotto I (2012) 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. *The American journal of clinical nutrition* 96: 80-89.
- Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM (2002) Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid vitamin B12 and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *The journal of the American Medical Association* 288: 973-979.
- Schnyder G, Roffi M, Pin R, Flammer Y, Lange H, Eberli FR, Meier B, Turi ZG, Hess OM (2001) Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *The New England journal of medicine* 345: 1593-1600.
- Schubert J, Krost B (2006) [Prevention of cleft lip and palate.Reducing risk of recurrence - a 25-year clinical experience]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 10:301-305.
- Schwahn BC, Chen Z, Laryea MD, Wendel U, Lussier-Cacan S, Genest J Jr., Mar MH, Zeisel SH, Castro C, Garrow T, Rozen R (2003) Homocysteine-betaine interactions in a murine model of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *FASEB J* 17:512-514.

- Schwamborn J, Berezikov E, Knoblich J (2009) The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* 136:913-925.
- Scott CE, Wynn SL, Sesay A, Cruz C, Cheung M, Gomez Gaviro MV, Booth S, Gao B, Cheah KS, Lovell-Badge R, Briscoe J (2010) SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat Neurosci* 13:1181-1189.
- Scott HL, Tamagnini F, Narduzzo KE, Howarth JL, Lee YB, Wong LF, Brown MW, Warburton EC, Bashir ZI, Uney JB (2012) MicroRNA-132 regulates recognition memory and synaptic plasticity in the perirhinal cortex. *Eur J Neurosci* 36(7):2941-8.
- Scott JM, Weir DG (1998) Folic acid homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 5:223-227.
- Seetharam B, Bagur SS, Alpers DH (1982) Isolation and characterization of proteolytically derived ileal receptor for intrinsic factor-cobalamin. *J Biol Chem* 257:183-9.
- Seetharam B, Bose S, Li N (1999) Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *The Journal of nutrition* 129: 1761-1764.
- Seetharam B, Levine JS, Ramasamy M, Alpers DH (1988) Purification properties and immunochemical localization of a receptor for intrinsic factor-cobalamin complex in the rat kidney. *J Biol Chem* 263(9): 4443-4449.
- Seetharam B, Li N (2000) Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitamins and hormones* 59: 337-366.
- Sehm T, Sachse C, Frenzel C, Echeverri K (2009) miR-196 is an essential early-stage regulator of tail regeneration upstream of key spinal cord patterning events. *Dev Biol* 334 468-480.
- Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 19 217-246.
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. (1993) Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270(22): 2693-2698.
- Sellier C, Freyermuth F, Tabet R, Tran T, He F, Ruffenach F, Alunni V, Moine H, Thibault C, Page A, Tassone F, Willemsen R, Disney MD, Hagerman PJ, Todd PK, Charlet-Berguerand N (2013) Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep* 28;3(3):869-80.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5(3):R13.
- Serot JM, Christmann D, Dubost T, Béne MC, Faure GC (2001). CSF-folate levels are decreased in late-onset AD patients. *J Neural Transm* 108(1): 93-99.
- Sery O, Sramkova T, Klempova J, Stastny F, Lochman J, Khan NA (2012) The relationship between the C677T polymorphism of the MTHFR gene and serum levels of luteinizing hormone in males with erectile dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett* 33 499-504.

- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA (2002) Plasma Homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 346:476-83.
- Shen JC, Rideout WMD, Jones PA (1992) High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell* 71; 1073–1080.
- Shettles LB (1962) Human fertilization. *Obstet Gynecol* 20:750-4.
- Shettles LB (1963) [Nidation of human embryo]. *Med Klin* 58:1623-4.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941–953.
- Shibata M, Kurokawa D, Nakao H, Ohmura T, Aizawa S (2008) MicroRNA-9 modulates Cajal–Retzius cell differentiation by suppressing *Foxg1* expression in mouse medial pallium. *J Neurosci* 28:10415-10421.
- Shibata M, Nakao H, Kiyonari H, Abe T, Aizawa S (2011) MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *J Neurosci* 31: 3407-3422.
- Shilatifard A (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression *Annu Rev Biochem* 75 243–269.
- Shiloh R, Weizman A, Weizer N, Dorfman-Etrog P, Munitz H (2001) [Antidepressive effect of pyridoxine (vitamin B6) in neuroleptic-treated schizophrenic patients with co-morbid minor depression - preliminary open-label trial]. *Harefuah* 140(5): 369-373 456.
- Shipton OA, Paulsen O (2013) GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2;369 (1633):20130163.
- Shivapurkar N, Poirier LA (1983) Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient amino acid-defined diets for one to five weeks. *Carcinogenesis* 4: 1051-1057.
- Shookhoff JM, Gallicano GI (2010) A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. *Genesis* 48 282-294.
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, Kandel ER (2003) A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapsespecific long-term facilitation in aplysia. *Cell* 115(7):893–904.
- Sibai BM (1999) Thrombophilias and adverse outcomes of pregnancy - what should a clinician do? *N Engl J Med* 340 50-52.
- Sibrian-Vazquez M, Escobedo JO, Lim S, Samoei GK, Strongin RM (2010) Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 551-554.
- Silber J, Jacobsen A, Ozawa T, Harinath G, Pedraza A, Sander C, Holland EC Huse JT (2012) miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. *PLoS One* 7(3):e33844.

- Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 24;6:14.
- Sinha M, Ghose J, Bhattacharyya NP (2011) MicroRNA-214, -150, -146a and-125b target Huntingtin gene. *RNA Biol* 8(6):1005-21.
- Siqueira ER, Oliveira CP, Muniz MT, Silva F, Pereira LM, Carrilho FJ (2011) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and high plasma homocysteine in chronic hepatitis C (CHC) infected patients from the Northeast of Brazil. *Nutr J* 10 86.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5 659-669.
- Smart F, Aschrafi A, Atkins A, Owens GC, Pilotte J, Cunningham BA, Vanderklish PW (2007) Two isoforms of the cold-inducible mRNA-binding protein RBM3 localize to dendrites and promote translation. *J Neurochem* 101(5):1367–1379.
- Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21;1469–1477.
- Smith AD (2008) The worldwide challenge of the dementias: a role for B vitamins and homocysteine? *Food and nutrition bulletin* 29: S143-172.
- Smith AD, Smith SM, de Jager CA, Whitbread P, Johnston C, Agacinski G, Oulhaj A, Bradley KM, Jacoby R, Refsum H (2010) Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial. *PloS one* 5: e12244.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 76-85.
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* 51 944-950.
- Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J (1983) Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1(8332): 1027-1031.
- Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW (1980) Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1(8164): 339-340.
- Smrt RD, Szulwach KE, Pfeiffer RL, Li X, Guo W, Pathania M, Teng ZQ, Luo Y, Peng J, Bordey A, Jin P, Zhao X (2010) MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. *Stem Cells* 28 1060–1070.
- Snowdon DA, Tully CL, Smith CD, Riley KP, Markesbery WR (2000) Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study. *Am J Clin Nutr* 71(4): 993-98.

- Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Lucock M, Kim YI (2004) Effect of the methylenetetrahydrofolatereductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 96: 134-144.
- Sonenberg N, Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* 13(1):56–63.
- Sørensen AL, Jacobsen BM, Reiner AH, Andersen IS, Collas P (2010) Promoter DNA methylation patterns of differentiated cells are largely programmed at the progenitor stage. *Mol Biol Cell* 21: 2066–2077.
- Spence JD, Bang H, Chambless LE, Stampfer MJ (2005) Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36: 2404-2409.
- Sprince H, Parker CM, Josephs JA Jr. (1969) Homocysteine-induced convulsions in the rat: protection by homoserine, serine, betaine, glycine and glucose. *Agents and actions* 1: 9-13.
- Stabler SP, Allen RH (2004) Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr* 24: 299-326.
- Stark KL, Xu B, Bagchi A, Lai WS, Liu H, Hsu R, Wan X, Pavlidis P, Mills AA, Karayiorgou M, Gogos JA (2008) Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat Genet* 40:751e60.
- Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Blom HJ, Nijhuis JG, Thomas CM, Borm GF, Eskes TK (1995) Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 172(5): 1436-1441.
- Stegers-Theunissen RP, Boers GH, Trijbels FJ, Finkelstein JD, Blom HJ, Thomas CM, Borm GF, Wouters MG, Eskes TK (1994) Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects? *Metabolism* 43:1475-80.
- Stone KL, Bauer DC, Sellmeyer D, Cummings SR (2004) Low serum vitamin B-12 levels are associated with increased hip bone loss in older women: a prospective study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89: 1217-1221.
- Stover PJ (2011) Polymorphisms in 1-carbon metabolism epigenetics and folate-related pathologies. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 4: 293-305.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41–45.
- Streeter GL (1942) Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI 13 to 20 somites and age group XII 21 to 29 somites. *Carnegie Inst Wash Publ* 541, *Contrib Embryol* 30: 211-245.
- Strelling MK (1976) Editorial: Transfer of folate to the fetus. *Dev Med Child Neurol* 18:533-535.
- Stroylova YY, Chobert JM, Muronetz VI, Jakubowski H, Haertle T (2012) N-homocysteinylated ovine prion protein induces amyloid-like transformation. *Arch Biochem Biophys* 526: 29-37.

- Stroylova YY, Zimny J, Yousefi R, Chobert JM, Jakubowski H, Muronetz VI, Haertle T (2011) Aggregation and structural changes of alpha(S1)- beta- and kappa-caseins induced by homocysteinylation. *Biochim Biophys Acta*1814 1234-1245.
- Sudchada P, Saokaew S, Sridetch S, Incampa S, Jaiyen S, Khaithong W (2012) Effect of folic acid supplementation on plasma total homocysteine levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*98 151-158.
- Sugimori M, Nagao M, Bertrand N, Parras CM, Guillemot F, Nakafuku M (2007) Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development*134 1617-1629.
- Sun AX, Crabtree GR, Yoo AS (2013) MicroRNAs: regulators of neuronal fate. *Curr Opin Cell Biol* 25(2):215-21.
- Sun G, Ye P, Murai K, Lang MF, Li S, Zhang H, Li W, Fu C, Yin J, Wang A, Ma X, Shi Y (2011) miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat Commun* 8;2:529.
- Sun K, Westholm JO, Tsurudome K, Hagen JW, Lu Y, Kohwi M, Betel D, Gao FB, Haghghi AP, Doe CQ, Lai EC (2012) Neurophysiological defects and neuronal gene deregulation in *Drosophila* mir-124 mutants. *PLoS Genet* 8(2):e1002515.
- Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA (1997) Betaine-homocysteine-methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *ArchBiochemBiophys*345 171-174.
- 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 (2013) Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism spectrum disorders in children. *JAMA* 309:570-7.
- Susser E, Brown AS, Klonowski E, Allen RH, Lindenbaum J (1998) Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association. *Biol Psychiatry*44 141-143.
- Suzuki T, Matsuo K, Hirose K, Hiraki A, Kawase T, Watanabe M, Yamashita T, Iwata H, Tajima K (2008) One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*29 356-362.
- Swanson JM, Entringer S, Buss C, Wadhwa PD (2009) Developmental origins of health and disease: environmental exposures. *Semin Reprod Med* 27:391-402.
- Szulwach KE, Li X, Smrt RD, Li Y, Luo Y, Lin L, Santistevan NJ, Li W, Zhao X, Jin P (2010) Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J Cell Biol* 189 127–141.
- Szyf M, Theberge J, Bozovic V (1995) Ras induces a general DNA demethylation activity in mouse embryonal P19 cells. *J Biol Chem* 270; 12690–12696.
- Szymanski W, Kazdepka-Zieminska A (2003) Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity. *Ginekol Pol* 74:1392-6.

- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930–935.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 1;64(11):3753-6.
- Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 3801-3804.
- Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1 749–758.
- Tang LS, Santillano DR, Wlodarczyk BJ, Miranda RC, Finnell RH (2005) Role of Folbp1 in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. *Am J Med Genet CSemin Med Genet* 135C:48-58.
- Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Oner C, Oner R, Cetin M, Abdelaal MA, Ismail EA, Lissens W, Krahe R, Broch H, Grasbeck R, de la Chapelle A (2004) Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Human mutation* 23: 327-333.
- Tanner SM, Sturm AC, Baack EC, Liyanarachchi S, de la Chapelle A (2012) Inherited cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. *Orphanet journal of rare diseases* 7: 56.
- Tarantino C, Paoletta G, Cozzuto L, Minopoli G, Pastore L, Parisi S, Russo T (2010) miRNA 34a, 100 and 137 modulate differentiation of mouse embryonic stem cells. *FASEB J* 24 3255–3263.
- Tay Y, Zhang J, Thomson A, Lim B, Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455:1124-1128.
- Tchantchou F (2006) Homocysteine metabolism and various consequences of folate deficiency. *J Alzheimers Dis* 9:421-7.
- Tchantchou F, Graves M, Falcone D, Shea TB (2008) S-adenosylmethionine mediates glutathione efficacy by increasing glutathione S-transferase activity: implications for S-adenosyl methionine as a neuroprotective dietary supplement. *J Alzheimers Dis* 14 323-328.
- Teng YW, Mehedint MG, Garrow TA, Zeisel SH (2011) Deletion of betaine-homocysteine S-methyltransferase in mice perturbs choline and 1-carbon metabolism resulting in fatty liver and hepatocellular carcinomas. *J Biol Chem* 286 36258-36267.
- Testut L (1899) *Traité d'anatomie humaine*. 4e éd. rev. corr. et augm. Doin (Paris).
- Teunissen CE, Killestein J, Kragt JJ, Polman CH, Dijkstra CD, Blom HJ (2008) Serum homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 79: 1349-1353.

- Thomas PK, Hoffbrand AV, Smith IS (1982) Neurological involvement in hereditary transcobalamin II deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45:74-77.
- Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM (2004) A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Methods* 1(1):47-53.
- Timofeeva OA, Chasovskikh S, Lonskaya I, Tarasova NI, Khavrutskii L, Tarasov SG, Zhang X, Korostyshevskiy VR, Cheema A, Zhang L, Dakshanamurthy S, Brown ML, Dritschilo A (2012) Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *J Biol Chem* 287:14192-14200.
- Toth C, Breithaupt K, Ge S, Duan Y, Terris JM, Thiessen A, Wiebe S, Zochodne DW, Suchowersky O (2010) Levodopa methylmalonic acid and neuropathy in idiopathic Parkinson disease. *Annals of neurology* 68: 28-36.
- Tsukamoto H, Lu SC (2001) Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J* 15:1335-1349.
- Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP (2005) Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20: 152-158
- Tuerxun T, Numakawa T, Adachi N, Kumamaru E, Kitazawa H, Kudo M, Kunugi H (2010) SA4503, a sigma-1 receptor agonist, prevents cultured cortical neurons from oxidative stress-induced cell death via suppression of MAPK pathway activation and glutamate receptor expression. *Neurosci Lett* 29;469(3):303-8.
- Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R (1998) Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 18: 2545-2552.
- Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, Beckers NG, Visser JA, Lindemans J, de Jong FH, Laven JS, Steegers-Theunissen RP (2011) Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E322-9.
- Ueland PM, Refsum H (1989) Plasma homocysteine a risk factor for vascular disease: plasma levels in health disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 114: 473-501.
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *ClinChem* 39: 1764-1779.
- Undas A, Williams EB, Butenas S, Orfeo T, Mann KG (2001) Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C. *J BiolChem* 276: 4389-4397.
- Vadnal J, Houston S, Bhatta S, Freeman E, McDonough J (2012) Transcriptional signatures mediated by acetylation overlap with early-stage Alzheimer's disease. *Exp Brain Res* 221: 287-297.
- van der Put NM, Blom HJ (2000) Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92: 57-61.

- Vanaerts LA, Blom HJ, Deabreu RA, Trijbels FJ, Eskes TK, Copius Peereboom-Stegeman JH, Noordhoek J (1994) Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. *Teratology* 50:348-360.
- Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R (2007) Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 143A 952-960.
- Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2007) The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 1;21(7):744-9.
- Vo NK, Cambonne XA, Goodman RH (2010) MicroRNA pathways in neural development and plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 20 457-465.
- Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, Impey S (2005) A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 16426-16431.
- Vogt M, Domszalai T, Kleshchanok D, Lehmann S, Schmitt A, Poli V, Richter W, Muller-Newen G (2011) The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3. *J Cell Sci* 124 900-909.
- von Baer KE (1827) *De ovimammalium et hominis genesi*. Sumptibus L. Vossii, Leipzig.
- von Baer KE (1828) *Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion* 2 vols. Königsberg: Bornträger 1828-1837.
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23:62-66.
- Wagner C (1995) Biochemical role of folate in cellular metabolism. Bailey L.B. eds. *Folate in Health and Disease* 1995:23-42.
- Wakahara R, Kunimoto H, Tanino K, Kojima H, Inoue A, Shintaku H, Nakajima K (2012) Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells* 17 132-145.
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 21:1857-1862 28.
- Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M (2011) Serum homocysteine and dementia: meta-analysis of eight cohort studies including 8669 participants. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 7: 412-417.
- Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325: 1202
- Wald NJ, Watt HC, Law MR, Weir DG, McPartlin J, Scott JM (1998). Homocysteine and ischemic heart disease: results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch Intern Med* 158:862-7.

- Wallin J, Wilting J, Koseki H, Fritsch R, Christ B, Balling R (1994) The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* 120: 1109-1121.
- Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, Conley AJ, Nguyen HP, Ames BN, Halsted CH (2007) Chronic ethanol perturbs testicular folate metabolism and dietary folate deficiency reduces sex hormone levels in the Yucatan micropig. *Biol Reprod* 76:455- 65.
- Wan J, Fu AK, Ip FC, Ng HK, Hugon J, Page G, Wang JH, Lai KO, Wu Z, Ip NY (2010) Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30 6873-6881.
- Wanet A, Tacheny A, Arnould T, Renard P (2012) miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res* 40(11):4742-53.
- Wang AY, Wang M, Woo J, Lam CW, Lui SF, Li PK, Sanderson JE (2004) Inflammation residual kidney function and cardiac hypertrophy are interrelated and combine adversely to enhance mortality and cardiovascular death risk of peritoneal dialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 2186-2194.
- Wang BX, Yin BL, He B, Chen C, Zhao M, Zhang WX, Xia ZK, Pan YZ, Tang JQ, Zhou XM, Yin N (2012) Overexpression of DNA damage-induced 45 α gene contributes to esophageal squamous cell cancer by promoter hypomethylation. *J Exp Clin Cancer Res* 31: 11.
- Wang CM, Tsai SN, Yew TW, Kwan YW, Ngai SM (2010) Identification of histone methylation multiplicities patterns in the brain of senescence-accelerated pronemouse 8. *Biogerontology* 11 87–102.
- Wang DO, Kim SM, Zhao Y, Hwang H, Miura SK, Sossin WS, Martin KC (2009) Synapse- and stimulus-specific local translation during long-term neuronal plasticity. *Science* 324(5934):1536–1540.
- Wang DO, Martin KC, Zukin RS (2010) Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. *Trends Neurosci* 33(4):173–182.
- Wang JQ, Guo ML, Jin DZ, Xue B, Fibuch EE, Mao LM (2014) Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *Eur J Pharmacol* 5;728:183-7.
- Wang W, Kwon EJ, Tsai LH (2012) MicroRNAs in learning memory and neurological diseases. *Learn Mem* 19: 359-68.
- Wang Y, Zhao R, Russell RG, Goldman ID (2001) Localization of the murine reducedfolate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochimicaetbiophysicaacta* 1513: 49-54.
- Wang Y, Fan DX, Duan J, Li MQ, Zhu XY, Jin LP (2012b) Thymic stromal lymphopoietin downregulates NME1 expression and promotes invasion in human trophoblasts via the activation of STAT3 signaling pathway. *Clin Immunol* 143 88-95.
- Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blueloch R (2007) DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 39; 380–385.

Watkins D, Ru M, Hwang HY, Kim CD, Murray A, Philip NS, Kim W, Legakis H, Wai T, Hilton JF, Ge B, Doré C, Hosack A, Wilson A, Gravel RA, Shane B, Hudson TJ, Rosenblatt DS (2002). Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency cblG: structure of the MTR gene genotype diversity and recognition of a common mutation P1173L. *Am J Hum Genet* 71(1): 143-153.

Watkins D, Schwartzenuber JA, Ganesh J, Orange JS, Kaplan BS, Nunez LD, Majewski J, Rosenblatt DS (2011) Novel inborn error of folate metabolism: identification by exome capture and sequencing of mutations in the MTHFD1 gene in a single proband. *J Med Genet* 48 590-592.

Watt F, Molloy PL (1998) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 2:1136-43.

Wayman GA, Davare M, Ando H, Fortin D, Varlamova O, Cheng HY, Marks D, Obrietan K, Soderling TR, Goodman RH, Impey S (2008) An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(26):9093-8.

Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7 847-854.

Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M (2005) Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 25 11045-11054.

Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M (2006) Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 3480-3485.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007) Distribution silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39 457-466.

Weber M, Kuhn C, Schulz S, Schiessl B, Schleussner E, Jeschke U, Markert UR, Fitzgerald JS (2012) Expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and its activated forms is negatively altered in trophoblast and decidual stroma cells derived from preeclampsia placentae. *Histopathology* 60 657-662.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R (1998) A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64(3): 169-172.

Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, Eckfeldt JH, Rozen R (2001) The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 156 409-415.

Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA (1992) Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer research* 52: 6708-6711.

- Weng R, Cohen S (2012) *Drosophila* miR-124 regulates neuroblast proliferation through its target anachronism. *Development* 139:1427-1434.
- Wenstrom KD, Johannang GL, Owen J, Johnston KE, Acton S, Tamura T (2000) Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype in the etiology of neural tube defects. *Am J Med Genet* 90 (1): 12-16.
- Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA (1993) Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 269 1257-1261.
- Wheeler G, Ntounia-Fousara S, Granda B, Rathjen T, Dalmay T (2006) Identification of new central nervous system specific mouse microRNAs. *FEBS Lett* 580;2195–2200.
- White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Cappai R (2001) 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* 76: 1509-20.
- Whitehead G, Jo J, Hogg EL, Piers T, Kim DH, Seaton G, Seok H, Brumericier G, Son GH, Regan P, Hildebrandt L, Waite E, Kim BC, Kerrigan TL, Kim K, Whitcomb DJ, Collingridge GL, Lightman SL, Cho K (2013) Acute stress causes rapid synaptic insertion of Ca²⁺ - permeable AMPA receptors to facilitate long-term potentiation in the hippocampus. *Brain* 136(Pt 12):3753-65.
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309 310–311.
- Wiklund O, Fager G, Andersson A, Lundstam U, Masson P, Hultberg B (1996) N-acetylcysteine treatment lowers plasma homocysteine but not serum lipoprotein(a) levels. *Atherosclerosis* 119:99-106.
- Wilks A, Seldran M, Jost JP (1984) An estrogen-dependent demethylation at the 5' end of the chicken vitellogenin gene is independent of DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 12 1163–1177.
- Wills L (1931) Treatment of “pernicious anaemia of pregnancy” and “tropical anaemia”. *Br Med J* 20; 1(3676):1059-64.
- Wilson A, Leclerc D, Saberi F, Campeau E, Hwang HY, Shane B, Phillips JA 3rd, Rosenblatt DS, Gravel RA (1998) Functionally null mutations in patients with the cblG-variant form of methionine synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 63(2):409-14.
- Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R (1999) A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab* 67(4): 317-323.
- Wilson FA, Holtrop G, Calder AG, Anderson SE, Lobleby GE, Rees WD (2012) Effects of methyl-deficient diets on methionine and homocysteine metabolism in the pregnant rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302 E1531-1540.
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180(3):619-32.

- Wong HK, Veremeyko T, Patel N, Lemere CA, Walsh DM, Esau C, Vanderburg C, Krichevsky AM (2013) De-repression of FOXO3a death axis by microRNA-132 and -212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1;22(15):3077-92.
- Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, Hamel BC, Blom HJ, Steegers-Theunissen RP (1999) Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*60 253-257.
- Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK (1993) Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril*60 820-825.
- Wozniak W, O'Rahilly R, Olszewska B (1980) The fine structure of the spinal cord in human embryos and early fetuses. *J Hirnforsch* 21(1):101-24.
- Wu H, Coskun V, Tao J, Xie W, Ge W, Yoshikawa K, Li E, Zhang Y, Sun YE. (2010) Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 329 444–448.
- Wu J, Xie X (2006) Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol* 7; R85.
- Wu S, Huang S, Ding J, Zhao Y, Liang L, Liu T, Zhan R, He X (2010) Multiple microRNAs modulate p21^{Cip1}/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* 29:2302-2308.
- Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R (2007) Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J* 21(2):415-26.
- Wurst W, Bally-Cuif L (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat Rev Neurosci* 2 99–108.
- Xia XG, Hofmann HD, Deller T, Kirsch M (2002) Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats. *Mol Cell Neurosci*21 379-392.
- Yamane K, Jinnin M, Etoh T, Kobayashi Y, Shimozono N, Fukushima S, Masuguchi S, Maruo K, Inoue Y, Ishihara T, Aoi J, Oike Y, Ihn H (2013) Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J Mol Med (Berl)*91 69-81.
- Yamanishi M, Vlasie M, Banerjee R (2005) Adenosyltransferase: an enzyme and a escort for coenzyme B12? *Trends in biochemical sciences* 30: 304-308.
- Yao R, Schneider E, Ryan TJ, Galivan J (1996) Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 10134-10138
- Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K (2000) Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD. *Neurology* 55:437-40.
- Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ (2013) The long and short of microRNA. *Cell* 153:516-519.

- Yates Z, Lucock M (2003) Interaction between common folate polymorphisms and B-vitamin nutritional status modulates homocysteine and risk for a thrombotic event. *Mol Genet Metab* 79(3):201-13.
- Yi LT, Li J, Liu BB, Luo L, Liu Q, Geng D (2014) BDNF-ERK-CREB signalling mediates the role of miR-132 in the regulation of the effects of oleanolic acid in male mice. *J Psychiatry Neurosci* 39(5):348-59.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011–3016.
- Yin J, Lin J, Luo X, Chen Y, Li Z, Ma G, Li K (2014) miR-137: a new player in schizophrenia. *Int J Mol Sci* 15(2):3262-71.
- Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR (2009) MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 460 642-646.
- Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, Lee-Messer C, Dolmetsch RE, Tsien RW, Crabtree GR (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476(7359):228e31.
- Yoo EJ, Cajiao I, Kim JS, Kimura AP, Zhang A, Cooke NE, Liebhaber SA (2006) Tissue-specific chromatin modifications at a multigene locus generate asymmetric transcriptional interactions. *Mol Cell Biol* 26(15):5569-79.
- Yoon SN, Kim KS, Cho JH, Ma W, Choi HJ, Kwon SJ, Han JS (2012) Phospholipase D1 mediates bFGF-induced Bcl-2 expression leading to neurite outgrowth in H19-7 cells. *Biochem J* 441 407-416.
- Yoshii A, Constantine-Paton M (2010) Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol* 70(5):304-22.
- Yu H, Pardoll D, Jove R (2009a) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9 798-809.
- Yu JY, Chung KH, Deo M, Thompson RC, Turner DL (2008) MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp Cell Res* 314:2618e33.
- Zajac MS, Pang TY, Wong N, Weinrich B, Leang LS, Craig JM, Saffery R, Hannan AJ (2010) Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus* 20 621–636.
- Zampieri BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Vannucchi H, Carvalho VM, Cordeiro JA, Pavarino EC (2012) Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. *Dis Markers* 32 73-81.
- Zetterberg H (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2:7.
- Zhang CE, Tian Q, Wei W, Peng JH, Liu GP, Zhou XW, Wang Q, Wang DW, Wang JZ (2008a) Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 29 1654-1665.

- Zhang X, Huang G, Liu H, Chang H, Wilson JX (2012) Folic acid enhances Notch signaling in hippocampal neurogenesis and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia. *Nutr Neurosci* 15:55-61.
- Zhang X, Poo MM (2002) Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron* 36(4):675–688.
- Zhang XM, Zhu SW, Duan RS, Mohammed AH, Winblad B, Zhu J (2008b) Gender differences in susceptibility to kainic acid-induced neurodegeneration in aged C57BL/6 mice. *Neurotoxicology* 29:406-412.
- Zhang Y, Tohyama K, Winterbottom JK, Haque NS, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN (2001) Correlation between putative inhibitory molecules at the dorsal root entry zone and failure of dorsal root axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 17(3):444–459.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13:1924–1935.
- Zhao C, Sun G, Li S, Lang MF, Yang S, Li W, Shi Y (2010) MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:1876-1881.
- Zhao C, Sun G, Li S, Shi Y (2009) A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat Struct Mol Biol* 16:365-371.
- Zhao JB, Zhang Y, Li GZ, Su XF, Hang CH (2011) Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats. *Neurosci Lett* 498:147-152.
- Zhao R, Matherly LH, Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert reviews in molecular medicine* 11: e4.
- Zhao YN, Li WF, Li F, Zhang Z, Dai YD, Xu AL, Qi C, Gao JM, Gao J (2013) Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 435(4):597-602.
- Zhu BT (2003) Medical hypothesis: hyperhomocysteinemia is a risk factor for estrogen-induced hormonal cancer. *Int J Oncol* 22:499-508.
- Zhuo JM, Wang H, Pratico D (2011) Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor an AD marker or neither? *Trends Pharmacol Sci* 32:562-571.
- Zhuo JM, Praticò D (2010) Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate vitamin B6 and B12-deficient diet. *Exp Gerontol* 45:195–201.
- Zingg JM, Shen JC, Jones PA (1998) Enzyme-mediated cytosine deamination by the bacterial methyltransferase M.MspI. *Biochem J* 332: 223–230.
- Zoccolella S, Simone IL, Lamberti P, Samarelli V, Tortelli R, Serlenga L, Logroscino G (2008) Elevated plasma homocysteine levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 70: 222-225.

Zorina Y, Iyengar R, Bromberg KD (2010) Cannabinoid 1 receptor and interleukin-6 receptor together induce integration of protein kinase and transcription factor signaling to trigger neurite outgrowth. *J Biol Chem* 285 1358-1370.

FICHES TECHNIQUES

Fiche 1

Rats Wistar – Entretien

➤ **Animaux et hébergement**

- Espèce: rats Wistar RJ-Han IGS (2 mois, 180-210 g)
- Acclimatation : 2 semaines
- Hébergement : stabulation, 22-23°C, cycle jour/nuit de 12h
- Eau et nourriture : Ad libitum

➤ **Régimes alimentaires**

- Régime sous forme de croquettes standard non carencées en vitamine B12 (0,04 mg/kg), folates (0,9 mg/kg), choline (2100 mg/kg) : pour les femelles non carencées et les mâles reproducteurs
- Régime sous forme de croquettes dépletées en vitamine B12 (0 µg/kg), folates (0,01 mg/kg) et appauvrie en choline (0,06 mg/kg) : pour les femelles carencées.
- Adaptation : un mois avant la mise en accouplement.
- Durée : Jusqu'au sevrage des nouveaux nés (21^{ème} jour post-natal). Après le sevrage tous les animaux sont entretenus avec le régime standard.

➤ **Reproduction**

- Accouplement : Mise en présence des mâles en fin d'après-midi (2-3 femelles/mâles) en cage de reproduction.
- Retrait : Séparation mâle/femelle au matin, retour en stabulation
- Frottis : Récupération des cellules vaginales et sécrétions par frottis vaginal (coton-tige et sérum physiologique). L'observation de spermatozoïdes sur les lames au microscope optique en contraste de phase détermine le jour de l'accouplement, défini comme le jour 0 embryonnaire (E0). Les femelles positives au frottis sont pesées et maintenues en stabulation individuelle. Les femelles négatives sont remises en accouplement jusqu'à l'obtention d'un frotti positif.
- Gestation : 21 jours, suivis du poids
- Lactation: 21 jours de lactation avant le sevrage
- Standardisation de l'étude : Les portées sont réduites à dix individus. Au sevrage les individus sont séparés des mères et hébergés en stabulation.

Fiche 2

Rats Wistar – Supplémentation

➤ **Solution d'acide folique**

La supplémentation en vitamines B9 est réalisée à l'aide d'une solution de vitamine B9 sous forme acide folique

➤ **Traitement et administration**

- Conditionnement : 1mL de lait concentré mis en libre accès aux femelles
- Dose quotidienne : 3mg B9/kg/jr
- Administration : 1mL de lait concentré en guise de véhicule, mélangé ou non à la solution de B9, prise per os
- Précautions liées à la gestation: pas de contraintes (solution en libre accès) pour éviter le stress qui pourrait nuire à la gestation
- Suivi du traitement : pesée des femelles tous les deux jours pour ajuster la dose administrée
- Durée : du stade E13 à E20 pour le protocole embryonnaire, du stade E13 à J21 pour le protocole post-natal. Après la parturition la supplémentation des nouveau-nés est assurée jusqu'au sevrage par le biais du lait maternel.

Fiche 3

Rats Wistar – Prélèvements des échantillons

➤ **Mise à mort**

- Mise à mort des animaux par excès d'isoflurane et décapitation

• **Prélèvements sanguins**

- Prélèvement dans des tubes héparinés et centrifugation 3500g, 5 minutes, 4°C
- Traitement d'une fraction du plasma avec 10% d'acide acétique 1N. Conservation de la seconde fraction de plasma sous forme non traitée. Stocker à -80°C

➤ **Prélèvements tissulaires**

- Spécificité liée au prélèvement d'embryons : une boutonnière est réalisé au niveau abdominal et les cornes utérines sont prélevées. Elles renferment des poches amniotiques indépendantes contenant chacune un embryon et son placenta. Les poches sont prélevées et conservées sur glace. Chaque embryon est extrait, séparé de son placenta et décapité. La taille du cerveau des individus E20 ne permet pas une microdissection fine, certains cerveaux sont conservés entier dans du PFA 4% tandis que d'autres sont microdisséqués (cervelet, tronc cérébral, mésencéphale) et conservés dans l'azote liquide.
- Le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne et les hémisphères sont dissociés selon l'axe sagittal. Le demi-cerveau droit est déposé dans du PFA 4%. Le demi-cerveau gauche est microdisséqué (cervelet, tronc cérébral, hypothalamus, striatum, hippocampe et cortex) et congelé dans de l'azote liquide.
- Les organes prélevés en PFA 4% sont fixés dans la solution pendant 24h, rincés 3x5min au PBS1X. Les cerveaux embryonnaires sont déshydratés selon un gradient d'éthanol (3x30min, éthanol 70%, 95%, 100%) et traités 3h au toluène avant d'être inclus en paraffine, coupés à 12µm d'épaisseur au microtome et stockés à température ambiante. Les cerveaux J21 sont traités selon un gradient de sucrose (10%, 20%, 30%) avant d'être congelé à -25°C dans du méthylbutane, coupé à 12µm d'épaisseur au cryostat dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4% et stockés à -80°C.
- Particularité liée à la préparation en bloc de paraffine : L'utilisation des coupes nécessite une étape de déparaffinage (Histo-Clear™ 2x3min, réhydratation progressives durant 3min dans de l'éthanol 100%, 95%, 70%, 50% puis lavage à l'eau 5 min).
- Le corps, éviscéré et écorché, est conservé dans une solution d'éthanol 75%.

Fiche 4

Rats Wistar – Analyses histopathologiques

➤ **Coloration des squelettes**

La coloration est mise au point pour des embryons. Elle nécessite d'être ajustée selon la taille de l'échantillon. L'examen du squelette est préférentiellement réalisé à l'aide de rouge d'alizarine pour la coloration des os et de bleu alcian pour celle du cartilage.

- La peau et les viscères sont éliminés et les squelettes déshydratés 24h à l'éthanol 95%
- La coloration du cartilage au bleu alcian est effectuée pendant 48h à 72h
- Les squelettes sont déshydratés 24h à l'éthanol 95% avant d'être plongés dans une solution de KOH 2% jusqu'à ce que le squelette soit visible (environ 48 heures)
- La coloration de l'os au rouge alizarine est effectuée pendant 24h
- Les squelettes sont traités 1 à 2 semaines dans une solution 20% glycérol/1% KOH renouvelée tous les 7 jours de sorte à éliminer les tissus restants. Ils sont ensuite transférés dans 20% glycérol/20% éthanol pendant 1 semaine, 20% glycérol/50% éthanol pendant 24h puis conservés dans une solution 87% glycérol à 4°C

Les squelettes sont photographiés et la taille des fémurs est mesurée grâce au « Cell analysis software».

➤ **Coloration des coupes cérébrales à la thionine ou au DAPI**

L'acétate de thionine ou violet de Lauth, est utilisé pour la coloration des noyaux.

- Les coupes sont isolées grâce à un stylo hydrophobe DakoPen™ et colorées dans une solution de thionine 1,5mol/L entre 7 et 10 minutes
- Après deux lavages de quelques secondes dans de l'eau distillée les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'alcool (5 min 70%, 95%, 100%), plongées dans une solution d'Histo-Clear™ pendant au moins 3 min et montées sous lamelles

La coloration peut aussi être réalisée au DAPI en incubant 5 min une solution diluée au 1/5000^{ème} dans de l'eau. Les coupes sont alors conservées à l'abri de la lumière.

Les coupes sont observées en lumière blanche au microscope optique (à fluorescence lors de l'utilisation du DAPI) et les mesures sont réalisées sur le logiciel « Cell analysis software »

Fiche 5

Rats Wistar – Analyses histopathologiques bis

➤ **Apostain® : Anticorps monoclonal Apostain F7-26 anti-ADNsb**

- Les échantillons sont incubés 30 min dans du méthanol 80% dilué dans du PBS 1X à température ambiante puis rincées 2 fois 5 min au PBS 1X
- Ils sont ensuite incubés dans une solution de saponine (0,2 g/L dans du PBS 1X) pendant 20 min à température ambiante et rincés 1 fois au PBS à température ambiante
- Une incubation dans le formamide 50% dilué dans de l'eau est réalisée à 56°C, pendant 20 min au bain-marie puis sont rincées 2 fois 5 min dans PBS froid maintenues sur glace
- La solution est remplacée par de la BSA 1% à 37°C pendant 20 min avant d'être éliminée
- 200 µL d'anticorps anti-ADNsb/Apostain® dilués au 1/10^{ème} dans du PBS/BSA 1% sont appliqués sous agitation lente, 30 min à 37°C avant d'être retirés et rincés au PBS 1X
- 200 µL d'anticorps secondaire Anti-IgM, au 1/500^{ème} dans du PBS-BSA 1% sont appliqués sous agitation lente et à l'abri de la lumière, 30 min à température ambiante
- Après 3 lavages de 5 min au PBS sous agitation, les lames sont rincées 2 fois avec une solution de Triton 0,05% puis incubées 5 min avec une solution de DAPI diluée dans de l'eau au 1/5000^{ème} avant d'être rincées 2 fois 5 min au PBS et 1 fois à l'eau
- Après montage les échantillons sont maintenus à l'obscurité et analysés au microscope à fluorescence

➤ **ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit**

- Les membranes cellulaires sont perméabilisées par une incubation de 5 min à -20°C dans un mélange éthanol/acide acétique 2:1 pré-refroidi avant d'être rincée 2 fois 5 min avec du PBS 1X
- Les échantillons sont incubés au moins 10 secondes avec 75µL/5cm² du tampon d'équilibration puis l'enzyme TdTest ajoutée à une concentration de 55µL/5cm² et incubée 1h à 37°C dans une chambre humide
- Le Working Strength Stop/Wash Buffer est ajouté, les échantillons sont agités 15 sec puis incubés 10 min à température ambiante avant d'être rincée 3 fois 1 min au PBS 1X
- L'Anti-Digoxigenin Conjugate est appliquée à raison de 65µL/5cm², est incubée 30 min à température ambiante dans une chambre humide à l'obscurité avant d'être rincée 4 fois 2 min au PBS 1X puis les échantillons sont marqués 5 min avec une solution de DAPI diluée dans de l'eau au 1/5000^{ème} avant d'être rincées 2 fois 5 min au PBS 1X et 1 fois à l'eau
- Après montage les échantillons sont maintenus à l'obscurité et analysés au microscope à fluorescence ou au microscope confocal

Fiche 6

H19-7/IGF-IR – Décongélation et congélation

➤ **Décongélation des lignées**

Les cellules sont décongelées dans une T25 préalablement traitée à la poly-L-lysine.

- Les cryotubes sont rapidement décongelés à l'aide d'un bain-marie à 37°C
- Le contenu est déposé dans 10mL de milieu de culture
- Les cellules sont séparées du milieu contenant le DMSO par centrifugation, 5 min à 200g
- Le surnageant est éliminé et les cellules sont homogénéisées dans 5mL de milieu de culture
- Le volume est déposé dans une flasque T25 (ou boîte de culture de 25 cm² équivalente)
- Le milieu est renouvelé tous les 2 jours

➤ **Congélation des lignées**

Le stockage est effectué par ampoules de $1,5 \cdot 10^6$ à $2 \cdot 10^6$ cellules dans un milieu cryoprotecteur.

- Le tapis cellulaire est rincé au PBS 1X, les cellules sont trypsinées et ressuspendues dans du milieu
- Les cellules sont comptées grâce à une cellule de Thoma : la moyenne des champs correspond à $N \cdot 10^4$ cellules/mL de suspension
- Les cellules sont centrifugées, 5 min à 200g puis le surnageant est éliminé
- La solution cryoprotectrice est préparée sur glace et contient 10% DMSO, 35% SVF, 55% de milieu de culture
- 800µL de milieu cryoprotecteur est ajouté pour $1,5 \cdot 10^6$ ou $2 \cdot 10^6$ cellules, en agitant doucement le tube dans la glace
- 800µL de cellules sont déposées par cryotube
- Ils sont placés 24h à -80°C dans un boîte de congélation dont l'acide isopropylique permet une congélation progression puis sont stockés dans une cuve à azote liquide

Fiche 7

H19-7/IGF-IR – Passages des cellules et récupération des échantillons

➤ **Pré-traitement des supports de culture**

- Chaque surface plastique utilisée pour la culture est préalablement traitée à la poly-L-lysine pour assurer l'adhérence des cellules
- La solution de poly-L-lysine est diluée dans de l'eau stérile à 15µg/mL
- Il faut compter 66µL de solution par cm² à traiter
- La polymérisation s'effectue pendant 2h dans un incubateur à 33°, 5% CO₂/95% air
- Avant utilisation les surfaces traitées sont rincées au PBS 1X stérile

➤ **Passage des lignées cellulaires**

Avant utilisation tous les produits sont amenés à température ambiante.

- Le tapis cellulaire est rincé avec du PBS 1X stérile
- Le tapis est décollé par traitement trypsine, 40µL de trypsine-EDTA 0,05% par cm²
- Après 5 à 10 min à 33°C, 2:1 volumes de milieu de culture est utilisé pour dilué la trypsine et pour décrocher le tapis cellulaire à la pipette
- La suspension est centrifugée 5min à 200g et le surnageant est éliminé
- Les cellules sont homogénéisées dans 2 à 5mL de milieu de culture et comptées sur cellules de Thoma
- Les cellules sont entretenues à raison de 1,5.10⁴ cellules par cm² (5x10⁴ cellules pour une P96, 3x10⁵ pour une P24, 1 à 2x10⁶ pour une T25 et 2 à 4x10⁶ pour une P100/T75).

Fiche 8

H19-7/IGF-IR – Conditions de culture

➤ Mise en prolifération

- Les surfaces plastiques sont préalablement traitées à la poly-L-lysine. La préparation des cellules est réalisée dans des boîtes de Pétri de 100 cm de diamètre pour l'étude des protéines, des plaques 6 puits pour l'étude de l'ADN ou des ARN, des plaques 24 puits pour les immunochimies sur des lamelles en verre ou des plaques 96 puits pour les réactions biochimiques ou les échanges ioniques.
- Les cellules sont acclimatées 24h en prolifération dans un milieu non carencé avant traitement
- La carence est appliquée en prolifération 24h avant la mise en différenciation
- Les cellules sont cultivées à 33°C en atmosphère humide 5% CO₂ / 95% air
- Le milieu de culture est renouvelé tous les deux à trois jours

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Concentration initiale	Concentration finale
H19-7/IGF-IR Carencé	DMEM - B9	DMEM- B9	10X	1X
		H ₂ O		
		Bicarbonate de sodium	7,5%	3,7%

Tableau 9 : Préparation du milieu DMEM carencé en folates

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Concentration initiale	Concentration finale
H19-7/IGF-IR Prolifération	DMEM ± B9	Sérum de veau fœtal	100%	10%
		Pyruvate de sodium	100mM	1mM
		Glucose	45%	0,35%
		L-Glutamine	200mM	2mM
		Pénicilline/ Streptomycine	10000U/10000 mg/mL	50U/50mg/mL
		Puromycine	50mg/mL	2ng/mL
		Généticine G418	100mg/mL	200µg/mL

Tableau 10 : Composition du milieu de culture en condition de prolifération

➤ **Mise en différenciation**

La différenciation permet d'obtenir des neurones matures par leur mise en présence avec un milieu enrichi en facteurs de croissance.

- Le tapis cellulaire est rincé au PBS 1X stérile avant de déposer le milieu de différenciation
- La différenciation est réalisée entre 1h et 13h. A 13h de différenciation les cultures présentent 50% de mort cellulaire, elles ne sont généralement pas traitées au-delà
- Les cellules sont cultivées à 39°C en atmosphère humide 5% CO₂ / 95% air

Lignée cellulaire	Milieu de culture	Complément	Concentration initiale	Concentration finale
H19-7/IGF-IR Différenciation	DMEM ± B9	Sérum de veau fœtal	100%	1%
		Pyruvate de sodium	100mM	250 µM
		L-Glutamine	200mM	1 mM
		Glucose	45%	0,35%
		Pénicilline/ Streptomycine	10000U/10000 mg/mL	50U/50mg/mL
		Puromycine	50mg/mL	1 µg/mL
		Généticine G418	100mg/mL	400µg/mL
		N ₂	100%	1%

Tableau 11 : Composition du milieu de culture en condition de différenciation

➤ **Condition de carence en folates (vitamine B9)**

La carence en folates est réalisée dans les mêmes conditions que le milieu standard. L'ensemble des milieux est normalisé en bicarbonate de sodium, glucose et glutamine de sorte à ne différer que par leur teneur en acide folique (vitamine B9), dont le milieu carencé est complètement dépleté. Les milieux de prolifération et de différenciation ne diffèrent que par leur concentration en sérum, pyruvate, G418 et en facteurs de croissance (supplément N2).

Fiche 9

H19-7/IGF-IR – Viabilité cellulaire

➤ **ATPLite, CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay**

- Les cellules ont étéensemencées à 10^5 cellules par puits sur des plaques blanches 96 puits préalablement traitées avec de la poly-L-lysine
- Une gamme étalon de densités cellulaires décroissantes est établie : 100000, 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781, 390, 195, 97, 0 cellules par puits
- 200µL de réactif ATPLite sont introduits dans chaque puit, la plaque est agitée pendant 2 min à l'abri de la lumière puis maintenue 10 min à température ambiante à l'obscurité
- La bioluminescence est lue sur lecteur de plaques en mode luminescence

➤ **MitoCapture™ Apoptosis detection Kit**

- Les cellules sontensemencées à $3 \cdot 10^5$ cellules par puit sur des plaques 24 puits contenant des lamelles en verre traitées à la poly-L-lysine
- Le tampon d'incubation du kit est préalablement amené à 37°C puis utilisé pour laver deux fois les lamelles
- Le tampon est ensuite mélangé au réactif couplé au fluorochrome au $1/1000^{\text{ème}}$, homogénéisé et maintenu à l'abri de la lumière
- 200µL sont déposés dans chaque puit, incubé 20 min à 37°C puis rincé 2 fois avec le tampon d'incubation
- Après montage les lames sont maintenues à l'abri de la lumière et analysées au microscope optique à fluorescence

Fiche 10

H19-7/IGF-IR – Traitement par siARN

➤ **Mise en culture et carence**

La culture est réalisée dans du milieu de culture dépourvu d'antibiotiques

➤ **Transfection**

Le traitement est optimisé pour la lignée H19-7/IGF-IR difficilement transfectable, il comporte une primo-transfection et un rappel de transfection : la première transfection de siRNA 24h après la mise en prolifération est réalisée à 25nM puis le rappel est effectué 24h plus tard à 10nM de siRNA, de manière concomitante à la mise en carence. Les cellules sont mises en différenciation 24h après le rappel pour une durée de 6h ou 13h.

- 1 à 2 heures avant la primo-infection à 25nM, les cellules sont rincées au PBS 1X et mises en présence de milieu de culture sans antibiotiques
- D'une part, le siARN est dilué dans de l'opti-MEM, homogénéisé et incubé 5min à température ambiante
- D'autre part, la lipofectamine RNAiMax est diluée dans de l'opti-MEM, homogénéisée et incubée 5min à température ambiante
- Les volumes sont ensuite mélangés, homogénéisés et laissés à incuber 20 minutes à température ambiante
- Le mélange lipofectamine/siARN est ajouté au milieu de culture de chaque puit ou plaques contenant les cellules et les supports sont légèrement agités pour mélanger
- Le rappel de transfection à 10nM est réalisé 24h plus tard
- Les cellules sont rincées au PBS 1X et mises en présence de milieu de culture sans antibiotiques standard ou carencé
- La préparation des siRNA à 10nM est identique à la primo-transfection

Réactif	siRNA * primo-infection	Opti-MEM * primo-infection	siRNA* rappel	Opti-MEM* rappel
siRNA	30 µL	220 µL	12 µL	238 µL
Lipofectamine	7 µL	243 µL	4 µL	246 µL

*Les volumes sont divisés par 4 pour les plaques de culture de 24 puits.

Tableau 12 : Préparation des solutions de siRNAs et lipofectamine RNAiMax pour la transfection.

Fiche 11

H19-7/IGF-IR – Récupération des échantillons

➤ **Récupération en solution d'extraction par grattage**

Mode de récupération privilégié pour les études sur les protéines en western blot.

- Le tapis cellulaire est rincé au PBS 1X
- La solution d'extraction est déposée sur le tapis cellulaire, 600µL sont utilisés pour récupérer le contenu d'une P100
- A l'aide d'un grattoir le tapis cellulaire est décollé, la suspension est déposée dans un Eppendorf
- L'extraction des protéines doit être effectuée immédiatement et stocké à -80°C

➤ **Récupération en culot sec par traitement trypsine-EDTA**

Mode de récupération privilégié pour les études sur ADN ou ARN en biologie moléculaire.

- Le tapis cellulaire est rincé au PBS 1X
- Le tapis cellulaire est décollé par traitement trypsine-EDTA
- Après une centrifugation de 5min à 200g, le surnageant est éliminé
- Les cellules sont rincées par homogénéisation dans du PBS 1X
- Après une seconde centrifugation de 5min à 200g, le surnageant est éliminé
- Les extractions sont réalisées immédiatement ou les cellules sont stockées sous forme de culot sec à -80°C

➤ **Fixation par traitement paraformaldéhyde 4%**

Mode de conditionnement utilisé pour les études sur protéine ou ARN en immunochimie et hybridation in situ.

- Le tapis cellulaire est rincé 2 fois successives au PBS 1X
- Le tapis cellulaire est fixé par traitement au PFA 4%, 500µL pendant 10 minutes, la solution est éliminée par la voie d'élimination des déchets toxiques
- Le tapis cellulaire est à nouveau rincé 2 fois successives au PBS 1X, les solutions de lavage sont éliminées par la voie des déchets toxiques
- Le tapis cellulaire est recouvert d'eau pour le préserver de la déshydratation et les boîtes sont conservées à 4°C dans du papier aluminium
- Il est préférable de ne pas stocker les boîtes plus de 7 à 14 jours

Fiche 12

Dosages métaboliques – Extraction des protéines cytosoliques

➤ Extraction protéique compatible avec les analyses métaboliques en HPLC

La préparation se fait en maintenant les échantillons à 4°C

- Les tissus sont broyés à l'aide d'un mortier dans de l'azote liquide et homogénéisés dans un tampon hypotonique PBS 0.1%/2% d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases
- Les cellules sont séparées à l'aide d'une seringue. 3 cycles de congélation/décongélation dans de l'azote liquide et un bain-marie à 37°C sont réalisés avant de finaliser la lyse à l'aide d'un sonicateur à sonde, 1 min en mode pulsé, microtype (*duty cycle 30%*) LIMIT 7, tout en maintenant les échantillons sur glace
- Le dosage de l'homocystéine nécessite une étape supplémentaire de traitement au DTT 50mM de sorte à rompre les liaisons aux protéines
- Les échantillons sont centrifugés 30min à 20000g à 4°C, le surnageant est récupéré et dosé pour définir sa concentration en protéines par la méthode BCA

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

Le dosage BCA est une méthode colorimétrique basée sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin (réduction de l'ion cuivrique Cu(II) en ion cuivreux Cu(I)) et la capacité de l'acide bicinchoninique à former un complexe coloré violet avec les ions cuivreux. Le complexe est hydrosoluble et présente une forte absorbance entre 540 et 590 nm.

- Une gamme étalon (0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600 et 2000 µg/mL) est réalisée en triplicat à partir d'une solution stock de BSA 2mg/mL (dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN₃ à 0,05% (p/v)) diluée dans le même tampon que les échantillons à doser, dans un volume final de 25µL, dans une plaque de 96 puits
- Les échantillons sont déposés en duplicat, dilués au 1/10^{ème} ou 1/20^{ème} dans le même tampon que les échantillons à doser, dans un volume final de 25µL. Deux blancs sont réalisés avec 25µL de diluant seul.
- Le réactif est préparé en mélangeant 50 volumes du réactif A (BCA) avec 1 volume du réactif B (CuSO₄). 200µL sont ajoutés à chaque puit. La plaque est agitée, couverte et placée 30 min à 37°C avant de refroidir à température ambiante
- L'absorbance est mesurée sur un spectrophotomètre à 570 nm. La moyenne des blancs est soustraite aux valeurs pour obtenir les valeurs corrigées. La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons est déterminée à partir de l'équation de droite de la courbe étalon.

Fiche 13

Dosages métaboliques – Vitamines B9 et B12

➤ **Dosage par isotopes radioactifs « SimulTRAC-SNB »**

Au sein d'une même réaction les vitamines B9 et B12 des échantillons entrent en compétition sur un nombre restreint et constant de sites de fixation avec leurs homologues marqués (B12-[⁵⁷Co] et B9-[¹²⁵I]). Le taux de vitamines des échantillons est inversement proportionnel au taux de radioactivité fixée et est déterminé en utilisant un compteur à double canaux.

- Les courbes étalons sont réalisées à partir de duplicats des échantillons dilués dans de la serum-albumine, du chlorure de sodium et des agents stabilisateur de conservation

Folates (Vide, A 0, B 2.3, C 4.5, D 9.1, E 23 et F 45 nM)

Vitamine B12 (Vide, A 0, B 74, C 148, D 296, E 740 et F 1480 pM)

- 200µL d'échantillons sont déposés dans un tube à hémolyse et mélangés à 200µL de solution de marquage/DTT, agités et incubés 15min à température ambiante
- 100µL de réactif d'extraction est ajouté, le mélange est vortexé et est incubé 15min à température ambiante
- 1000µL de réactif de liaison SimulTRAC-SNB est ajouté, le mélange est agité et incubé 60min à l'obscurité, à température ambiante avant d'être centrifugé 10min à 1000g. Le surnageant est éliminé et la radioactivité définie par un compteur gamma
- Les courbes étalons et les courbes des échantillons sont obtenues par comptage de l'Iode¹²⁵ pour la vitamine B9 et par comptage du Cobalt⁵⁷ pour la vitamine B12
- La moyenne des blancs est soustraite à toutes les valeurs pour obtenir leurs valeurs corrigées
- La moyenne des mesures corrigées des tubes vides est réalisée pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage
- La moyenne des mesures corrigées des blancs est divisée par le nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B0 (≤ 36%)
- Les valeurs corrigées de chaque tube sont divisées par la moyenne corrigée des blancs pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube. La courbe étalon est tracée avec la concentration des étalons en abscisse (vitamine B9 en ng/ml et B12 en pg/ml) et le pourcentage de niveau de marquage en ordonnée (B12 ou folates/B0)
- La concentration de la vitamine B12 ou en folates dans la plasma est déterminée par extrapolation à partir de la courbe étalon donnant le pourcentage de niveau de marquage par rapport à la valeur en pg/ml de vitamine B12 ou la valeur en ng/ml de folates.

Fiche 14

Dosages métaboliques - HCY, MMA, acide succinique, méthionine, SAM et SAH

➤ **Dosage des métabolites par LC-MS/MS**

- Les tubes à doser sont préparés : les échantillons acidifiés sont remis à pH avec du NH₃ 1N (μL NH₃/55μL d'échantillons)
 - ¹³C5 SAH : 5μM
 - SAH : 0.5mM
 - HCY/MMA/Ac. Succinique/SAM/Méthionine /D4_HCY 1/D6_Ac. Succinique/D3_SAM/D3_Méthionine : 1mM
 - D3_MMA : 2 mM
 - Chromsystems Levels 1 & 2 (HCY) / Clinchek Levels 1 & 2 (MMA) / Pool acidifié avec de l'acide acétique 1M / SKLM_SAS pur et dilué au 1/100^e / SKLM_AMI dilué au 1/10^e

- Les standards internes sont préparés dans une solution de DDT à 200 mM

Le DDT (154,25 mg qsp 5ml acétate NH₄ 20mM pH 7,4) est préparé en 10 min sous ultrason

- 500 μL sont conservés pour les blancs et les échantillons

Dans les 4,5 ml de DDT à 200mM restant ajouter :

- 150μL D4_HCY 1mM (29.6μM) + 5μL D3_MMA à 2mM (1.97μM) + 150μL D6_Ac succinique 1mM (29.6μM) + 5μL D3_SAM 1mM (988nM) + 100μL ¹³C5 SAH 5μM (98.8nM) + 150μL D3_METHIONINE 1mM (29.6μM)

- Préparation des gammes standard (HCY-MMA-AC SUCCINIQUE-MET-SAM-SAH) :

Les échantillons sont décongelés, vortexés et centrifugés 10min à 3500rpm à 4°C

Dans un tube Eppendorf: Standard S8 qsp 1mL de plasma

- 100μL HCY 1mM / 10μL MMA à 1mM / 100μL Ac. succinique 1mM / 10μL SAM 1mM (1/10 100μM) / 10μL SAH 0.5mM (1/10 50μM) / 100μL MET 1mM
- Faire une dilution de ½ en ½ dans le plasma restant jusqu'au Standard S1
 - HCY-AC SUCC-MET: 0,781-1,56-3,125-6,25-12,5-25,0-50,0-100 μM
 - MMA : 0,0781-0,156-0,312-0,625-1,25-2,5-5,0-10,0 μM
 - SAM : 7,81-15,625-31,25-62,5-125-250-500-1000 nM
 - SAH : 3.91-7,81-15,625-31,25-62,5-125-250-500 nM

- Préparation des échantillons

	Blanc réactif	Blanc échantillon	Standard S0 à S8	Contrôles	Echantillons
Prise essai	50 µL eau	50 µL plasma	50 µL	50 µL	50µL
Standard interne	50 µL DDT	50 µL DDT	50 µL	50 µL	50 µL

Vortexer les tubes et incuber 15min à température ambiante

Méthanol à 0,1% acide formique	100 µL				
--------------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------

Vortexer les tubes et incuber 30min à 4°C puis vortexer et centrifuger 10min à 15000rpm

- Passage sur LC-MS/MS (plaque de 96 puits de 350 µL)
 - Distribuer en A1, 200µL H₂O + 0.2% Acide Formique
 - Distribuer 100µL H₂O + 0.2% Acide Formique dans les autres puits
 - Ajouter 25µL de chaque échantillon dans les puits correspondant (dilution 1/5^e)
 - Souder un film et agiter 5min à 600rpm, centrifuger 2min à 1500rcf et analyser

Phases mobiles :

- A1 : H₂O + 0.2% Acide Formique
- WEAK : H₂O + 0.2% Acide Formique
- B1-STRONG : MeOH + 0.2% Acide Formique
- Soniquer les phases mobiles 10min pour dégazer

Analyse :

- Méthode UPLC Acuity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method
- Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam
à 2 périodes (MRM + pour HCY puis MRM – pour MMA & acide succinique)
- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

Fiche 15

Expression génique – Quantification et test qualité des ADN et ARN

➤ Quantification des molécules

La quantité d'ADN ou ARN présente dans les échantillons est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre à 230, 260 et 280 nm

La pureté des échantillons est déterminée par les ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}

- $1,8 < A_{260} / A_{280} < 2$ doit être obtenu
 - R < 1,8 indique une contamination par des protéines
 - R > 2 indique une dégradation des ARN ou ADN
- Le ratio A_{260}/A_{230} doit être inférieur à 2,1
 - R > 2,1 indique une contamination par des produits organiques

[ADN] : 1 mesure de DO = 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARN (à multiplier par le facteur de dilution)

[ARN] : 1 mesure de DO = 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARN (à multiplier par le facteur de dilution)

➤ Analyse qualitative sur gel d'agarose

- Un gel d'agarose est réalisé à 0,8-1% (p/v) selon la taille des ADN étudiés
L'agarose est dissout dans du TBE 1X (50mL pour 8 échantillons, 80mL pour 15/20 échantillons) en chauffant la solution jusqu'à ébullition puis en laissant refroidir à $\sim 50^{\circ}\text{C}$
Le bromure d'éthidium (BET) est alors ajouté à une concentration finale de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 ou 2 gouttes) et homogénéisé
La solution chaude d'agarose est coulée dans le support de gel où le peigne en téflon est préalablement positionné, et laissée à polymériser pendant 15 min à température ambiante
- Les échantillons sont déposés dans le gel et laissés à migrer
Le peigne et la plaque sont retirés du support puis le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse horizontale remplie avec du tampon TBE 1X
Un volume de 10 μL est déposé par puit (500ng d'échantillon, 2 μL de solution de dépôt qsp 10 μL avec de l'eau Milli-Q, ainsi qu'un marqueur de taille)
La cuve est reliée à un générateur de courant continu et les échantillons sont mis à migrer sous une tension constante de 80V (petit gel) ou 130V (grand gel) pendant 50min (18V/cm)
- Les molécules contenues dans le gel sont visualisées sur une plaque UV (312 nm) par Image Master™ VDS

Fiche 16

Expression génique – Extraction ADN

➤ **QIAamp® DNA Mini extraction kit**

- Préparation des échantillons
20mg de tissus broyés sont mélangés à 180µL de tampon ATL
Les cellules ($> 2.10^6$) ont été conditionnées dans du PBS 1X
20µL de la protéinase K sont ajoutés aux échantillons avant d'être vortexés
Les échantillons tissulaires sont totalement lysés par une étape supplémentaire d'incubation à 56°C 1h à 3h en vortexant 2-3 fois puis brièvement centrifugés
200µL de tampon AL sont ajoutés, les échantillons sont vortexés 15sec et incubés 10min à 70°C pour les tissus ou 56°C pour les cellules puis brièvement centrifugés
- Extraction de l'ADN
200µL d'éthanol (96-100%) sont ajoutés, vortexés 15sec et centrifugé
Le mélange est transféré sur une colonne, déposée dans un tube collecteur de 2mL et centrifugé 1min à 6000g, l'éluat est éliminé
500µL de tampon AW1 sont déposés, centrifugés 1min à 6000g, l'éluat est éliminé
500µL de tampon AW2 sont déposés, centrifugés 3min à 20000g, l'éluat est éliminé
La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur de 2mL, centrifugé 1min à vitesse maximale pour sécher la membrane
La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur de 1,5mL, 200µL du tampon AE ou de l'eau RNase-free sont déposés, incubés 1min à température ambiante et centrifugés 1min à 6000g
La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur de 1,5mL, 200µL du tampon AE ou de l'eau RNase-free sont déposés, incubés 5min à température ambiante et centrifugés 1min à 6000g
- Dosage des ADN dans un spectromètre afin d'obtenir la concentration de chaque échantillon. Si les ADN sont dilués, procéder à une concentration des ADN

➤ **Concentration des ADN**

2,5 volume d'éthanol 100% froid, 1/10 d'acétate de sodium (3M pH 5,2), 1µL de glycogène sont ajoutés aux échantillons puis vortexés et incubés 10min sur carboglace avant d'être centrifugés 10min à 10000rpm. L'ADN doit être culoté au fond du tube

Le liquide est éliminé et les échantillons sont lavés avec 200 à 250µL d'éthanol 70% froid avant d'être centrifugés 10min à 13rpm

Les culots sont séchés et ressuspendus dans le volume d'H₂O adéquat

Fiche 17

Expression génique – Méthylation globale de l'ADN

➤ **Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit**

- Solution du kit

GU1 (10X Wash Buffer) / GU2 (DNA Binding Solution) / GU3 (Methylated DNA Control, 100µg/ml) / GU4 (Block Solution) / GU5 (Capture Antibody, 1mg/ml) / GU6 (Detecting Antibody, 400µg/ml) / GU7 (Enhancer solution) / GU8 (Developing Solution) / GU9 (Stop Solution) / Negative control DNA (50µg/µl)

- Préparation de la gamme et des échantillons
 - Témoin positif & gamme : GM3 est dilué de 0.2 à 10ng/µL avec GM2. La gamme est réalisée avec 28µl de GM2 par puit mélangés à 20µl de chaque dilution de GM3
 - Blanc : ajouter 28µL de GM2 + 2µL de contrôle négatif
 - Echantillons : GM1 est dilué au 1/10^{ème} dans l'eau distillée (pH 7.4) (2mL de GM1 1x par puits), 28µL de GM2 sont déposés par puit, puis 2µl (100 à 200ng) d'ADN

- Quantification de l'ADN

Chaque puit est homogénéisé au dépôt, la solution est étalée au fond des puits et incubés à l'abri de l'humidité 40min à 37°C puis 35 à 40min à 60°C pour évaporation

150µl de GM4 sont ajoutés à chaque puit et incubés 30min à 37°C puis le liquide est aspiré et les puits sont lavés 3 fois avec 150µl de GM1 1X

GM5 est dilué au 1/1000^{ème} avec GM1 1X, 50µl de GM5 dilué sont ajoutés par puits, incubés 1h à température ambiante puis les puits sont lavés 4 fois avec 150µl de GM1 1X

GM6 au 1/5000^{ème} est dilué au 1/10 000^{ème} avec GM1 1X, 50µl de GM6 dilué sont ajoutés par puit, incubés 30min à température ambiante, puis les puits sont lavés 5 fois avec 150µl de GM1 1X

GM7 au 1/5000^{ème} est dilué au 1/10 000^{ème} avec GM1 1X, 50µl de GM7 dilué sont ajoutés par puit, incubés 30min à température ambiante puis les puits sont lavés 5 fois avec 150µl de GM1 1X

100µl de GM8 sont ajoutés par puit, incubés 1-5 min à l'obscurité. Suivre la coloration des puits contenant les échantillons et contrôles pour avoir une coloration bleu moyenne

50µL de GM9 sont ajoutés par puit pour stopper la réaction enzymatique, l'absorbance est lue à 450 nm dans les 2 à 15 min et le pourcentage de méthylation calculé

- Calcul

Pour un calcul simplifié la formule suivante est utilisée, pour 10ng du contrôle positif et 100ng d'échantillon d'ADN

$$\text{Methylation \%} = \frac{(\text{Sample OD} - \text{Negative Control OD}) / X^*}{(\text{Positive Control OD} - \text{Negative Control OD}) \times 10}$$

Pour un calcul plus précis, la pente en DO/ng est déterminée à partir des valeurs de la densité optique DO en fonction de la quantité GM3, la formule suivante est appliquée

$$\text{Methylated DNA (ng)} = \frac{\text{Sample OD} - \text{Negative Control}}{\text{Slope}} \times 100\%$$

$$\text{Methylation \%} = \frac{\text{Methylated DNA Amount} / X^*}{\text{Sample DNA Amount Added}} \times 100\%$$

Avec X, le contenu en GC selon l'espèce (41% dans l'ADN humain, 42% chez les rats et souris, 38% pour les levures)

Fiche 18

Expression génique – Extraction ARN

➤ **RNeasy® Mini Kit Plus**

- Préparation des échantillons cellulaires
La lyse des cellules s'effectue avec 600µL RLT
Le lysat est passé 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9mm sur une seringue RNase-free
Le lysat est transféré sur une colonne à élimination d'ADN génomique placée dans un tube collecteur de 2mL et centrifugé 30sec à plus de 8000g avant de récupérer l'éluat

➤ **RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit**

- Préparation des échantillons tissulaires
100mg de tissu sont broyés, mélangés à 1mL de Qiazol sous hotte, passés dans une aiguille de 0.9mm adaptée à une seringue RNase-free et laissés 5min à température ambiante
200µl de chloroforme sont ajoutés, vortexés et laissés 2-3min à température ambiante avant d'être centrifugé 15min à 12000g, à 4°C (la première phase contient les ARN)
- ✓ Extraction des ARN totaux (procédures communes)
600µl d'éthanol 70% (RNase-free) sont ajoutés et homogénéisés
Le volume est passé par 700µl sur une colonne d'extraction placée dans un tube collecteur de 2mL, centrifugé 15sec à plus de 8000g et l'éluat est jeté
700µL de tampon RW1 sont ajoutés à la colonne, centrifugé 15sec à $\geq 8000g$, et l'éluat jeté
500µL de tampon RPE sont ajoutés à la colonne, centrifugé 15sec à $\geq 8000g$, et l'éluat jeté
500µL de tampon RPE sont à nouveau ajoutés, centrifugé 2min à $\geq 8000g$, et l'éluat jeté
La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur de 2mL et centrifugés 1min à vitesse maximale pour sécher la membrane
La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur de 1,5mL, 30-50µL d'eau RNase-free sont déposés sur la membrane et centrifugés 1min à $\geq 8000g$ pour éluer l'ARN (si le taux d'ARN attendu est $> 30\mu g$, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau dans le même tube collecteur)
- ✓ Dosage des ARN dans un spectromètre afin d'obtenir la concentration de chaque échantillon

Fiche 19

Expression génique – RT² PCR Profiler Array

➤ **Screening par RT² Profiler PCR Arrays – SABiosciences Kit**

- **RT² First Strand Kit®**

L'élimination d'ADN génomique est réalisée par un mix contenant 500ng d'ARN, 2µL de gDNA elimination buffer qsp 10µL avec de l'eau RNase-free, homogénéisé et centrifugé puis soumis à un programme d'incubation de 5min à 42°C suivi d'1min sur glace

10µL de mix de RT sont ajoutés, contenant de 4µL de RT buffer, 1µL de primer et control externe, 2µL d'enzyme de RT et 3µL d'eau RNase-free et homogénéisés

Le programme de RT comporte une phase de 15min à 42°C suivi de 5min à 95°C

Le produit de RT est mélangé à 91µL d'eau RNase-free pour obtenir un volume final de template de 111µL conservés à -20°C

- **RT² Assays primer qPCR**

Le mix est réalisé à partir de 1350µL de 2x RT² SYBR Green Mastermix, 102µL d'ADNc, 1248µL d'eau RNase-free pour un volume total de 2700µL de mix

25µL de mix sont ajoutés dans chaque puit contenant les amorces des gènes puis la plaque est fermée par un film adhésif transparent

La plaque est centrifugée 1min à 1000g pour éliminer les bulles d'air

Le programme de PCR comporte une activation de la polymérase de 10min à 95°C suivi de 40 cycles d'une succession 15sec à 95°C / 60sec à 60°C

L'analyse est réalisée sur le logiciel « SABiosciences PCR Array Data Analysis Template »

Fiche 20

Expression génique – qRT-PCR SYBR Green

➤ **Expression des gènes qRT-PCR SYBR Green**

La rétrotranscription des ARN totaux est réalisée avec le Quantitect® Reverse Transcription Kit de Qiagen.

L'élimination d'ADN génomique est réalisée par un mix content 1µg d'ARN, 2µL de gDNA Wipeout®, qsp 12µL avec de l'eau RNase-free, homogénéisé et centrifugé puis soumis à un programme d'incubation de 9min à 42°C suivi d'1min sur glace

6µL de mix de RT sont ajoutés, contenant de 4µL de Quantiscript RT 5x, 1µL de RT primer mix et 1µL d'enzyme Quantiscript RT, homogénéisés et centrifugés

Deux tubes contrôles sont réalisés :

- Contrôle négatif (RT sans ARN), 14 µL d'H₂O au lieu de 14 µL d'ARN
- Contrôle positif (RT sans enzyme), 1µL H₂O au lieu de 1 µL de Quantiscript RT

Le programme de RT comporte une phase de 15min à 42°C suivi de 3min à 95°C

• **Quantitect™ SYBR® Green PCR**

1µL d'ADNc est déposé dans chaque puit

Le mix est réalisé à partir de 10µL SYBR Green PCR 2X, 1µL de chacune des sondes sens et anti-sens à 10µM, 8µL d'eau RNase-free pour un volume total de 20µL de mix par réaction

Les 20µL sont ajoutés dans chaque puit contenant les amorces des gènes puis la plaque est fermée par un film adhésif transparent

La plaque est centrifugée 1min à 1000g pour éliminer les bulles d'air

Le programme de PCR comporte une activation de la polymérase de 15min à 95°C suivi de 40 cycles d'une succession 10sec à 94°C / 15sec à X°C / 15sec à 72°C (X : température dépendante du couple d'amorce). Une étape d'élongation finale de 7min à 72°C suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5sec permet d'obtenir les melting curves

Selon l'appareil utilisé, l'analyse est réalisée sur le logiciel « RelQuant » (Roche) ou le « Step One Plus Software » (Applied biosystems)

Fiche 21

Expression génique – Extraction des miRNAs

➤ **mirVana™ miRNA Isolation Kit**

- Préparation de l'échantillon
 - Pour tissus :
Peser ou estimer le poids de l'échantillon (0,5-250mg)
La lyse est réalisée avec 10 volumes (1g/10mL) de tampon de lysis/binding solution, homogénéisés au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0.9mm adaptée à une seringue RNase-free jusqu'à l'obtention d'un lysat tissulaire homogène
 - Pour cellules :
Les cellules (10^2 - 10^7 cellules) sont lysées dans 600µL du tampon de lysis/binding solution, homogénéisées au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0.9mm adaptée à une seringue RNase-free jusqu'à l'obtention d'un lysat cellulaire homogène
- Extraction des miARNs
 - 1:10 volume de Homogenate Additive est ajouté, mélangé et laissé 10min sur glace
 - 1:1 volume d'acide phénol-chloroforme est ajouté, vortexé 30 à 60sec et centrifugé 5min à 10000g à température ambiante, la phase aqueuse contient les ARN
 - La phase aqueuse est déposée dans un nouveau tube de collection
 - 1,25 volume d'éthanol 100% sont ajoutés à la phase aqueuse et mélangé doucement
 - Le mélange est déposé par tranche de 700µL sur une colonne, placée dans un tube collecteur, mélangé et centrifugé 15sec à 10000 g, l'éluat est jeté
 - 700µL de Wash solution1 sont déposés sur la colonne et centrifugés 10sec à 10000g, l'éluat est jeté
 - 500µL de Wash solution 2/3 sont déposés sur la colonne et centrifugés 10sec à 10000g, l'éluat est jeté
 - 500µL de Wash solution 2/3 sont à nouveau déposés sur la colonne et centrifugés 10sec à 10000g, l'éluat est jeté
 - La colonne est centrifugée 1min à vitesse maximale pour sécher la membrane
 - La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur de 2mL
 - 100µL d'eau RNase-free sont ajoutés pour éluer les ARN et centrifugés 30sec à 10000g
- Dosage des ARN dans un spectromètre afin d'obtenir la concentration de chaque échantillons

Fiche 22

Expression génique – qRT-PCR TaqMAN

➤ **Expression des gènes qRT-PCR TaqMan**

- **Taqman® MicroRNA Reverse Transcription**

Les ADNc sont préparés à 10ng d'échantillon qsp 5µL d'eau RNase free
7µL de mix de RT sont ajoutés, contenant de 0.15µL de dNTP, 1µL de MultiScribe™
Reverse Transcriptase, 1.5µL de 10x Reverse Transcription buffer, 0.19µL de RNase
inhibitor et 4.16µL d'eau RNase-free, homogénéisés et centrifugés

Deux tubes contrôles sont réalisés :

- Contrôle négatif (RT sans ARN), 5 µL d'H₂O au lieu de 5 µL d'ARN
- Contrôle positif (RT sans enzyme), 1 µL H₂O au lieu de 1 µL de la Reverse Transcriptase

3µL de primers sont ajoutés, homogénéisés, centrifugés et incubés 5min sur glace

Le programme de RT comporte une phase de 30min à 16°C, 30min à 42°C, suivi de 5min à 85°C

- **Taqman® MicroRNA Assay**

1.33µL d'ADNc sont déposés dans chaque puit

Le mix est réalisé à partir de 10µL de Taqman 2x Universal PCR Master Mix, 7,67µL d'eau RNase-free et 1 µL de Taqman MicroRNA Assay (amorces) pour un volume total de 18.67µL de mix par réaction

Les 18.67µL sont ajoutés dans chaque puit contenant l'ADNc des gènes puis la plaque est fermée par un film adhésif transparent

La plaque est centrifugée 1min à 1000g pour éliminer les bulles d'air

Le programme de PCR comporte une activation de la polymérase de 10min à 95°C suivie de 40 cycles d'une succession 15sec à 95°C / 2min à 60°C. Une étape d'élongation finale de 7min à 72°C suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5sec permet d'obtenir les melting curves

L'analyse est réalisée sur le « Step One Plus Software » (Applied biosystems)

Fiche 23

Expression génique – Localisation des miRNAs

➤ **miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)**

- Préparation du mélange d'hybridation

La solution Hybridation Buffer 1X est diluée à 1:1 avec de l'eau RNase free

Les sondes LNA™ sont mélangées au tampon d'hybridation (1nM pour les cellules et 0,5nM pour les tissus) et dénaturées 4min à 90°C

- Protocole d'hybridation in situ

La protéinase K est mélangée à la solution tampon de protéinase K (5µL/10mL pour les tissus, 7µL/10mL pour les cellules), 300µL sont déposés par échantillon, incubés 10min à 37°C et rincés 2 fois 5min au PBS 1X

Les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs de 3min d'alcool 50%, 70%, 95% et 100% et laissés à sécher 15min à température ambiante

25µL du mélange d'hybridation contenant les sondes dirigées contre les séquences de microARN cibles sont déposés, chaque échantillon est recouvert d'une lamelle en verre stérile en évitant la formation de bulles d'air et laissé à incuber 1 heure à 55°C

La lame en verre est retirée et les échantillons sont rincés par des bains successifs de 5min de solution de SSC à 55°C (5X SSC, 1X SSC, 0,2X SSC) et un bain supplémentaire à température ambiante (0,2X SSC) avant d'être rincés au PBS 1X

Les échantillons sont bloqués dans une solution Denhardt 1X, 15min à température ambiante dans une chambre humide, l'anticorps primaire anti-DIG dilué au 1/800^{ème} dans la solution de blocage contenant 2% de BSA est déposé et incubé 1 heure à température ambiante avant d'être rincé 3 fois 3min au PBS-T 1X. L'anticorps secondaire dilué au 1/2000^{ème} est déposé et incubé 1 heure à température ambiante avant d'être rincé 2 fois avec une solution de PBS-T 1X. Le DAPI est dilué au 1/5000^{ème} et incubé 20sec avant d'être rincé 2 fois 5min à l'eau RNase-free

Les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs de 3min d'alcool 50%, 70%, 95%, 100% et laissés à sécher 15min à température ambiante

Après montage, les lames sont conservées à l'obscurité et analysé en microscopie à fluorescence ou confocal.

Fiche 24

Expression protéique – Extraction des protéines cytosoliques

➤ **Extraction des protéines**

- Le tampon RIPA est complété avec 10 μ L/mL de PMSF, 10 μ L/mL d'orthovanadate (Na_3VO_4) et 10 μ L/mL de PIC

- Les échantillons sont préparés
Les cellules sont récupérées par grattage avec 600 μ L de tampon de lyse RIPA
Les tissus sont broyés et 500 μ L de tampon RIPA pour 50mg de tissus sont ajoutés

- Extraction des protéines
Homogénéiser avec une seringue (10 à 20 allers/retours)
Effectuer 3 cycles de congélation/ décongélation (Azote liquide/ bain marie à 37°C)
Centrifuger 30min à 12 000rpm à 4°C
Récupérer le surnageant, doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche 12) et stocker les protéines à -80°C

Fiche 25

Expression protéique – Western Blotting

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

• **Préparation des gels**

Les plaques en verre sont passées à l'alcool et fixées au système de montage

Le gel de séparation est coulé entre les plaques et la surface est recouverte d'isopropanol

Après ~20 min de polymérisation à température ambiante, l'isopropanol est rincé abondamment de la surface du gel avec de l'eau distillée puis séché

Le gel de concentration est coulé « en excès » et le peigne en Téflon[®] est positionné en évitant la formation de bulles

Après ~15 min de polymérisation le peigne est retiré et les puits rincés et séchés

Le réservoir de migration est formé en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes et remplit de tampon de migration

• **Préparation des échantillons**

1:1 volume de tampon de dépôt Laemmli 2X sont ajoutés à 1 volume d'échantillon et chauffé à 100°C pendant 5min, dans un bloc chauffant

Déposer le marqueur de poids moléculaire et les échantillons dans les puits

• **Migration à voltage constant**

La cuve d'électrophorèse est branchée à un générateur de courant continu. La migration débute à 80V le temps que les protéines pénètrent dans le gel de concentration puis se poursuit à 110V (~25mA) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel

➤ **Coloration des protéines au bleu de Coomassie[®] R250**

2g de bleu de Coomassie[®] R250 sont dissous dans 200mL d'eau distillée et agités 5 à 10min. La solution stock à 1% (p/v) est filtrée à 0,45µm et stocké à température ambiante

Pour la coloration d'un gel, 50mL une solution finale à 25% (p/v) est préparée en mélangeant 12,5mL de solution stock à 5mL d'acide acétique et à 25mL de méthanol

Le gel est incubé 15 à 20min sous agitation légère et à température ambiante

La solution de colorant est éliminée et le gel est décoloré avec un mélange méthanol/acide acétique/eau distillée (4:1:5, v/v/v) renouvelé régulièrement

Gel de migration		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6 %	H ₂ O MQ	2,7	5,3	8	10,6	13,3	15,9	21,1	26,5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 %	H ₂ O MQ	2,3	4,6	7	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
	Acrylamide Mix 29:1	1,3	2,7	4	5,3	6,7	8	10,7	13,4
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 %	H ₂ O MQ	2	4	5,9	7,9	9,9	11,9	15,8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1,7	3,3	5	6,7	8,3	10	13,3	16,6
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 %	H ₂ O MQ	1,7	3,3	5	6,6	8,3	9,9	13,2	16,4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 %	H ₂ O MQ	1,2	2,3	3,5	4,6	5,7	6,9	9,2	11,4
	Acrylamide Mix 29:1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25
	Tris 1,5M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5	6,3	7,5	10	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Gel de concentration		1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
	H ₂ O MQ	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
	Acrylamide Mix 29:1	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1	1,3	1,7
	Tris 0,5M pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1	1,25
	SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
	TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Tableau 13 : Composition des gels de concentration et de séparation de polyacrylamide.

➤ **Transfert des protéines sur membrane**

• **Préparation du transfert**

La membrane (PVDF perméabilisée au méthanol ou nitrocellulose) découpée aux dimensions du gel (7x8.5 cm) est immergée, avec des papiers filtre dans du tampon de transfert 15min à 4°C. Le gel est trempé 5min dans le tampon de transfert

- **Electro-transfert semi-sec**

Le système est réalisé en superposant dans cet ordre : papier filtre Whatman®3M/membrane/gel de polyacrylamide/papier filtre Whatman® 3M sur la plateforme du système de transfert. Les bulles d'air sont évacuées à l'aide d'un rouleau et le capot est positionné pour fermer le système. L'appareil est branché à un générateur de courant continu réglé sur à une tension constante de 10V pendant 45 à 60min

- **Electro-transfert liquide**

Le système est réalisé en superposant dans cet ordre : une éponge/papier filtre/membrane/gel de polyacrylamide/papier filtre/éponge sur la face transparente de la cassette de transfert. Les bulles d'air sont évacuées à l'aide d'un rouleau, la cassette est placée dans son socle en mettant la face noire de la cassette contre la face noire du socle et le système est refermé une fois rempli de tampon de transfert. L'appareil est branché sur un générateur de courant continu réglé sur un ampérage constant de 350mA pendant 45min

• **Vérification du transfert**

La membrane est colorée 5min par une solution de rouge Ponceau avant d'être décolorée partiellement à l'eau distillée pour observer les protéines. Le rinçage se poursuit ensuite jusqu'à décoloration complète.

➤ **Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité peroxidase**

• **Blocage et incubation des anticorps**

Les sites aspécifiques sont saturés en incubant la membrane dans du tampon de blocage TBS-T/BSA 5% ou TBS-T/lait 5% pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente. Il est également utilisé pour diluer les anticorps.

La membrane est exposée à l'anticorps primaire dans des sachets scellés 1 nuit à 4°C sous agitation lente puis lavée 4 fois 10min au T-BST, sous agitation rapide

La membrane est exposée à l'anticorps secondaire couplé à la HRP dans des sachets, 1h à température ambiante sous agitation lente et lavée au T-BST sous agitation rapide

• **Révélation des protéines**

L'activité peroxydase est révélée par chimiluminescence. La membrane est recouverte du mélange réactionnel ECL pour 5min et séchée. La révélation des bandes protéiques est réalisée en utilisant un système détecteur Fusion-FX7 et traité avec le logiciel « Image J ».

➤ **Déshybridation des membranes de western blotting (stripping)**

Le tampon de déshybridation est chauffé entre 37 et 50°C dans des bacs en verre sous hotte. Les membranes sont immergées 30min en agitant régulièrement, rincées rapidement à l'eau distillée puis 2 fois 10min sous agitation au TBS-T. Le protocole reprend à partir du blocage.

Fiche 26

Expression protéique – Marquage immunochimique

➤ **Marquage immunologique à fluorescence**

Un stylo hydrophobe DakoPen™ permet d'isoler les coupes lors d'un marquage sur échantillons cérébraux. La solution de BSA utilisée est de 10% pour les tissus et 1% pour les cellules.

- **Perméabilisation des membranes**
Les échantillons sont traités au Triton 0,1%, 2 fois 10min à température ambiante puis lavés dans au PBS 1X, 3 fois 5min à température ambiante sous agitation douce
- **Immuno-marquage à fluorescence**

200µl d'une solution de BSA à 10% pour les tissus ou 1% pour les cellules, dilués dans du PBS 1X sont déposés 1h à température ambiante sur les échantillons afin de bloquer les sites non spécifiques

200µl d'anticorps primaire dilué au 1/200^{ème} dans la solution de blocage sont déposés et laissés 48h pour les tissus ou 24h pour les cellules dans une chambre humide à 4°C

Après 3 fois 5min de lavage au PBS 1X, à température ambiante sous agitation douce, 200µl d'anticorps secondaire dilué 1/1000^{ème} dans la solution de blocage sont déposés et laissés 1h à l'obscurité dans une chambre humide à température ambiante

Après cette étape mettre les lames dans du papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière

Après 3 fois 5min de lavage au PBS 1X, à température ambiante sous agitation douce, 200µl DAPI dilué au 1/5000^{ème} dans de l'eau sont déposés et laissés 5 min à température ambiante, puis lavés au PBS 1X, 3 fois 5min sous agitation douce

Après montage les lames sont conservées à 4°C à l'obscurité et analysées au microscope à fluorescence ou confocal

Fiche 27

Expression protéique – Duolink

➤ Duolink kit

➤ Perméabilisation des membranes et immunochimie

Le traitement Triton 0,1% est appliqué 2 fois 10min à température ambiante et rincé 3 fois 5min avec du PBS 1X

Les sites aspécifiques sont bloqués par incubation 1h à température ambiante dans une solution de BSA 10% pour les tissus ou 1% pour les cellules puis l'anticorps primaire dilué dans le bloquant est incubé une nuit à 4°C sous agitation lente

➤ Sondes PLA et ligation

Les échantillons sont rincés 3 fois 5min au Tampon A puis les deux sondes PLA sont diluées au 1/5^{ème} du diluant pour anticorps et incubées 1h à 37°C dans une chambre humide préchauffée

Les échantillons sont rincés 3 fois 5min avec du Tampon A puis le tampon de ligation est dilué au 1/5^{ème} dans de l'eau ultra. La ligase diluée au 1/40^{ème} dans la solution de ligation est incubée 30min à 37°C dans une chambre humide préchauffée

➤ Amplification

Le réactif est sensible à la lumière, les réactions sont réalisées à l'obscurité

Les échantillons sont rincés 3 fois 5min au Tampon A puis la solution d'amplification est diluée au 1/5^{ème} dans de l'eau ultra pure. La polymérase est diluée au 1/80^{ème} dans la solution d'amplification et incubée 1h40 à 37°C dans une chambre humide préchauffée

➤ Coloration des noyaux

Les échantillons sont rincés 2 fois 10min au tampon B, incubés 5min au DAPI 1/5000^{ème} avant d'être rincé 2 fois 10min au tampon A et 1 fois à l'eau

Après montage les lames sont conservées à l'obscurité et analysées en microscopie à fluorescence ou confocal

Fiche 28

Etude comportementale – Righting reflex

➤ **Procédure**

Le jour du test, la mère allaitante est séparée de sa portée pendant le temps de réalisation du test. Les jeunes individus sont testés un à un. Les individus sont placés délicatement sur le dos en position allongée et maintenus par l'expérimentateur sur une surface plane; idéalement recouverte de feutrine. Sans latence, les individus sont lâchés et laissés libre de leurs mouvements et un chronomètre est déclenché. Le temps nécessaire pour reprendre une position quadrupède (les quatre plantes des pattes en contact avec le support) est mesuré. En général, quelques secondes suffisent, avec en plus une diminution de ce temps en fonction de l'avancée en âge des individus. Ainsi, un temps maximum pour réaliser le test est fixé à 120 secondes. A la fin du test (échec total avec un temps de 120 secondes ou réussite en quelques secondes), chaque individu rejoint la cage maternelle, et la mère y est repositionnée lorsque tous les individus sont passés.

➤ **Analyse**

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le temps nécessaire pour retrouver la position quadrupède est élevé, plus l'acquisition du réflexe de retournement est mauvaise suggérant un trouble des fonctions motrices et de coordination au moment du test (jour post-natal).

Si ce test est réalisé en cinétique sur plusieurs jours, il est possible de mesurer l'amélioration de l'acquisition de ce réflexe par une diminution du temps nécessaire. Ainsi, entre plusieurs groupes expérimentaux, il peut apparaître un retard d'acquisition des uns par rapport aux autres en fonction du niveau de maturation des circuits nerveux mis en jeu.

Les circuits nerveux mis en jeu sont les zones motrices primaires, les noyaux gris centraux et le cervelet. Ce test peut être complété par un test moteur strict (exemple le test de suspension) afin de préciser l'analyse entre les fonctions motrices et de coordination.

Fiche 29

Etude comportementale – Negative geotaxis

➤ Procédure

Le jour du test, la mère allaitante est séparée de sa portée pendant le temps de réalisation du test. Les jeunes individus sont testés un à un. Les individus sont placés délicatement sur leurs quatre pattes en position « tête en bas » et maintenus par l'expérimentateur sur une surface plane inclinée à 20%; idéalement recouverte de feutrine. Sans latence, les individus sont lâchés et laissés libre de leur mouvements et un chronomètre est déclenché. Le temps nécessaire pour reprendre une position « tête en haut » sur le plan incliné (alignement du museau jusqu'au bas du dos) est mesuré. En général, quelques dizaines de secondes suffisent, avec en plus une diminution de ce temps en fonction de l'avancée en âge des individus. Ainsi, un temps maximum pour réaliser le test est fixé à 120 secondes. A la fin du test (échec total avec un temps de 120 secondes ou réussite en quelques secondes), chaque individu rejoint la cage maternelle, et la mère y est repositionnée lorsque tous les individus sont passés.

➤ Analyse

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le temps nécessaire pour retrouver la position « tête en haut » est élevé, plus l'acquisition du réflexe de retournement est mauvaise suggérant un trouble des fonctions motrices et de coordination au moment du test (jour post-natal).

Si ce test est réalisé en cinétique sur plusieurs jours, il est possible de mesurer l'amélioration de l'acquisition de ce réflexe par une diminution du temps nécessaire. Ainsi, entre plusieurs groupes expérimentaux, il peut apparaître un retard d'acquisition des uns par rapport aux autres en fonction du niveau de maturation des circuits nerveux mis en jeu.

Fiche 30

Etude comportementale – Homing

➤ **Procédure**

Les individus sont testés un à un aux jours 5, 7 9, 11 et 14 après la naissance. A l'une des extrémités (base du T), la zone de départ est déterminée alors qu'aux autres extrémités du T (droite et gauche), deux zones d'arrivée ou de « sortie » du labyrinthe sont définies. Dans chacune de ces zones d'arrivée est déposé une quantité équivalente de litière soit fraîche, soit provenant de la cage maternelle d'élevage des jeunes individus testés. La répartition des deux type de litière est aléatoire (droite ou gauche en fonction des passages).

Chaque individu est déposé dans le bras de départ et il est laissé libre de ses mouvements pendant un temps maximum de 5 minutes.

Le labyrinthe est débarrassé de la litière et nettoyé à l'alcool 50-70% entre chaque rat.

Les paramètres enregistrés sont la latence d'entrée dans le compartiment contenant la litière connue (entrée avec les quatre pattes dans le compartiment) et le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans le bras contenant la litière fraîche ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »). Si l'animal n'a pas rejoint le compartiment contenant la litière connue dans le temps imparti, il est retiré après 5 min (maximum de temps attribué).

➤ **Analyse**

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type pour le temps de latence et les erreurs en fonction des groupes expérimentaux. Un pourcentage d'échec peut être calculé avec les individus qui n'ont pas rejoint la litière connue dans le temps imparti. Plus le nombre total d'erreurs et la latence de sortie sont importants, moins les performances mnésiques sont importantes. Si une différence n'apparaît que pour la latence de sortie, il convient d'effectuer un test d'activité locomotrice pour vérifier que les individus ne présentent pas de trouble locomoteur qui serait perturbateur pour l'analyse mnésique de ce test. Les structures cérébrales impliquées sont essentiellement le tractus olfactif, le cortex olfactif et l'hippocampe.

Fiche 31

Etude comportementale – Labyrinthe multi-T

➤ Procédure

Le parcours est caractérisé par un couloir de progression composé par l'enchaînement linéaire de plusieurs labyrinthes en T « empilés » (en général 3 à 5) successivement et décalés les uns par rapport aux autres pour construire le parcours global. A l'une des extrémités, la zone de départ est déterminée alors qu'à l'autre extrémité, la zone d'arrivée ou de « sortie » est définie. Ce parcours définit donc un tracé « idéal » dans lequel les individus ont une utilisation optimale de leurs ressources et des accès en « cul-de-sac » dans lesquels les individus perdent de l'efficacité comportementale. Afin de conserver une motivation optimale homogène chez tous les individus d'une étude, il est nécessaire de délivrer une récompense alimentaire aux animaux dès leur arrivée dans la zone de sortie du labyrinthe, comme une petite quantité (< une noisette par jour) de lait concentré sucré, chocolat ou céréale sucrée en flocon.

Pour la phase d'apprentissage, les animaux passent dans le labyrinthe 1 fois par jour pendant 5 jours consécutifs entre le 21^{ème} et le 25^{ème} jour post-natal. Les individus sont testés un à un.

Au cours du test, chaque individu est déposé dans le bras de départ et il est laissé libre de ses mouvements. Leur motivation est renforcée à chaque essai, en leur permettant de manger un bouchon de nourriture dans la zone d'arrivée du labyrinthe. Les paramètres enregistrés sont le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière ») et la latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée).

Les couloirs du labyrinthe sont nettoyés à l'alcool 70% entre chaque rat.

Par la suite, un test de réutilisation de l'acquisition dit « test de mémoire » peut être réalisé, par un seul passage dans le même dispositif, chaque mois (30 jours entre chaque essai, durée qui peut varier selon l'expérimentateur).

➤ Analyse

Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le nombre total d'erreurs et la latence de sortie sont importants, moins les performances mnésiques sont importantes. Si une différence n'apparaît que pour la latence de sortie, il convient d'effectuer un test d'activité locomotrice pour vérifier que les individus ne présentent pas de trouble locomoteur qui serait perturbateur pour l'analyse mnésique de ce test.

Annexe 1 - Anticorps

Protéines	Anticorps	Western	Immuno	Fournisseur
Stat3	Rb (M)	1/1000	1/200	Cell signaling
Stat3 phospho-Tyr705	Ms (M)	1/1000	1/100	Cell signaling
Stat3 phospho-Ser727	Ms (M)	1/250	1/100	Enzo life sciences
Src	Rb (P)	1/500	–	Cell signaling
Src Family phospho-Tyr416	Rb (M)	1/1000	–	Cell signaling
p44/42 MAP kinase (Erk1/2)	Rb (P)	1/500	–	Cell signaling
p44/42 MAP kinase (Erk1/2phospho-Thr202/Tyr204)	Rb (P)	1/500	–	Cell signaling
Akt	Rb (P)	1/1000	–	Cell signaling
Akt phospho-Ser473	Rb (M)	1/1000	–	Cell signaling
p38 MAP kinase phospho- Thr180/Tyr182	Rb (M)	1/500	–	Cell signaling
SAPK/JNK Phospho- Thr183/Tyr185	Rb (M)	1/500	–	Cell signaling
Bcl-2	Gt (P)	1/1000	–	Santa Cruz
Bcl-xL	Rb (P)	1/1000	–	Cell signaling
Bax	Rb (P)	1/1000	–	Santa Cruz
cleaved caspase-3, Asp175	Rb (P)	1/1000	–	Cell signaling
cleaved caspase-9, Asp353	Rb (P)	1/1000	–	Cell signaling
Trim71	Gt (P)	1/1000	1/200	LSBio
Dll1	Shp (P)	1/1000	1/200	US Biological
Notch1	Rb (M)	1/1000	1/200	Cell signaling
Hes1	Rb (M)	1/1000	1/200	Cell signaling
Mash1	Rb (P)	1/1000	1/200	Abcam
GluR1	Rb (P)	1/1000	1/200	Abcam
GluR1 phospho-Ser845	Rb (P)	1/1000	–	Phosphosolution
GluR2	Rb (M)	1/1000	1/200	Abcam
GluR2 phospho-Tyr876	Rb (P)	1/1000	–	Thermo fisher
NMDAR1	Rb (M)	1/1000	1/200	Cell signaling
NMDAR2A	Rb (P)	1/1000	1/200	Abcam
NMDAR2 phospho-Tyr1325	Rb (P)	1/1000	–	Abcam
PKA	Rb (P)	1/1000	–	Millipore
CREB	Rb (M)	1/1000	1/200	Cell signaling
CREB phospho-Ser133	Rb (M)	1/1000	–	Cell signaling
PSD95	Ms (M)	–	1/200	Abcam
NF68	Rb (P)	–	1/300	US Biological
Actine	Gt (P)	–	1/200	Santa Cruz
GAPDH	Chk (M)	1/1000	–	Millipore
Anti-IgG conjugué à la HRP	Adapté	1/2000	–	Santa Cruz
Anti-IgG conjugué à l'AlexaFluor	Adapté	–	1/1000	Abcam

Rb : Rabbit, MS : Mouse, Gt : Goat, Shp : Sheep, Chk : Chicken; M: monoclonal, P: polyclonal.

Annexe 2 - Composition des solutions

➤ **Supplémentation en vitamine B9**

Solution d'acide folique 20mL

200mg de B9 + 10mL de NaOH 1N + 5mL de HCl 2N + 1mL de phosphate de sodium
pH 7.2 – 500mM (NaH₂PO₄ tamponé au NaOH) + 4mL de H₂O

NaOH 1N 15mL

600mg NaOH ou 2g de solution à 30% soit 1.5mL de solution à 30%/15mL

HCl 2N 10mL

729mg HCl ou 1.97g de solution à 37% soit 1.67mL de solution à 37%/10mL

NaH₂PO₄ 2mL

119.8mg/2mL

➤ **Histopathologie**

Paraformaldéhyde (PFA) 4%

20g PFA + 450ml d'eau distillée qsp 50ml de PBS 10X

Thionine (1,5mol/L)

150mg de thionine + 992mg d'acétate de potassium.3H₂O + 575µl d'acide acétique
glaciale qsp 100ml avec de l'eau distillée

Méthanol 80% 100mL

80mL méthanol 100% qsp 100mL au PBS 1X

Saponine 100mL

0,2g qps 1L au PBS 1X

➤ **Coloration des squelettes**

Ethanol 95% 100mL

95mL éthanol 100% + 5mL eau distillée

Bleu Alcian100mL

100mg bleu Alcian + 80mL éthanol 95% + 20mL acide acétique

KOH 2% 200mL

4g KOH / 200mL eau distillée

Rouge Alizarine100 mL

7,5mg rouge Alizarine / 100mL KOH 1%

20% glycérol-1% KOH 200mL

40mL glycerol + 1mL KOH 2% qsp 200mL

20% glycérol-20% ethanol 100mL

20mL glycerol + 20mL éthanol 100% qsp 100mL

20% glycérol-50% ethanol 100mL

20mL glycerol + 50mL éthanol 100% qsp 100mL

Glycérol 87% 100mL

87mL glycérol 99,9% + 13mL eau distillée

➤ **Contrôle qualité ADN / ARN**

TBE 10X :

Tris 890mM + acide borique 980mM + EDTA 20mM, pH = 8.2 – 8.3 (ajuster à l'acide acétique glaciale si besoin)

Solution de dépôt :

Bleu de bromophénol 0.05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0.1mM (pH = 8.0) et SDS 0.5% (p/v)

➤ **Hybridation In Situ**

Protéinase K Buffer 1L

5mL de Tris HCl 1M (1,21g/10mL) + 2mL d'EDTA 0,5M (1,46g/10mL) + 0,5mL de NaCl 5M (0,58g/2mL) qsp 1L d'eau

20X SSC 1L

175g NaCl + 88,2g Citrate de Sodium qsp 1L d'eau

Denhardt 50X (blocage) 100mL - Utilisation 10X ou 5X

1% 400 Ficoll (1g) + 1% Polyvinylpyrrolidone (1g) + 1% BSA (1g)/100 L d'eau

➤ **Extraction protéique**

RIPA 1L

8g NaCl + 1,44g Na₂HPO₄ + 0,24g KH₂PO₄ + NP40 1% + DOC 0,5% + SDS 0,1% qsp 1L de PBS 1X

Na₃VO₄ (100mM)

18.39mg/mL d'H₂O, ajusté à pH = 9 (faire bouillir jusqu'à ce que la solution soit incolore et laisser refroidir)

PMSF

10mg/mL d'éthanol

➤ **Western Blot**

Tris-HCl 1.5M pH = 8.8

18.165g Tris/100mL d'H₂O MQ, ajuster à pH = 8.8 avec HCl, filtrer sur 0.22 µm, 4°

Tris-HCl 0.5M pH = 6.8

6.055g Tris/100mL H₂O MQ, ajuster à pH = 6.8 avec HCl, filtrer sur 0.22 µm, 4°

SDS 10%

10g SDS/100mL H₂O MQ, sous agitation douce pour éviter la mousse, T° ambiante

Persulfate d'ammonium 10%

1g/10mL H₂O, aliquoter par 400µL, -20°C

Tampon de dépôt de Laemmli 2X

Tris 125mM : 0.151g/10mL H₂O + SDS 4% (p/v) + 2-mercaptoéthanol 10% (v/v) + bleu de bromophénol 0.004% (p/v)

Tampon de migration 10X (utilisation 1X : 100mL 10X qsp 1L H₂O MQ)

30g Tris + 144g Glycine + 10g SDS qsp 1L H₂O MQ

pH = 8.3, ne pas ajuster avec HCl, conserver à 4°C

Bleu de Coomassie

2g de bleu de Coomassie/200mL d'eau distillée

Tampon de transfert 10X (utilisation 1X : 100mL 10X + 200 mL éthanol qsp 1L H₂O MQ)

48.1g Tris + 29.3g Glycine + 3.75g SDS 13mM qsp 1L H₂O MQ

pH = 9.2, ne pas ajuster avec HCl, 4°C, utiliser froid

Rouge Ponceau S

Rouge Ponceau 0,5% (p/v) + acide acétique à 1% (v/v), filtrer

Tampon TBS 10X (utilisation TBS-T 1X : 100mL 10X 1L H₂O MQ + 1mL Tween-20)

24.2g Tris 200mM + 87.5g NaCl 1.5M qsp 1L H₂O MQ

pH = 7.4 avec HCl, 4°C

Tampon de déshybridation pour 1L

7ml 100mM 2-mercaptoethanol + 20g SDS + 7,57g Tris HCl pH = 6,7 qsp 1L d'eau milliQ

Lait ou BSA 5%

5g/100mL PBS 1X

➤ **Immunochimie**

PBS(-T) 10X (utilisation PBS(-T) 1X : 100mL 10X 1L H₂O MQ (+ 1mL Tween-20))

12,1g Na₂HPO₄ + 2g KH₂PO₄ + 80g NaCl + 2g KCl qsp 1L d'eau distillée, pH = 7,4

Triton 0,1%

1ml de Triton/1L de PBS 1X

BSA 10% 100mL

10g de BSA/100ml de PBS 1X

Tampon A duolink 1L

8.8g NaCl + 1.2g Tris base + 0.5mL Tween 20 qsp 1L d'eau milliQ

pH = 7.4 par ajout d'HCl, filtration à 0,22µm, stocker à 4°C

Tampon de lavage B 500ml

5,84g NaCl + 4,24g Tris base + 26g Tris HCl qsp 500mL d'eau MQ

pH = 7,5 par ajout d'HCl, filtration à 0,22µm, stocker à 4°C

VALORISATION SCIENTIFIQUE

I. PUBLICATIONS

- ❖ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié*, Jean-Luc Daval*
« Late maternal folate supplementation recues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring let-7 and miR-34 pathways »
Cell Death & Diff, soumis aout, 2015

- ❖ Grégory Pourié, Nicolas Martin*, Carine Bossenmeyer-Pourié*, Nassila Akchiche, Rosa Maria Guéant-Rodriguez, Andréa Geoffroy, Elise Jeannesson, Sarah El Hajj Chehadeh, Khalid Mimoun, Patrick Brachet, Violette Koziel, Jean-Marc Alberto, Déborah Helle, Renée Debard, Brigitte Leininger, Jean-Luc Daval, Jean-Louis Guéant
« Folate and vitamin B12 deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor alpha »
FASEB J, 27 Mai 2015

- ❖ Racha Kerek[#], Andréa Geoffroy[#], Anaïs Bison, Nicolas Martin, Nassila Akchiche, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié*, Jean-Luc Daval*
« Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124 »
Cell Death & Disease, 8 Août 2013

*[#] : Contribution égale des auteurs

II. COMMUNICATIONS ORALES

- ✓ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
« Late maternal folate supplementation recues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring let-7 and miR-34 pathways »
10th International conference “One carbon metabolism, vitamins B and homocysteine”, 9 juillet 2015, Nancy, France

- ✓ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
« Conséquences d’une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement du cerveau chez le rat: Implication des régulations épigénétiques et épigénomiques »
Journée de l’Ecole Doctorale 2015, 25 Mars 2015, Nancy, France

- ✓ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
«Conséquences d’une carence précoce en donneurs de méthyles et effets d’une supplémentation tardive en folates sur le développement du cerveau embryonnaire chez le rat»
Journée de la Fédération de Recherche CNRS-UL 3209 « Ingénierie Cellulaire & Thérapeutique », 11septembre 2014, Nancy, France

- ✓ Racha Kerek*, Andréa Geoffroy*, Anaïs Bison, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
« Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124 »
Journée de rentrée de l’Ecole Doctorale BioSE, 6 novembre 2013, Nancy, France

- ✓ Racha Kerek*, Andréa Geoffroy*, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
« Conséquences d’une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement du cerveau embryonnaire chez le rat : Implication des voies miR-124 et Stat3 »
Journée de la Fédération de Recherche 3209 « Epigénétique, épigénomique et génomique intégrative », 07 juin 2013, Nancy, France

III. COMMUNICATIONS AFFICHEES

- ✓ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval, Carine Bossenmeyer-Pourié
« Late maternal folate supplementation rescues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring microRNA pathways »
12ème Colloque de la Société des Neurosciences, 21 mai 2015, Montpellier, France

- ✓ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Grégory Pourié, Déborah Helle, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval, Carine Bossenmeyer-Pourié
« Late maternal folate supplementation rescues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring microRNA pathways »
BNA 2015, Festival of Neuroscience, 12-15 avril 2015, Edinburgh, Ireland

- ✓ Andréa Geoffroy, Racha Kerek, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Luc Daval
« Conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement du cerveau embryonnaire chez le rat : Implication des voies miR-124 et Stat3 »
IXème journée Claude Huriet de la recherche médicale, Nancy, 21 mars 2014

IV. TRAVAUX PRESENTES EN COMMUNICATIONS PAR UN TIERS

- Racha Kerek, Carine Bossenmeyer-Pourié, Andréa Geoffroy, Anaïs Bison, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval
« Early methyl donor deficiency associated with alteration of the miR-124 and Stat3 signaling pathways impairs normal embryonic brain development »
11e Colloque de la Société des Neurosciences, 21-23 mai 2013, Lyon, France

- Racha Kerek, Carine Bossenmeyer-Pourié, Andréa Geoffroy, Anaïs Bison, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval
« Early methyl donor deficiency associated with alteration of the Stat3 signaling pathways impairs normal embryonic brain development »
Vitamin B12 symposium, 20-22 Septembre 2012, Nancy, France

RESUME

Les folates et la vitamine B12 sont essentiels au bon déroulement du développement cérébral. Ils agissent comme donneurs de méthyles dans le cycle des monocarbone où ils influencent les mécanismes épigénétiques. Les carences en folate et vitamine B12 sont fréquentes chez la femme enceinte et constituent un facteur de risque pour diverses pathologies neurologiques et les défauts développementaux ; ainsi de nombreux pays recommandent une supplémentation périconceptionnelle en acide folique. Une carence gestationnelle chez le rat est associée à un retard de croissance, à un défaut de sutures cérébrales, et à une atrophie de couches cérébrales qui s'accompagnent de troubles à long terme. *Let-7a*, *miR-34a* et *miR-124a* sont des microRNAs régulés par méthylation qui participent au développement cérébral. Leur expression est augmentée en condition de carence. L'expression de leurs cibles, respectivement *Trim71*, *Dll1/Notch* et *Stat3*, est réduite dans le cerveau d'embryons carencés, de même que l'expression et l'activité des récepteurs au glutamate *AMPA1/2* et *NMDAR1/2*, acteurs de la plasticité synaptique, à 21 jours post-natals. Une supplémentation périnatale en folate (3 mg/kg/j) normalise l'expression des microARN et de leurs cibles, et réduit les défauts structuraux et fonctionnels. Leur répression par siRNA améliore le phénotype de progéniteurs hippocampiques déplétés en B9, et stimule la croissance neuritique. Ces résultats soulignent le rôle potentiel de *let-7a*, *miR-34a*, *miR-124a* et de leurs voies de signalisation dans les anomalies développementales associées à une carence, et montre l'intérêt d'une supplémentation périnatale en folate chez les femmes à risque.

Mots-clés: Folates, développement, cerveau, différenciation, plasticité, microARN

SUMMARY

Folate and vitamin B12 are essential for proper cerebral development. They act as methyl donors in the one-carbon metabolism and influence epigenetic mechanisms. Low dietary intakes of folate and vitamin B12 are frequent in pregnant women, and deficiency constitutes a risk factor for various neurological and developmental disorders. In several countries, public health policies recommend periconceptional supplementation with folic acid. Gestational deficiency in rats was associated with growth retardation, brain suture defects and atrophy of cerebral layers with long-term brain disabilities. The microRNA *let-7a*, *miR-34a* and *miR-124a* are regulated by methylation and required for brain development. Their expression was augmented in deficiency condition. Protein levels of their targets *Trim 71*, *Dll1/Notch* and *Stat3*, respectively, were decreased in the brains of deprived fetuses, as well as glutamate receptors *AMPA1/2* and *NMDAR1/2* in 21d-old rats. Perinatal folate supplementation (3 mg/kg/d) restored the levels of microRNA and their downstream targets, with reduction of structural and functional defects. Silencing by siRNA improved the phenotype of deprived cells, and neurite outgrowth. The data outline the potential role of *let-7a*, *miR-34a*, *miR-124a* and their signaling pathways in developmental defects related to methyl donor deficiency, and support the likely usefulness of perinatal folate supplementation in at risk women.

Key words: Folate, development, brain, differentiation, plasticity, microRNA