



Carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet : mécanismes moléculaires et épigénétiques

Jérèmy Willekens

► To cite this version:

Jérèmy Willekens. Carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet : mécanismes moléculaires et épigénétiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0303 . tel-01823903

HAL Id: tel-01823903

<https://theses.hal.science/tel-01823903>

Submitted on 26 Jun 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 **Jérèmy WILLEKENS**

**Carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet :
mécanismes moléculaires et épigénétiques**

Le 18 décembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mme. Antoinette LEMOINE

PU-PH, INSERM UMR-S 1193, Paris

M. Bertrand LIAGRE

PR, UPRES EA 1069, Limoges

Examineurs :

M. Stéphane LABIALLE

MCF, CNRS UMR 7365, Vandœuvre-lès-Nancy

M. Hervé MOINE

DR, I.G.B.M.C, Illkirch

Mme. Brigitte LEININGER-MULLER
Directeur de thèse

PR, INSERM UMR-S 954, Vandœuvre-lès-Nancy

Mme. Natacha DREUMONT
Co-directeur de thèse

MCF, INSERM UMR-S 954, Vandœuvre-lès-Nancy

**UMR 954 INSERM – «Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux»
9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine - 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy**

Tables des matières, figures et tableaux

Tables des matières :

Tables des matières, figures et tableaux.....	1
Liste des abréviations	11
Introduction.....	27
I. Les donneurs de groupements méthyles	29
A. Les folates ou vitamine B9	29
B. La vitamine B12, ou cobalamine	31
C. L'homocystéine.....	35
D. Perturbations du métabolisme des monocarbones	36
II. Le cervelet	41
A. Structure anatomique du cervelet.....	41
B. Développement du cervelet.....	43
C. Effets délétères de la carence précoce en donneurs de méthyles sur le cervelet	45
III. Les voies de signalisation dépendantes des ligands wnt.....	50
A. Description des voies de signalisations wnt	50
B. Les ligands wnt.....	57
C. Voies wnt et système nerveux central.....	59
D. Voies wnt et donneurs de méthyles	62
IV. Les régulations épigénétiques	63
A. La méthylation de l'ADN.....	63
B. Les modifications des protéines histones.....	71
C. Les ARNs non-codants	79
V. Objectifs de travail	94

Matériels et méthodes	97
I. Animaux	99
II. Récupération des tissus	99
III. Dosage radio-immunologique des vitamines B9 et B12 plasmatiques	100
IV. Dosages de l'homocystéine plasmatique	100
V. Détermination de la concentration en calcium libre intratissulaire	101
VI. Etude des protéines	101
A. Extraction protéique	101
B. Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique	103
C. Analyse par western Blot	103
D. Déshybridation douce de la membrane	107
E. Immunohistofluorescence	107
VII. Etude des ARNs	109
A. Extraction d'ARNs totaux	109
B. Etude des ARNm	110
C. Etude des miARNs	112
VIII. Modèles cellulaires	114
A. Entretien des lignées cellulaires	114
B. Surexpression de miR-344	114
IX. Analyses statistiques	116
Résultats 1^{ère} partie	119
I. Analyse du transcriptome et résultats associés	121
A. Publication	121
B. Résultats complémentaires à l'analyse transcriptomique	177
C. Autres gènes étudiés par RT-qPCR	183

II.	Conclusions et discussion.....	187
Résultats 2^{ème} partie		193
I.	Résultats	195
A.	Généralités	195
B.	Modification des marques histones en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles à J ₂₁	196
C.	Impacts de la carence précoce en donneurs de méthyles sur l'expression des miARNs dans le cervelet à J ₂₁	202
D.	Etude des cibles et des fonctions cellulaires de miR-344.....	205
II.	Conclusion et discussion	219
Perspectives.....		225
Références bibliographiques		233
Liste des publications et des communications.....		253
Annexes		259

Liste des figures :

Figure 1 : Structure des folates.	30
Figure 2 : Métabolisme des monocarbones et cycle de l'homocystéine/méthionine.	32
Figure 3 : Transport et absorption de la vitamine B12.	34
Figure 4 : Le modèle <i>Methyl Donor Deficiency</i> (MDD) de carence précoce en donneurs de méthyles.	39
Figure 5 : Vue d'ensemble des différents types cellulaires présents dans le cervelet.	42
Figure 6 : Principales étapes de la neurostéroïdogénèse.	47
Figure 7 : Les voies de signalisation wnt.	52
Figure 8 : Interaction de la β -caténine avec ses partenaires.	53
Figure 9 : Régulation du cytosquelette de microtubules synaptiques.	55
Figure 10 : Modifications post-traductionnelles des ligands wnt.	58
Figure 11 : La voie wnt canonique régule les composants présynaptiques dans le système nerveux central.	60
Figure 12 : Méthylation des cytosines par les DNMTs sur l'ADN génomique.	64
Figure 13 : Structure des ADN méthyltransférases retrouvées chez les mammifères.	67
Figure 14 : La méthylation de l'ADN	69
Figure 15 : Représentation d'un nucléosome.	72
Figure 16 : Structure de la chromatine.	74
Figure 17 : Résumé des modifications post-traductionnelles de H ₃	75
Figure 18 : Méthylation des résidus lysines et arginines au sein des histones.	77
Figure 19 : Augmentation du nombre de publications par année sur les ARNs non-codants au cours des années 2010.	81
Figure 20 : Fonctions et mécanismes d'actions des longs ARNs non-codants.	82
Figure 21: Structure secondaire d'un miARN.	86
Figure 22 : Voies de biogenèse et fonctions des miARNs.	87
Figure 23 : Structure de Dicer et modèle de coupure double-brin.	88
Figure 24 : Expression de NeuroL dans le cervelet des femelles à J ₂₁	178
Figure 25 : Expression de Ccd1 dans le cervelet à J ₂₁	179

Figure 26 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur la voie wnt canonique dans le cervelet mâle à J ₂₁	181
Figure 27 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur l'expression de P300 dans le cervelet mâle à J ₂₁	182
Figure 28 : Expression de 12 gènes d'intérêt en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet à J ₂₁	184
Figure 29 : Expression de 8 gènes d'intérêt impliqués dans la structure de la chromatine en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet à J ₂₁	198
Figure 30 : Effets de la carence précoce en donneurs de méthyles sur la méthylation des histones dans le cervelet des femelles à J ₂₁	201
Figure 31 : Effets de la carence précoce en donneurs de méthyles sur l'acétylation des histones dans le cervelet des femelles à J ₂₁	203
Figure 32 : Effets de la carence précoce en donneurs de méthyles sur la phosphorylation de l'histone H ₃ (H ₃ S ₁₀ P) dans le cervelet des femelles à J ₂₁	204
Figure 33 : Résultats de l'analyse du miRnome du cervelet en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles à J ₂₁	206
Figure 34 : miARNs différentiellement exprimés dans le cervelet des mâles et des femelles en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles à J ₂₁	207
Figure 35 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur l'expression de miR-344 dans le cerveau à J ₂₁	209
Figure 36 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur l'expression du récepteur à l'IGF-1 dans le cervelet à J ₂₁	210
Figure 37 : Hypothèse de régulation de la voie wnt canonique par miR-344.	212
Figure 38 : Effet de la surexpression de miR-344 sur l'expression des protéines impliquées dans la voie wnt canonique.	215
Figure 39 : Observations microscopiques de l'effet de la surexpression de miR-344 pendant 48 h dans des PC-12.	216
Figure 40 : Observations microscopiques de l'effet de la surexpression de miR-344 pendant 72 h dans des PC-12.	216
Figure 41 : Effets de la surexpression de miR-344 sur l'apoptose.	218

Liste des tableaux :

Tableau I : Références et conditions d'utilisation des anticorps en western blot et immunofluorescence	105
Tableau II : Références et conditions d'utilisation des anticorps anti-histones utilisés en western blot.....	106
Tableau III : Amorces de qPCR utilisées pour mesurer l'expression de 29 gènes d'intérêt	111
Tableau IV : Amorces utilisées pour mesurer l'expression des petits ARNs non-codants d'intérêt	113
Tableau V : Réactifs et contrôles utilisés pour la surexpression de miR-344 dans la lignée PC-12.....	115

Liste des abréviations

-0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9-

[17β-HSD](#) : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase

[3'UTR](#) : Région 3' non traduite

[3β-HSD](#) : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase

[5,10-MTHF](#) : 5,10-méthylène tétrahydrofolate

[5-Me-THF](#) : 5-méthyltétrahydrofolate

-A-

[ADN](#) : Acide désoxyribonucléique

[ADNc](#) : Acide désoxyribonucléique complémentaire

[AFSSAPS](#) : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

[AMPA](#) : Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

[APC](#) : *Adenomatous polyposis coli*

[ARID4B](#) : AT-rich interaction domain 4B

[ARN](#) : Acide ribonucléique

[ARNm](#) : Acide ribonucléique messager

[ATF1](#) : Activating transcription factor 1

[ATP](#) : Adénosine triphosphate

[ATXN7](#) : Ataxine 7

[AXIN2](#) : Axine 2

-B-

[BDNF](#) : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

[BCA](#) : Acide bicinchoninique

[β-TrCP](#) : Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase

[BHMT](#) : Bétaïne homocystéine transférase

[BMP](#) : Bone morphogenic factor

[BRCC3](#) : Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36

[BSA](#) : Albumine bovine sérique

-C

[CA1](#) : *Cornu ammonis* 1

[CADPS2](#) : Ca²⁺-dependent secretion activator 2

[CamKII](#) : Calmoduline kinase II

[Cbl](#) : Cobalamine

[CBS](#) : Cystathionine-β-synthase

[Ccd1](#) : Coiled-coil protein dix1

[CD](#) : *Cluster* de différenciation

[CDC](#) : Centers for Disease Control and Prevention

[CFD](#) : Déficit cérébral en folates

[CGI\(s\)](#) : Ilot(s) CpG

[ChIP](#) : Immunoprécipitation de chromatine

[CpA](#) : Dinucléotide cytosine - adénine

[CpG \(ou CG\)](#) : Dinucléotide cytosine - guanine

[CpT](#) : Dinucléotide cytosine - thymine

[CREB](#) : cAMP response element-binding protein

[Ct](#) : Cycle treshold

[C-ter](#) : Extrémité C-terminale

[Ctnnb1](#) : β -caténine

[CYP](#) : Cytochrome P450 family

[CyL](#) : Cystathionine- γ -lyase

-D-

[DAG](#) : Diacylglycérol

[DAPI](#) : 4,6-diamidino-2-phénylindole

[DEmiR](#) : Micro acide ribonucléique différentiellement exprimé

[DGCR8](#) : DiGeorge syndrome critical region 8

[DHEA](#) : Déhydroépiandrostérone

[DHF](#) : Dihydrofolate

[DHFR](#) : Dihydrofolate réductase

[DMEM](#) : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco

[DNase](#) : Désoxyribonucléase

[DNMT](#) : Acide ribonucléique méthyltransférase

[DO](#) : Densité optique

[dsRBD](#) : Domaine de liaison à l'acide ribonucléique double brin

[dTMP](#) : Désoxythymidine monophosphate

[DTT](#) : Dithiothréitol

[dUMP](#) : Désoxyuridine monophosphate

[Dvl1](#) : Dishevelled 1

-E-

[E](#) : Jour embryonnaire

[EDTA](#) : Ethylène diamine tétra-acétique

[EGL](#) : Couche granulaire externe

[EGR1](#) : Early growth response protein 1

[EHMT1](#) : Euchromatic histone lysine methyltransferase 1

[ER \$\alpha\$](#) : Estrogen receptor alpha

-F-

[FDR](#) : False discovery rate

[FGF](#) : Fibroblast growth factor

[FI](#) : Facteur intrinsèque

[FXS](#) : Syndrome de l'X fragile

[Fzd](#) : Frizzled

-G-

[GAPDH](#) : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

[GC](#) : Couche granulaire

[GMP](#) : Guanosine monophosphate

[GO](#) : Gene ontology

[GSK-3 \$\beta\$](#) : Glycogène synthase kinase 3 β

[GTP](#) : Guanosine triphosphate

-H-

[HAT](#) : Histone acétyl-transférase

[Hcy](#) : Homocystéine

[HDAC](#) : Histone déacétylase

[HDM](#) : Histone déméthylase

[HKMT](#) : Lysine méthyltransférase

[HMG](#) : High mobility group protein

[HMT](#) : Histone méthyltransférase

-I-

[ICAT](#) : Inhibitor of β -catenin and T-cell factor 4

[IGF-1](#) : Insulin-like growth factor 1

[IGF-1R](#) : Insulin-like growth factor 1 receptor

[IGF2](#) : Insulin-like growth factor 2

[IGG](#) : Immunoglobuline de type G

[IOM](#) : Institute of medicine

[IP₃](#) : Inositol 1,4,5-trisphosphate

-J-

[JADE1](#) : Jade family PHD finger 1

[JNK](#) : c-jun N-terminale kinase

-K-

[K](#) : Lysine

[Kansl2](#) : KAT8 regulatory NSL complex subunit 2

[KD](#) : Knock down

[KO](#) : Knock out

-L-

[LC MS/MS](#) : Liquid chromatography tandem-mass spectrometry

[LDL](#) : Low density lipoprotein

[LEF/TCF](#) : T-cell factor/lymphoid enhancer factor

[lincARN](#) : Long acute non-coding RNA

[lncARN](#) : Long acute non-coding RNA

[LRP](#) : Lipoprotein-related receptor protein

[LSD1](#) : Lysine-specific demethylase 1

-M-

[m⁵C](#) : 5-methyl cytosine

[MAP1b](#) : Microtubule-associated protein 1b

[MAP3K12](#) : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12

[MDD](#) : Methyl donor deficiency

[Me-Cbl](#) : Methylcobalamin

[MIAME](#) : Minimum information about microarray experiment

[miARN](#) : Micro acide ribonucléique

[MS](#) : Méthionine synthase

[Mtr](#) : Méthionine synthase

-N-

[NAFLD](#) : Stéatose hépatique non-alcoolique

[NAT](#) : Natural antisense transcript

[ncARN](#) : Acide ribonucléique non-codant

[NCOA3](#) : Nuclear receptor coactivator 3

[NFAT](#) : Nuclear factor of activated t-cells

[NIH](#) : US national institutes of health

[NLS](#) : Séquence de localisation nucléaire

[NSG](#) : Neurostéroïdogenèse

[NTD](#) : Défaut de fermeture du tube neural

[N-ter](#) : Extrémité N-terminale

-O-

[OMS](#) : Organisation mondiale de la santé

-P-

P : Jour post-natal

P450 17 α -lyase : Cytochrome p450 17 α -hydroxylase/c17,20-lyase

P450scc : Cytochrome P450 *side chain cleavage*

PARP : Poly (adénosine diphosphate ribose) polymérase

PAZ domain : Piwi argonaute and zwille domain

pb : Paire de base

PBD : Proliferating cell nuclear antigen binding domain

PBHD : Polybromohomology domain

P-bodies : Processing bodies

PBS : Tampon phosphate salin

PCA : Analyse en composante principale

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PCP : Planar cell polarity

PIP₂ : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

piRNA : Acide ribonucléique interagissant avec Piwi

PKC : Protéine kinase dépendante du calcium

PLC : Phospholipase C

PMSE : Fluorure de phénylméthylsulfonyl

PolII : RNA polymerase II

PP : Protéine phosphatase

[pré-miARN](#) : Précurseur d'acide ribonucléique

[pri-miARN](#) : Transcrit primaire d'acide ribonucléique

[PRMT](#) : Protéine arginine méthyltransférase

[PROMPT](#) : Promoter upstream transcripts

[PSD95](#) : Post synaptic density protein 95

[PSME4](#) : Proteasome activator subunit 4

[PVDF](#) : Polyfluorure de vinylidène

-Q-

[qPCR](#) : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

-R-

[R](#) : Arginine

[R7TM](#) : Récepteur à 7 domaines transmembranaires

[RCOR1](#) : REST co-repressor 1

[RIN](#) : Ribonucleic acid integrity number

[RIPA](#) : Radioimmunoprecipitation assay

[RISC](#) : Ribonucleic acid induced silencing complex

[RNase](#) : Ribonucléase

[RNP](#) : Ribonucléoprotéines

[ROS](#) : Espèce reactive de l'oxygène

[ROR 1/2](#) : Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor

[RPL27A](#) : 60S ribosomal protein L27a

[RPS6KA5](#) : Ribosomal protein S6 kinase alpha-5

[RT](#) : Rétrotranscription

[RT-qPCR](#) : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

-S-

[S](#) : Sérine

[SAH](#) : S-adénosyl-l-homocystéine

[Sal1](#) : Sal-like protein 1

[SAM](#) : S-adénosylméthionine

[scaARN](#) : Petit acide ribonucléique des cajal-bodies

[SD](#) : Déviation standard

[Sdha](#) : Succinate dehydrogenase complex, subunit A

[SDHC](#) : Succinate dehydrogenase complex, subunit C

[SDS](#) : Sodium dodécyl sulfate

[SDS-PAGE](#) : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

[SGZ](#) : Zone sub-granulaire

[Shh](#) : Sonic hedgehog

[SHMT](#) : Sérine hydroxyméthyltransférase

[SIN3A](#) : Sin3 transcription regulator family member A

[siRNA](#) : Petit acide ribonucléique interférent

[snARN](#) : Petit acide ribonucléique nucléaire

[SNC](#) : Système nerveux central

[snoARN](#) : Petit nucléolaire acide ribonucléique

[StAR](#) : Steroidogenic acute regulatory protein

[SVF](#) : Sérum de veau fœtal

[SVS](#) : Zone sous-ventriculaire

[SVZ](#) : Zone sub-ventriculaire

[Syn1](#) : Synapsine 1

-T-

[T](#) : Thréonine

[TBS](#) : Tampon-Tris salin

[TBST](#) : Tampon-Tris salin et tween20

[TC-II](#) : Transcobalamine II

[THF](#) : Tétrahydrofolate

[TO](#) : Transcobalamine-oléosine

TRBP : The human immunodeficiency virus transactivating response ribonucleic acid-binding protein

TS : Targetting sequence

TS : Thymidylate synthase

TSP0 : Translocator protein

-V-

VZ : Zone ventriculaire

-W-

Wnt : Wingless integration site

-X, Y, Z-

Y : Tyrosine

Introduction

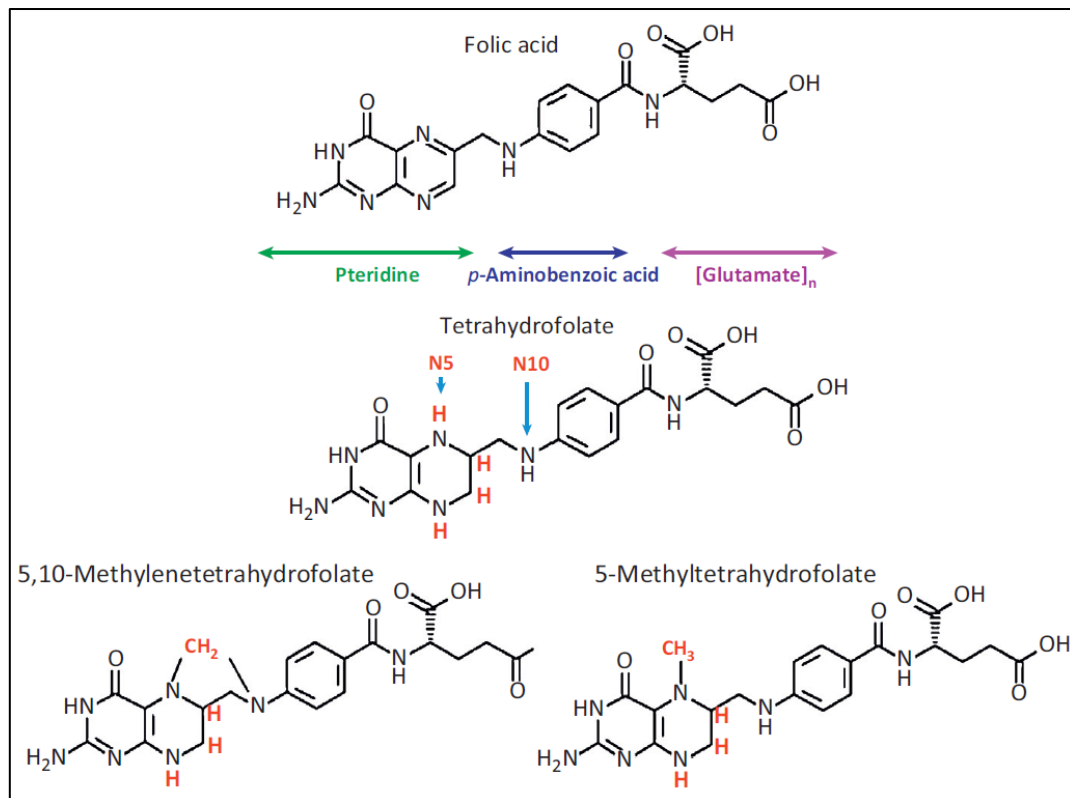
I. Les donneurs de groupements méthyles

Il est établi que des carences précoces en donneurs de groupements méthyles (principalement en vitamines B9 et B12) favorisent la survenue d'altérations du développement, telles que des défauts de fermeture du tube neural de type *spina bifida*, des accouchements prématurés ou des retards de croissance intra-utérine. Les conséquences de ces déficits peuvent aussi être visibles chez l'adulte, avec une augmentation de l'incidence de pathologies entre autres neuropsychiatriques et cardiovasculaires. De plus, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les carences en donneurs de méthyles et notamment en folates (vitamine B9) sont une des causes majeures d'anémie dont souffrent 30,1% des femmes enceintes, faisant de l'étude des déplétions en donneurs de groupements méthyles un enjeu de santé publique majeur à l'échelle mondiale. Si l'importance des folates commence à être connue du grand public, il existe cependant d'autres donneurs de méthyles impliqués dans le cycle des folates et dans celui l'homocystéine-méthionine, que nous décrivons ici.

A. Les folates ou vitamine B9

1. Généralités

La vitamine B9 (folate ou acide folique) est une vitamine hydrosoluble (**Figure 1**) composée d'un noyau dihydroptérine (synthétisée à partir du GMP), d'un acide para-aminobenzoïque et d'un glutamate (Fowler, 2001). Elle joue un rôle central dans le métabolisme cellulaire *via* son implication dans la synthèse des nucléotides et la méthylation de l'ADN, et constitue le point d'entrée des donneurs de groupements méthyles dans le cycle des monocarbones. A l'inverse des végétaux et des bactéries, les animaux sont incapables de la synthétiser *de novo*. Ainsi, les apports alimentaires en folates sont primordiaux pour le bon fonctionnement de la cellule, notamment pour la synthèse des acides nucléiques, de certains acides aminés ou encore *via* la méthylation de l'ADN, de l'ARN, des protéines ou des lipides. Les apports recommandés sont de l'ordre de 0,5 mg par



D'après Guéant et al., 2013

Figure 1 : Structure des folates.

Le mot « folates » est un terme générique désignant la forme soluble de la vitamine B9. Il s'agit en fait d'une molécule conjuguée composée d'une base ptéridine reliée à un acide para-aminobenzoïque et à un glutamate. Le dihydrofolate (DHF) et le tétrahydrofolate (THF) sont les formes réduites des folates (hydrogènes en rouge). La fonction des dérivés du THF est de permettre le transport et le transfert de mono-carbones vers d'autres composés. Ceux-ci peuvent être portés en position N5, N10 (flèches) des formes réduites des folates (par exemple 5-méthyltetrahydrofolate) ou liées entre ces deux atomes d'azotes (par exemple of 5,10-méthylentetrahydrofolate). Ces groupements méthyles sont peuvent être de nature différence : méthyle (-CH₃), méthylène (-CH₂-), méthenyl (=CH-), formyl (-CHO-) ou formimino (-CH=NH).

jour chez l'Homme et les sources principales de folates sont les légumes verts (épinards, brocolis entre autres) ainsi que certaines viandes telles que le foie. Une supplémentation en folates est parfois nécessaire : c'est par exemple le cas chez la femme en période périconceptionnelle.

2. Absorption et métabolisme

Les précurseurs alimentaires de la vitamine B9 (sous forme de polyglutamates) sont hydrolysés en monoglutamates et absorbés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes dans le jéjunum *via* un mécanisme de transport actif (Visentin et al., 2014). Par la suite, ces monoglutamates —conjugués à des protéines de transport telles que l'albumine— sont acheminés vers le foie pour y être réduits en dihydrofolates (DHF) par la folate réductase (**Figure 2**), puis en tétrahydrofolates (THF) par la dihydrofolate réductase (DHFR). Le THF va ensuite être converti en 5,10-méthylène THF (5,10-MTHF) grâce à la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). Il sera alors réduit en 5-méthyltétrahydrofolate (5-Me-THF) par la 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (5,10-MTHFR). C'est sous la forme de 5-Me-THF que les folates sont majoritairement présents dans l'organisme. Il s'agit en effet de la forme d'absorption, de circulation et de stockage de la B9. L'ensemble de ces réactions, depuis l'absorption des folates, jusqu'à leur métabolisme, constitue le « cycle des folates » (Guéant et al., 2013).

B. La vitamine B12, ou cobalamine

1. Généralités

La vitamine B12, ou cobalamine (Cbl) intervient comme co-facteur essentiel dans le cycle de la méthionine (Guéant et al., 2013). Elle existe sous plusieurs formes : méthylcobalamine, adénosylcobalamine, cyanocobalamine et hydroxycobalamine, ces deux dernières étant les formes dites "stables", de la vitamine B12 (Raux et al., 2000). Leur structure est proche de celle de l'hème, cependant l'atome central de fer y est remplacé par un atome de cobalt, ce qui donne son nom à la cobalamine. Cette dernière n'est synthétisée par aucun eucaryote, c'est pourquoi, chez l'Homme, les apports se font par

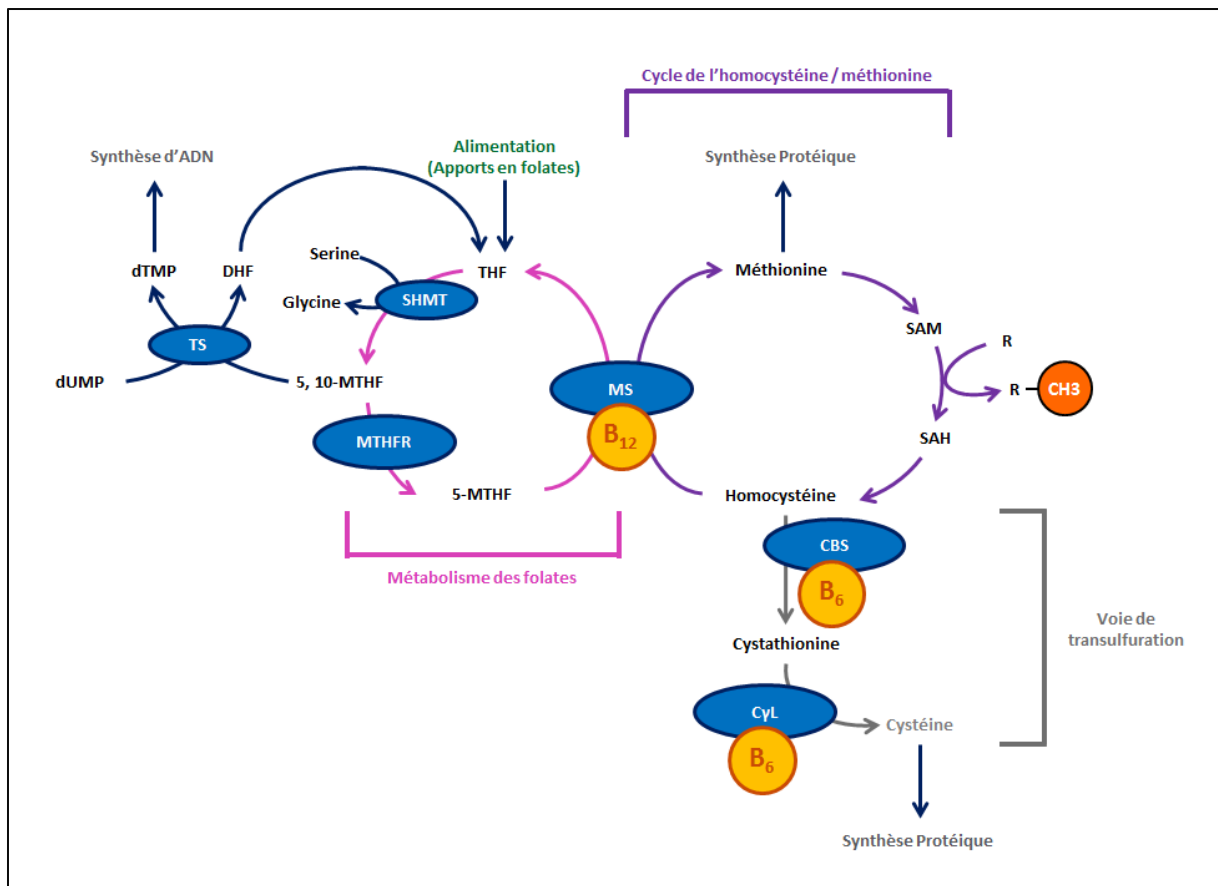


Figure 2 : Métabolisme des monocarbone et cycle de l'homocystéine/méthionine.

Les folates (ou vitamine B9 ou acide folique) font partie de la famille des vitamines B et jouent un rôle de cofacteur permettant l'apport de groupements méthyles. Ils sont nécessaires à la synthèse *de novo* des purines et de la thymidine ainsi qu'à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase (MS). Des défauts dans cette voie de reméthylation peuvent être la cause de symptômes pathologiques tels que des malformations, des retards mentaux ou encore des complications vasculaires. De plus, la méthionine permettant la biosynthèse de S-adenosylméthionine (SAM), une diminution du taux cellulaire de ce donneur universel de groupement méthyle peut directement affecter la méthylation des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Des perturbations épigénétiques peuvent donc en découler, *via* des modifications de méthylation des protéines histones ou de l'ADN.

Abréviations : 5,10-MTHF : méthylène-tetrahydrofolate, 5-MTHF : méthyl-tetrahydrofolate, DHF : dihydrofolate, dTMP : désoxythymidine monophosphate, dUMP : désoxyuridine monophosphate, TS : thymidylate synthase, SAH : S-adenosyl-L-homocystéine, SHMT : sérine hydroxyméthyl-transférase, CBS : cystathionine-β-synthase, CyL : cystathionine-γ-lyase.

l'alimentation mais aussi *via* le microbiote intestinal. Cependant, les apports journaliers recommandés (2,5 µg en Europe selon le règlement 1169/2011 et 6 µg aux USA selon le « Guidance for Industry: A Food Labeling Guide », sur U.S. Food and Drug Administration, janvier 2013) ne peuvent être atteints que grâce à l'alimentation. On retrouve de la cobalamine essentiellement dans les produits d'origine animale (œufs, poissons, produits laitiers...). De même que pour les folates, les besoins en cobalamine vont augmenter au cours de la grossesse.

2. Absorption et métabolisme

La Cbl est tout d'abord libérée au niveau de l'estomac (Quadros, 2010) grâce aux enzymes digestives (pepsine et gastrine). Elle est ensuite prise en charge (**Figure 3**) par une protéine de transport : l'haptocorrine (composée de la transcobalamine I et de la transcobalamine III), synthétisée dans les glandes salivaires. Elle est alors transportée jusqu'au duodénum où les protéases vont dégrader l'haptocorrine, permettant alors la prise en charge de la vitamine B12 par le facteur intrinsèque (FI), synthétisé quant à lui par les cellules pariétales de l'estomac, et résistant à la dégradation protéolytique. Le complexe FI-Cbl va ensuite être absorbé au niveau des entérocytes de l'iléon distal puis dissocié. Le FI sera recyclé, et la Cbl prise en charge par la transcobalamine II (TC-II), permettant ainsi son transport vers le foie, afin d'y être stockée, ou vers les autres tissus périphériques, pour y exercer son rôle métabolique.

La vitamine B12, sous forme de méthylcobalamine (Me-Cbl) intervient comme cofacteur de la méthionine synthase (MS) dans la synthèse de méthionine à partir de l'homocystéine (Hcy). Son rôle est étroitement lié au métabolisme des folates dans le sens où le groupement méthyle nécessaire à la reméthylation de l'Hcy est apporté par le 5-Me THF (**Figure 2**).

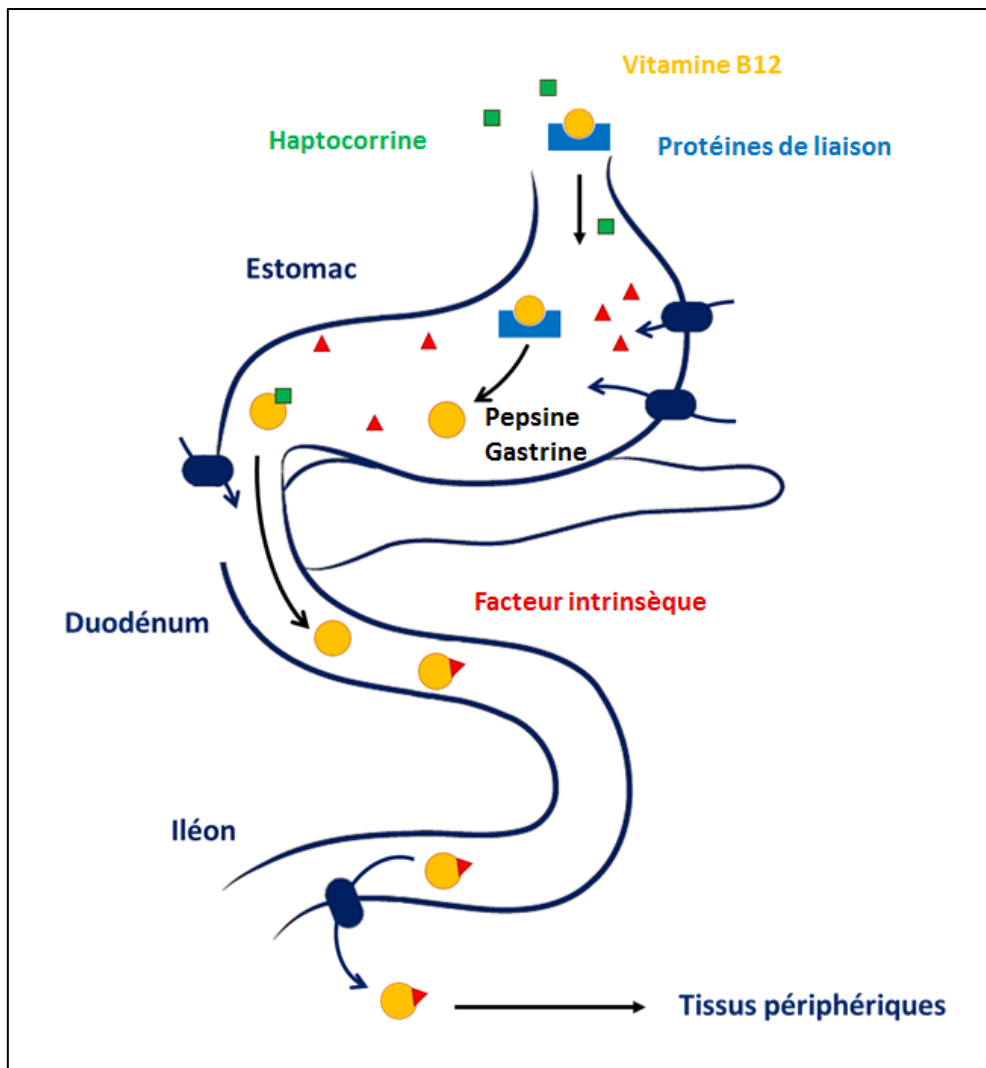


Figure 3 : Transport et absorption de la vitamine B12.

La vitamine B12 est apportée dans l'organisme par voie alimentaire complexée à des protéines de transport. Les enzymes digestives (pepsine et gastrine, synthétisées par les cellules gastriques) ainsi que l'acide chlorhydrique libéré par les cellules pariétales contribuent à la dissociation de la vitamine B12 des protéines avec lesquelles elle est liée. Elle est ensuite prise en charge par l'haptocorrine, synthétisée par les glandes salivaires, dont l'interaction n'est pas perturbée par le pH acide de l'estomac. Dans le duodénum, l'haptocorrine va être dégradée par des protéases synthétisées par les cellules intestinales pancréatiques, et la vitamine B12 se complexe alors avec le facteur intrinsèque, synthétisé par les cellules pariétales de l'estomac. Au niveau de l'iléon, le complexe B12-facteur intrinsèque est finalement absorbé par les entérocytes.

C. L'homocystéine

L'Hcy est un acide aminé soufré non protéinogène. Elle est synthétisée à partir de la méthionine qui est apportée par l'alimentation. Malgré son rôle dans le métabolisme de la méthionine, de la cystéine et dans la méthylation de manière générale, une trop forte concentration en Hcy plasmatique ou tissulaire est cependant délétère. Cet acide aminé est toxique pour les cellules et l'hyperhomocystéinémie est associée à des effets pro-apoptotiques et pro-oxydants notamment.

1. Voie de reméthylation de l'homocystéine

La reméthylation de l'Hcy en méthionine est catalysée par la méthionine synthase (MS) avec son co-facteur la vitamine B12 (sous forme méthylcobalamine). Il s'agit d'une réaction enzymatique extrêmement importante puisque située à l'interface du cycle des folates et de celui de l'Hcy-méthionine. La preuve en est par des expériences menées sur des souris KO (*Knock out*) $MTR^{-/-}$ montrant une létalité embryonnaire précoce, malgré une supplémentation en donneurs de méthyles au cours de la grossesse (Swanson et al., 2001).

Dans le foie et dans le rein, il existe une voie indépendante de la MS permettant la formation de méthionine à partir de la bétaine (Melse-Boonstra et al., 2005) *via* la bétaine homocystéine transférase (BHMT) qui n'est cependant pas exprimée dans le cerveau (Sunden et al., 1997).

Le devenir de la méthionine est multiple, elle pourra notamment être incorporée au cours de la synthèse protéique, mais aussi être transformée en S-adenosylméthionine (SAM), le donneur universel de méthyles pour les réactions de méthylation d'acides nucléiques, de protéines et de lipides (**Figure 2**).

2. Voie de transulfuration de l'homocystéine

L'Hcy est d'autre part impliquée dans la formation de cystéine *via* la voie de transulfuration qui est en fait une voie de catabolisme (**Figure 2**). La cystathionine bétai-

synthase (CBS) catalyse cette réaction irréversible afin de former de la cystathionine qui est réduite en cystéine *via* la cystathionine- γ -lyase (C γ L). Ces deux enzymes utilisent la vitamine B6 comme co-facteur.

D. Perturbations du métabolisme des monocarbones

Le cycle des folates joue un rôle très important au sein de la cellule notamment dans la synthèse des bases purines et pyrimidines. Il est de plus relié au cycle de la méthionine, par l'intermédiaire de la MS. Celui-ci est quant à lui impliqué dans des processus cellulaires-clés, tels que la synthèse protéique ou encore la méthylation de substrats variés (acides nucléiques, protéines, lipides, glucides...) grâce à la SAM, un dérivé de la méthionine considéré comme le donneur universel de groupements méthyles et impliqué dans la plupart des réactions de méthylation au sein de la cellule. Ainsi, des perturbations du cycle des monocarbones ou de la méthionine peuvent être extrêmement délétères, non seulement pour la cellule mais aussi pour l'organisme tout entier.

1. Les carences en donneurs de méthyles

Une carence précoce en donneurs de méthyles peut mener à des anomalies du développement telles que des défauts de fermeture du tube neural et des anencéphalies (Herrmann, 2001; Mattson and Shea, 2003), à des déficits cognitifs chez le futur enfant ou encore à une altération de la neuroplasticité (Iskandar et al., 2010). De manière plus générale, un régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles va favoriser l'accumulation tissulaire et plasmatique d'Hcy. Malgré son importance dans la reméthylation de la méthionine, l'Hcy reste un acide aminé toxique qui possède des propriétés pro-apoptotiques et pro-oxydantes (Blaise et al., 2007). De plus, l'hyperhomocystéinémie est associée à un risque accru de pathologies cardiovasculaires et cérébro-vasculaires (Blom and Smulders, 2011; McCully, 2009).

Par ailleurs, il a été montré qu'une supplémentation en vitamines B9 et B12 peut réduire cette accumulation d'Hcy et ainsi prévenir les atteintes neurologiques causées par certaines

pathologies neurodégénératives (Douaud et al., 2013; Obeid, 2013). Une diminution de l'index de méthylation (représenté par le ratio SAM / SAH) est aussi observée en réponse à la carence, ce qui entraîne des défauts de méthylation des protéines et de l'ADN (hypo- ou hyperméthylation).

Au niveau du système nerveux central, il a été observé que la carence précoce en donneurs de méthyles a aussi des effets délétères avec une accumulation d'Hcy, une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux ou encore une augmentation de l'apoptose, ce qui va se répercuter au niveau fonctionnel. Ainsi, des études antérieures menées dans l'équipe ont montré que la neurogenèse était altérée en réponse à la carence (Pourié et al., 2015), ce qui est à l'origine d'une diminution de la discrimination olfactive (El Hajj Chehadeh et al., 2014a) et de la locomotion (Blaise et al., 2007) chez les rats carencés. Si les effets délétères liés à l'hyperhomocystéinémie sont bien décrits, il est difficile de les distinguer de ceux qui résultent d'une diminution de SAM. Les deux phénomènes sont liés mais le rapport de causalité est compliqué à établir.

2. Supplémentation en acide folique

Des résultats récents du laboratoire montrent qu'une supplémentation tardive en acide folique des femelles gestantes permettait de prévenir certaines altérations développementales (défaut de croissance du fœtus, *spina bifida* ou mauvaise fermeture du vermis du cervelet) sans pour autant les empêcher totalement (Geoffroy et al., 2016). Les nouveaux-nés MDD présentent comme caractéristiques phénotypiques un petit poids et une petite taille à la naissance. Après supplémentation, le poids et la taille des embryons se rapprochent de ceux des contrôles. La supplémentation permet aussi la restauration d'une concentration plasmatique physiologique pour ce qui est des folates, et dans une moindre mesure, une diminution de l'homocystéine circulante (Geoffroy et al., 2016).

Son importance est connue depuis les années 1990 (Czeizel and Dudás, 1992), quand il a été montré pour la première fois qu'une supplémentation en acide folique permettait de diminuer l'incidence des défauts de fermeture du tube neural. Selon les recommandations de l'AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) de 2002, « la

prévention doit être entreprise 4 semaines avant la conception » et la dose conseillée est de 0,4 mg par jour. De plus, au cours des années 1990, des mesures ont été prises en Amérique du Nord afin d'augmenter les apports d'acide folique dans la population générale avec une fortification des produits à base de céréales tels que la farine, les céréales ou les pâtes (US Food and Drug Administration, Fed. Regist. 1996 ;61 :8781-8796). Cela a permis une réduction considérable de la prévalence des défauts de fermeture du tube neural (NTD) à la naissance (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004). Afin de s'assurer que les femmes reçoivent des apports en folates suffisants au cours de la grossesse, le NIH (US National Institutes of Health) et l'IOM (Institute of Medicine) ont augmenté en 1998 les recommandations d'apports journaliers en folates à 600 µg chez la femme enceinte, puis à 500 µg pendant l'allaitement (Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline, 1998).

Enfin, les syndromes de déficits cérébraux en folates (CFD) dus à des auto-anticorps dirigés contre le récepteur aux folates (FRA) tels que certaines formes d'autismes sont traités par de hautes doses d'acide folinique (0,5 à 1 mg / kg / jour) chez le jeune enfant (Ramaekers et al., 2016).

3. Le modèle animal de carence en donneurs de groupements méthyles (MDD)

Le laboratoire a développé un modèle animal de carence précoce en donneurs de méthyles, le modèle MDD (*Methyl Donor Deficiency*), permettant l'étude des conséquences comportementales, fonctionnelles et moléculaires de cette déplétion. Des rates sont soumises à un régime alimentaire carencé en donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) un mois avant l'accouplement (**Figure 4**). Ce régime est maintenu au cours de la gestation et de la lactation.

Ce modèle animal mis au point en 2007 au laboratoire a déjà permis de mettre en évidence différents aspects des conséquences liées à cette carence (Blaise et al., 2005). Ainsi, les rats issus de mères carencées présentent un petit poids à la naissance et une taille inférieure à celle des contrôles. Ces résultats sont encore observables à J₂₁, qui est le

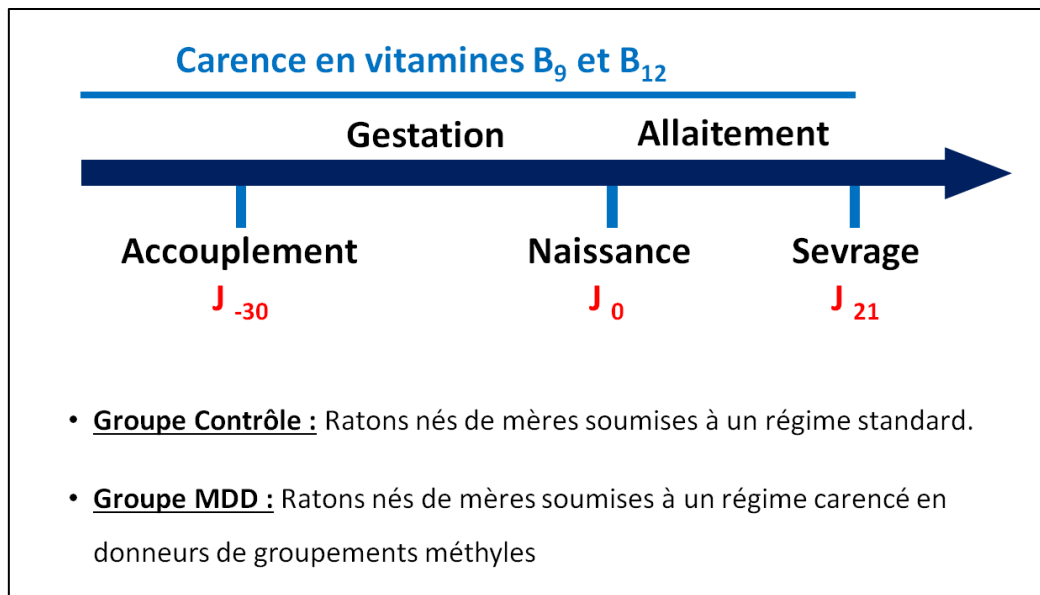


Figure 4 : Le modèle *Methyl Donor Deficiency* (MDD) de carence précoce en donneurs de méthyles.

Des rates Wistar sont soumises à un régime alimentaire carencé en donneurs de groupements méthyles (vitamine B₉ – ou folates- et vitamine B₁₂) un mois avant la mise en accouplement. Cette carence se prolonge pendant la gestation, où la progéniture sera alors exposée à cette carence, et après la naissance pendant la phase d'allaitement. A 21 jours, jour du sevrage, les ratons sont mis à mort.

jour du sevrage des ratons (Blaise et al., 2005). Ces anomalies dans les paramètres de croissance sont du même ordre que celles observées chez le fœtus humain dont la mère présente un statut en folates anormalement bas (van Uiter and Steegers-Theunissen, 2013). Cette même étude a aussi montré la diminution de folates et de vitamine B12 circulants chez les ratons MDD avec, à l'inverse une augmentation de l'Hcy plasmatique, ceci étant relié à une baisse d'expression de la MS et de la CBS dans le foie notamment (Blaise et al., 2005).

Par ailleurs, les ratons MDD présentent des altérations du développement neurocomportemental très marquées avec par exemple une baisse de la coordination locomotrice à J₂₁, mais aussi une diminution de l'apprentissage et de la mémoire (Blaise et al., 2007). Des résultats plus récents ont appuyé ces données à J₁₀ et J₂₁ (Pourié et al., 2015). La discrimination olfactive est également perturbée chez les femelles à J₂₁, associée à une accumulation d'Hcy dans les bulbes olfactifs dans lesquels une augmentation de l'apoptose et une baisse de la prolifération cellulaire ont été observées (El Hajj Chehadeh et al., 2014a).

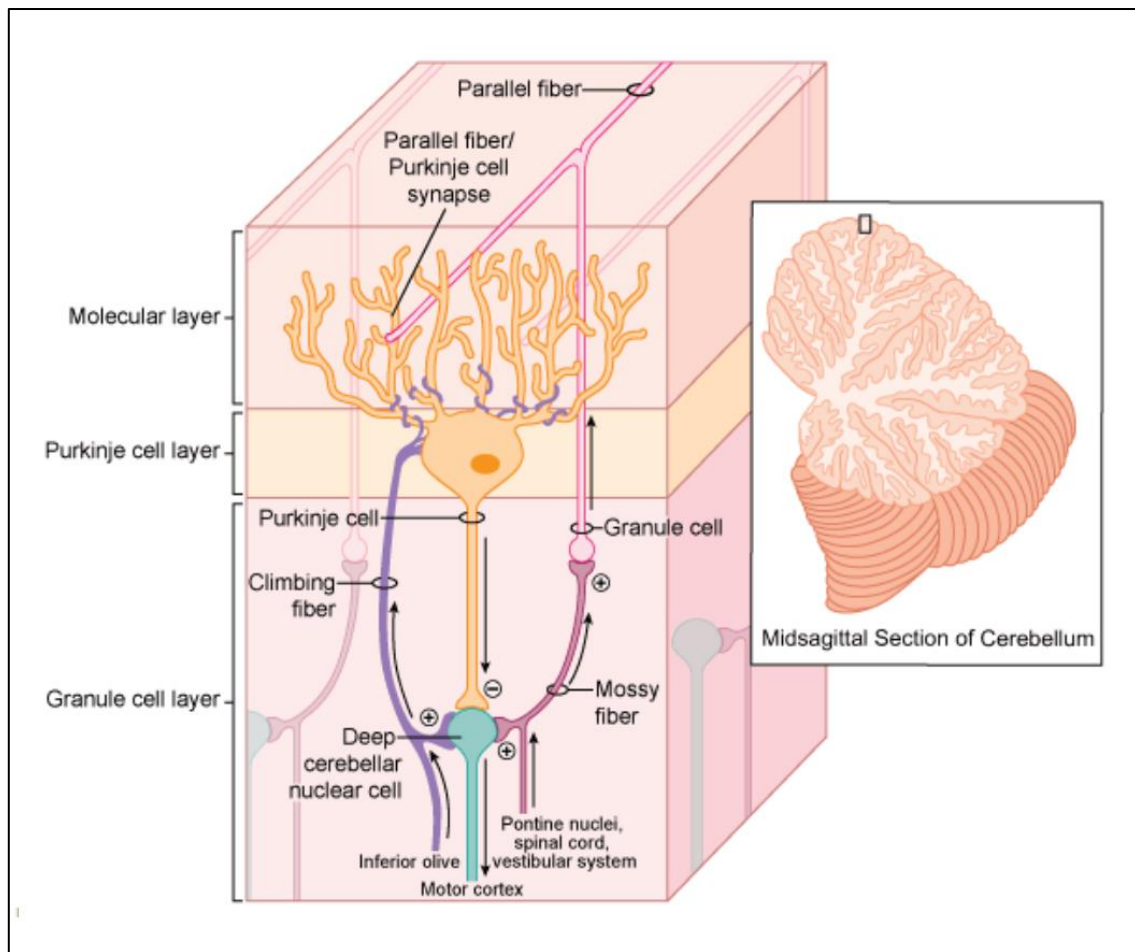
II. Le cervelet

A. Structure anatomique du cervelet

Chez le rat, le cervelet est une structure située en arrière des deux hémisphères cérébraux et au-dessus du tronc cérébral. Il est essentiel dans la coordination motrice, la cognition et il joue un rôle important dans le contrôle et la modulation des émotions (Strata, 2015). D'un point de vue anatomique, le cervelet est divisé en deux hémisphères séparés par une étroite zone centrale : le vermis. Chaque hémisphère est composé de dix lobules (symétriquement).

Le cortex cérébelleux consiste en des replis de substance grise qui entourent et protègent la substance blanche au sein laquelles on retrouve quatre noyaux cérébelleux profonds. Il est organisé en trois couches (de l'intérieur vers l'extérieur) : la couche granulaire (**Figure 5**), qui tire son nom du fait qu'elle est composée en majorité par les corps cellulaires des cellules granulaires, ce qui fait qu'elle est extrêmement dense ; la couche intermédiaire, uniquement composée par les cellules de *Purkinje* et est donc très fine ; et enfin la couche moléculaire, la plus externe du cortex cérébelleux, qui contient les fibres parallèles (des axones issus des cellules granulaires de la couche inférieure) ainsi que les prolongements dendritiques extrêmement arborisés des cellules de *Purkinje*.

On retrouve essentiellement deux types de neurones au sein du cortex cérébelleux : les cellules de *Purkinje* et les cellules granulaires. Ces dernières sont d'ailleurs beaucoup plus nombreuses, à un point tel que, bien que le cervelet ne corresponde qu'à 10 % du poids du total de l'encéphale, il contient à lui seul plus de neurones que dans toutes les autres structures cérébrales réunies (The Synaptic Organization of the Brain, Oxford University Press). Les cellules de *Purkinje*, —qui sont le premier type neuronal à avoir été mis en évidence dès 1837 par *Purkinje* qui leur a donné son nom— possèdent des prolongements dendritiques qui constituent un réseau extrêmement important et forment des synapses avec les fibres parallèles, issues des cellules granulaires. De par l'importance du nombre de ramifications, les cellules de *Purkinje* constituent le cœur du circuit cérébelleux (Hibi and Shimizu, 2012).



Phenotypic Mutation 'drunk'

www.mutagenetix.utsouthwestern.edu (consulté le 10.09.2017)

Figure 5 : Vue d'ensemble des différents types cellulaires présents dans le cervelet.

On retrouve majoritairement deux populations neuronales au sein du cervelet : les cellules de *Purkinje* et les cellules granulaires. Les fibres moussues (*mossy fibers*) traversent la couche granulaire jusqu'à aller former des synapses excitatrices avec les cellules granulaires. Ces dernières présentent des prolongements axonaux au sein de la couche moléculaire qui vont se séparer afin de former les fibres parallèles. Le corps cellulaire des *Purkinje* est localisé dans la couche du même nom et il forme des prolongements dendritiques extrêmement denses et ramifiés vers la couche moléculaire où ils vont recevoir des afférences provenant des fibres parallèles. Les fibres grimpantes (*climbing fibers*) sont originaires de l'olive inférieure et se ramifient pour aller former des synapses avec les dendrites des cellules de *Purkinje* dans la couche moléculaire. Enfin, les noyaux cérébelleux profonds reçoivent quant à eux les potentiels inhibiteurs provenant des cellules de *Purkinje* et les potentiels excitateurs des fibres moussues et des fibres grimpantes.

Les cellules granulaires sont des neurones de très petite taille dont le corps cellulaire (10 μm) est deux fois plus petit que celui des cellules de *Purkinje* et constituent à elles seules 75 % de la totalité des neurones du cerveau. Elles ne vont émettre qu'un faible nombre de ramifications dendritiques, au contraire des cellules de *Purkinje* avec lesquelles elles forment des synapses au sein de la couche moléculaire. D'autre part, elles reçoivent les afférences des fibres moussues pour former des synapses excitatrices.

B. Développement du cervelet

Il est parfois difficile de faire le parallèle entre le développement de l'être humain et celui d'autres mammifères ou d'autres modèles d'étude. Bien que la durée de gestation soit différente entre l'Homme, la souris et le rat, le développement du cervelet reste cependant relativement semblable. Les événements s'enchaînent de la même manière et l'organogenèse s'achève après la naissance chez les trois espèces. Le cervelet est en effet une des rares structures à avoir un développement post-natal. Ce dernier s'achève à 21 jours chez le rat et à environ 9 mois chez l'Homme. Après cette période, sa croissance se poursuivra tout de même, mais au même rythme que le reste de l'encéphale (Marzban et al., 2014).

Les premières zones du cervelet vont se mettre en place dès l'apparition du premier rhombomère, qui sera délimité par l'expression de facteurs de transcription spécifiques, sous la dépendance de sécrétion de facteurs de croissance tels que le FGF (Chi et al., 2003) et des ligands wnt (McMahon and Bradley, 1990).

Au cours de l'histogenèse du cervelet, des profils de neurogenèse et des mouvements cellulaires complexes vont se mettre en place afin de générer le cortex et les noyaux profonds (Hatten and Heintz, 1995). C'est la zone ventriculaire dorsomédiale (VZ) située le long du quatrième ventricule qui va être à l'origine des progéniteurs des cellules de *Purkinje* et des neurones des noyaux profonds. Une seconde zone germinale va se former en amont de la lèvre rhombique, qui donnera par la suite les cellules granulaires qui ne possèdent donc pas la même origine embryologique que les cellules de *Purkinje*.

Chez la souris, la détermination puis la différenciation des premiers progéniteurs du cervelet commencent à environ 10,25 jours embryonnaires (E10,25) et ils seront à l'origine des noyaux profonds. A partir de E12,5, la seconde zone neurogénique fait son apparition après que des progéniteurs ont migré depuis laèvre rhombique, pour former la couche granulaire externe.

Les évènements migratoires vont continuer à s'enchaîner jusqu'à ce que les ébauches du cervelet soient mises en place et les progéniteurs vont alors s'engager dans des voies de différenciation sous la dépendance de facteurs de croissance -notamment de la famille des BMP (Bone Morphogenic Factor)- synthétisés par les territoires environnants (Roussel and Hatten, 2011).

L'essentiel du développement du cervelet s'effectue cependant en période post-natale, avec un pic de prolifération entre le cinquième et le huitième jour (P5 et P8). Entre la naissance et la fin de la deuxième semaine post-natale, les progéniteurs des cellules granulaires vont sortir du cycle cellulaire et migrer vers l'intérieur du cortex cérébelleux, sous les cellules de *Purkinje* d'où elles vont étendre leurs fibres parallèles et où elles formeront la couche granulaire. C'est à partir de P18 - P20 chez la souris (12 et 16 semaines chez l'Homme) que l'arborisation des cellules de *Purkinje* va se mettre en place ainsi que les différentes synapses précédemment décrites, qui continueront par la suite à augmenter leur complexité (Marzban et al., 2014)

La prolifération, la migration, la différenciation et la croissance des terminaisons neuronales sont sous la dépendance de nombreuses voies de signalisation, facteurs de croissance, chimiokines, facteurs de transcription et ARNs non-codants. Des perturbations de ces acteurs sont impliqués dans le développement de pathologies chez l'enfant comme c'est le cas avec les médulloblastomes par exemple (Roussel and Hatten, 2011).

C. Effets délétères de la carence précoce en donneurs de méthyles sur le cervelet

1. Altérations du neurocomportement

Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que le cervelet était particulièrement affecté par la MDD. Ainsi, si nous avons déjà parlé des altérations de la coordination locomotrice chez les rats carencés à J₂₁ (Blaise et al., 2007), il est important de relier cela à la structure cérébrale impliquée dans le contrôle de la motricité, à savoir le cervelet. Plusieurs travaux du laboratoire portant sur les MDD ont été réalisés à cette période de la vie de l'animal qui correspond au jour du sevrage, mais aussi au dernier jour de formation post-natale du cervelet chez le rat (Altman 1982). Ainsi, les rats MDD sont moins bons dans les tests comportementaux permettant d'évaluer cette coordination motrice (Blaise et al., 2007). A cela a été associée une accumulation tissulaire d'Hcy au niveau cérébelleux en lien avec une baisse d'activité MS et CBS (Blaise et al., 2007).

2. Déficiences de la fonction synaptique

Récemment, il a été montré grâce au modèle MDD que la carence précoce en donneurs de méthyles avait aussi un impact sur les fonctions synaptiques. Ainsi, les femelles carencées présentent une diminution d'expression des synapsines I, IIa et IIb au niveau transcriptionnel et protéique (Pourié et al., 2015). Les synapsines sont une famille de protéines que l'on retrouve notamment à la surface des vésicules synaptiques et qui sont impliquées dans la synaptogenèse et la modulation du relargage de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Huttner et al., 1983). De plus, la protéine *scaffold* PSD95 (post synaptic density protein 95) qui joue un rôle primordial dans la mise en place et le maintien de la structure des synapses (Hunt et al., 1996) voit elle aussi son expression diminuer en réponse à la carence chez les femelles et chez les mâles à J₂₁ (Pourié et al., 2015).

D'autres études menées au laboratoire ont aussi pointé du doigt un impact différent de la MDD en fonction du sexe, avec des femelles plus sensibles à cette carence (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Ces travaux ont porté sur l'étude de la

neurostéroïdogénèse (NSG) dans le cervelet en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles.

3. La neurostéroïdogénèse

a. Découverte de la neurostéroïdogénèse

La NSG consiste en la synthèse de stéroïdes dans le cerveau *in situ* (**Figure 6**). Ce n'est qu'à partir des années 1980 que la synthèse de stéroïdes *de novo* au niveau cérébral a été mise en évidence (Corpénot et al., 1981). En effet, après ablation des glandes surrénales et des gonades, la présence de déhydroépiandrostérone (DHEA) au niveau cérébral chez le rat, et notamment dans le cervelet, avait tout de même été détectée. Si c'est à ce moment que le terme de « neurostéroïde » a été proposé, il aura fallu attendre encore une vingtaine d'années avant que d'autres travaux ne confirment définitivement cette synthèse stéroïdienne en dehors des glandes stéroïdogènes « classiques ».

Les enzymes nécessaires à la synthèse de stéroïdes sont exprimées dans le cerveau, notamment le cytochrome P450_{scc} (*side-chain cleavage* ou CYP11A1) et le cytochrome P450 aromatase (CYP19A1). De même, les produits de la NSG (prégnénolone, progestérone, androstérone, testostérone et DHEA) ont aussi été mis en évidence dans le cortex cérébral (Zwain and Yen, 1999). On retrouve également ces enzymes exprimées dans les cellules de *Purkinje* (Tsutsui, 2006) ainsi que dans l'hippocampe, le gyrus denté, les bulbes olfactifs et les cellules granulaires (Furukawa et al., 1998).

b. Voie de biosynthèse des neurostéroïdes

La NSG utilise le cholestérol comme substrat initial pour aboutir à la synthèse de testostérone et d'œstradiol. Le cholestérol est lui aussi synthétisé dans le cerveau et est transporté sous forme estérifiée par les LDL (Low Density Lipoprotein) afin d'être capté par les cellules stéroïdogènes. Il sera ensuite libéré sous forme libre dans le cytoplasme où il pourra être transloqué à travers les membranes mitochondriales grâce au « transduceosome ». Il s'agit d'un complexe protéique mitochondrial transmembranaire

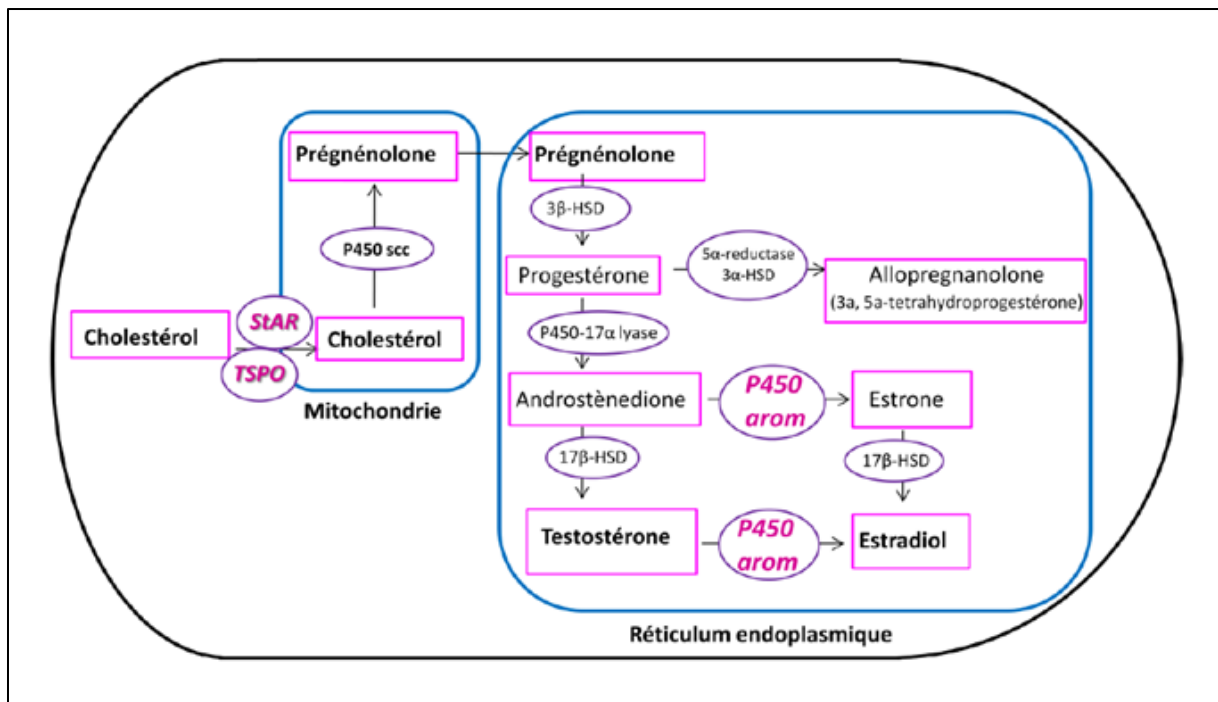


Figure 6 : Principales étapes de la neurostéroïdogenèse.

Abréviations : StAR : steroidogenic acute regulatory protein ; TSPO : translocator protein ; P450^{scc} : cytochrome P450 side-chain cleavage ; 3 β -HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase ; P450 17 α -lyase : cytochrome P450 17 α -hydroxylase/c17,20-lyase ; 17 β -HSD : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase ; P450 arom : cytochrome P450 aromatase.

composé entre autres de StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*) et de TSPO (*Translocator Protein*). Cela constitue la première étape mais aussi l'étape limitante de la NSG (**Figure 6**).

Lorsque le cholestérol a été transloqué dans la mitochondrie, il va pouvoir être modifié par le cytochrome P450_{scc} et transformé en prégnénolone qui sort ensuite de la mitochondrie pour aller rejoindre le réticulum endoplasmique où elle va subir une série de modifications qui aboutiront à la formation de testostérone ou d'œstradiol grâce à l'action de l'aromatase (**Figure 6** ; Tsutsui et al., 2011).

c. Défauts de neurostéroïdogénèse et carence précoce en donneurs de méthyles

Des travaux récents du laboratoire sur le modèle MDD ont permis de mettre en évidence l'impact d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur la NSG qui joue un rôle crucial dans la mise en place de la neurogenèse. Cette dernière est indispensable au développement du cervelet durant les 20 premiers jours postnataux, période de mise en place de l'architecture neuronale. Les enzymes de la NSG sont exprimées dès la naissance et, dans le cas de la protéine StAR, à des taux bien plus élevés en période postnatale comparé à l'âge adulte (Tsutsui, 2006).

La carence conduit à une réduction d'expression de plusieurs protéines-clés de la NSG dans différentes régions cérébrales, notamment les bulbes olfactifs des rats carencés (El Hajj Chehadeh et al., 2014a), entraînant une diminution du niveau d'œstradiol. Ces altérations moléculaires étaient associées à une diminution de la discrimination olfactive (El Hajj Chehadeh et al., 2014a), dont la mise en place dès la naissance, grâce à une activation de la NSG, est vitale pour le raton pour assurer la reconnaissance de l'odeur maternelle permettant l'allaitement. Aussi, ces effets délétères sur la NSG pourraient expliquer le retard de croissance et de prise de poids observés chez ces rats nés de mères carencées.

Dans le cervelet, la diminution des niveaux d'expression des protéines clés de la NSG, comme StAR et l'aromatase était associée à une altération de l'expression des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β , ainsi qu'un effondrement du contenu en estradiol et autres neurostéroïdes chez les rats nés de mères carencées. Quant aux mécanismes cellulaires impliqués, ces effets délétères de la carence sont associés à une atteinte de la voie de signalisation dépendante de l'AMPc. L'expression de différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes de la NSG était également affectée, notamment SF-1 (Steroidogenic factor1), principal régulateur transcriptionnel des gènes de la stéroïdogénèse (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**).

Enfin, ces altérations liées à la NSG ont spécifiquement été observées chez les jeunes femelles carencées, ce qui suggère un effet dépendant du sexe dans la réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles.

III. Les voies de signalisation dépendantes des ligands wnt

La voie de signalisation wnt (*wingless integration site*) est une voie majeure qui est impliquée dans la plupart des processus cellulaires-clés et permet notamment le contrôle de la balance prolifération / différenciation / apoptose. Le rôle qui lui a cependant été accordé en premier lieu était uniquement développemental. Les premiers travaux portant sur l'embryogenèse chez *D. melanogaster* ont permis de mettre en évidence un gène, dont la délétion causait l'absence de formation d'ailes. Ce gène récessif fut appelé *Wingless* (*Wg* ; « sans ailes ») et son rôle dans la mise en place de la polarité segmentale chez la drosophile valut le prix Nobel de physiologie en 1995 à Nüsslein-Volhard et Wieschaus pour l'ensemble de leurs travaux au cours des années 1980 sur l'embryogenèse (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Wieschaus et al., 1984). Aujourd'hui, on sait que la voie wnt est primordiale à l'homéostasie cellulaire et au-delà de la recherche fondamentale, l'intérêt de son étude réside aussi en la compréhension des mécanismes d'initiation, de promotion et de progression du cancer, où elle est très souvent dérégulée (Tai et al., 2015), tout comme dans certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Arnés and Casas Tintó, 2017). De ce fait, de par son rôle essentiel au cours du développement, et notamment du développement du système nerveux central (SNC), la voie wnt demeure très étudiée dans le cadre des neurosciences.

A. Description des voies de signalisations wnt

Au cours du temps, ce qui était considéré dans les années 1980 comme « la voie wnt » est finalement devenu « la voie wnt canonique » car d'autres signalisations incluant les ligands wnt et aussi d'autres acteurs ont été découvertes. En effet, depuis la démonstration de son implication dans la mise en place de la polarité segmentale, le nombre d'articles publiés à propos de wnt n'a cessé d'augmenter. Nous allons dans un premier temps décrire le fonctionnement de la voie canonique mais aussi de la voie wnt canonique divergente, de la PCP (Planar Cell Polarity) et de la voie wnt Ca^{2+} -dépendante.

1. Voie wnt canonique

Il existe donc plusieurs voies de signalisation de wnt au sein de la cellule, la plus répandue étant la voie dite « canonique ». Dans ce cas de figure, la glycoprotéine Wnt (codée par le gène *Wingless*), va aller se fixer sur son récepteur à sept domaines transmembranaires (R7TM) Frizzled (Fzd), ce qui va avoir pour effet de déclencher la voie de signalisation dite « β -caténine-dépendante ». A ce jour, 19 gènes *Wnt* extrêmement conservés et répartis en douze sous-familles ont été identifiés. Ils possèdent des actions redondantes ou à l'inverse tissu ou cellule-spécifiques. Le déclenchement de la voie de signalisation nécessite que le ligand wnt se fixe à l'extrémité N-terminale extracellulaire de son récepteur Fzd ainsi qu'au co-récepteur LRP (Lipoprotein-related receptor protein). Cela va avoir pour effet le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine adaptatrice de type Dvl (Dishevelled). Lorsque Dvl1 est recrutée, on a dissociation d'un complexe protéique cytoplasmique contenant notamment β -caténine (**Figure 7**).

Cette dernière possédant un rôle de co-activateur transcriptionnel de la voie Wnt, elle est « par défaut » dégradée ce qui fait que la voie est éteinte en conditions basales. Lorsque Fzd n'est pas activé, la β -caténine se trouve au sein d'un complexe protéique composé d'APC (*adenomatous polyposis coli*), de l'Axine et de GSK-3 β (glycogène synthase kinase 3 β , impliquée dans la synthèse du glycogène insulino-dépendante dans les muscles squelettiques par phosphorylation de la glycogène synthase). Ces protéines possèdent toutes un rôle inhibiteur de la voie de signalisation Wnt- β -caténine. GSK-3 β phosphoryle β -caténine ce qui permet le démasquage d'un site d'ubiquitylation et conduit à la dégradation de β -caténine qui ne pourra donc pas participer à la transcription des gènes-cibles de la voie wnt-canonique (**Figure 7**).

En revanche, lorsque Wnt se fixe sur son récepteur, la protéine axine est recrutée à la membrane avec Dvl1, ce qui va empêcher GSK-3 β de phosphoryler β -caténine (Itoh et al., 1998; Kishida et al., 1999; Lee et al., 1999; Smalley et al., 1999). Cette dernière ne sera donc plus dégradée et va s'accumuler, ce qui va lui permettre d'exercer son rôle de co-activateur transcriptionnel. En effet, lorsqu'elle n'est plus dégradée, β -caténine va être transloquée dans le noyau où elle va interagir —grâce à son domaine de répétitions Armadillo (**Figure 8**) — avec des facteurs de transcription appartenant à la famille LEF/TCF (T-cell

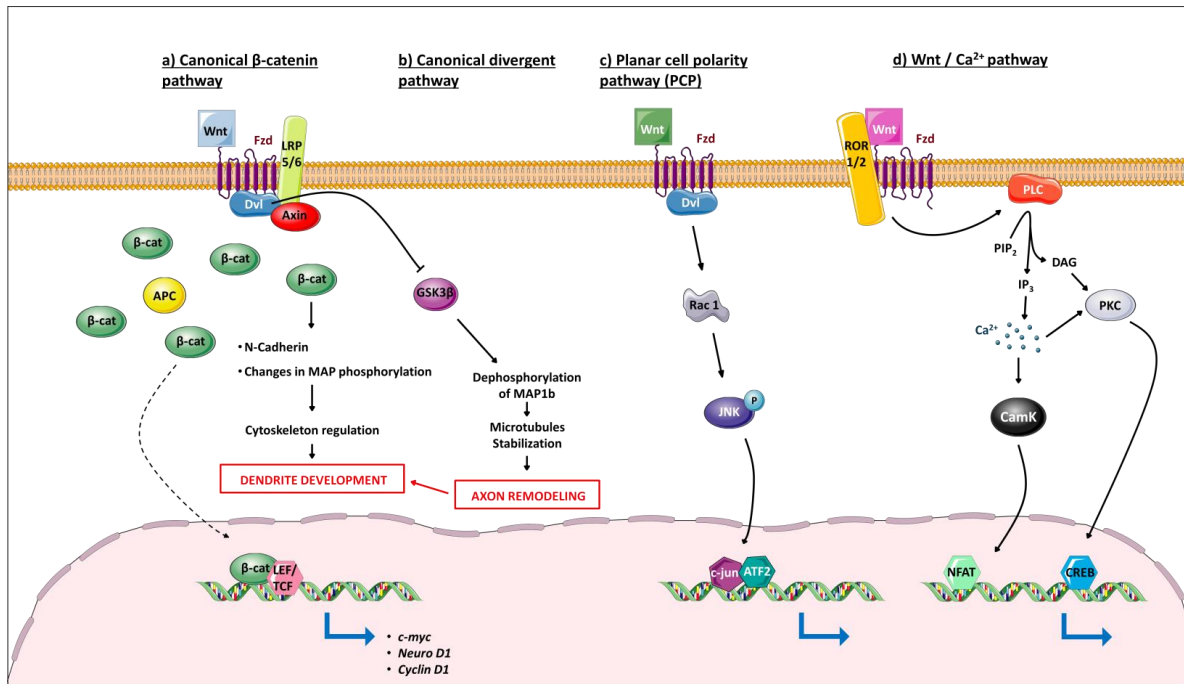


Figure 7 : Les voies de signalisation wnt.

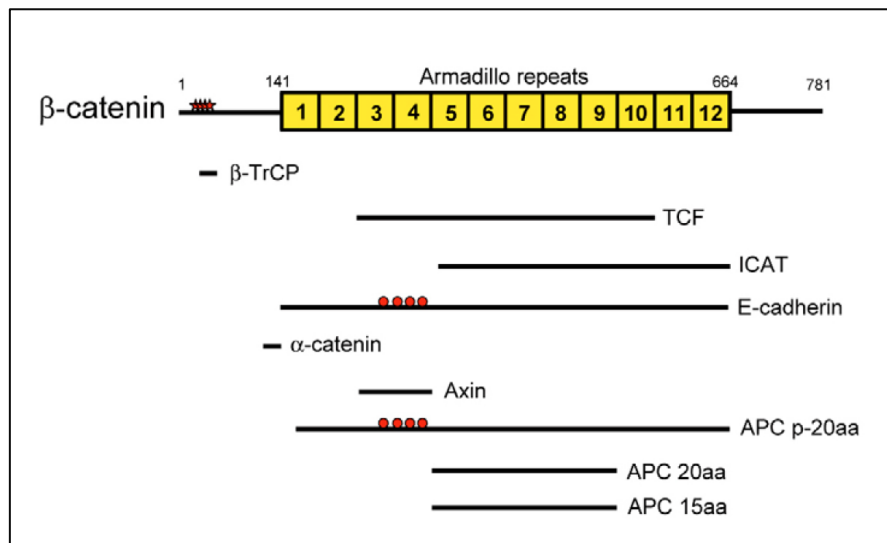
Quatre voies de signalisation Wnt sont présentées ici. Deux d'entre elles mettent en jeu la kinase GSK-3β : la voie canonique et la voie canonique divergente. Les autres voies sont dites « non-canoniques », il s'agit de la PCP (Planar Cell Polarity) et la voie dépendante du calcium (Ca²⁺).

Dans **a)** la voie canonique, l'activation du récepteur Frizzled (Fzd) par un ligand wnt extracellulaire permet le recrutement de Dishevelled 1 (Dvl1) et de l'Axine à la membrane ce qui cause la dislocation du complexe cytoplasmique composé de β-caténine, GSK-3β, APC, Dvl1 et de l'Axine. Par conséquent, β-caténine ne pourra plus être phosphorylée par GSK-3β et ne sera donc plus dégradée. Elle va alors s'accumuler dans le cytoplasme et pourra passer dans le noyau où son interaction avec le facteur de transcription LEF/TCF va permettre l'activation de la transcription des gènes-cibles de la voie dépendante de la β-caténine, tels que *c-myc* ou *Cycline D1*.

L'inhibition de l'activité de GSK-3β par dislocation du complexe cytoplasmique peut d'autre part permettre d'activer **b)** la voie canonique divergente et mener à l'augmentation de la stabilité des microtubules *via* la non-phosphorylation de MAP1b, ce qui permettra le « remodelage des axones » et le développement dendritique.

La voie de la PCP **c)** est déclenchée par l'activation du récepteur membranaire Fzd par fixation d'un ligand wnt extracellulaire et elle implique l'activation par phosphorylation de JNK par Rac et aboutira à l'expression des gènes-cibles de la voie PCP. Par ailleurs, JNK peut aussi stabiliser le cytosquelette et promouvoir la croissance axonale.

La voie dépendante du Ca^{2+} **d)** est enclenchée par la fixation d'un ligand wnt extracellulaire à Fzd ce qui permet le recrutement du co-récepteur à activité tyrosine-kinase ROR 1/2 et mener à la libération cytosolique de Ca^{2+} *via* l'activation de la PLC (phospholipase C). CamKII (calmoduline kinase II) est une kinase activée par le Ca^{2+} qui va indirectement induire l'expression des gènes-cibles de la voie Ca^{2+} -dépendante par le biais de l'activation du facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells).



Modifié d'après Xu and Kimelman, 2007

Figure 8 : Interaction de la β -caténine avec ses partenaires.

Résumé des régions de la β -caténine qui entrent en interaction avec ses partenaires protéiques connus. Les lignes noires représentent les régions en interaction directe avec la β -caténine alors que les points rouges montrent les sites de la β -caténine qui se lient aux résidus Ser/Thr phosphorylés de E-cadhérine et des régions de répétitions de 20 acides aminés d'APC. Les étoiles rouges sur la β -caténine représentent les sites de phosphorylation par GSK-3 β qui conduiront à son ubiquitinylation par l'ubiquitine-ligase β -TrCP et à sa dégradation protéasome-dépendante.

Abréviations : β -TrCP : beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase, TCF : T-cell factor, ICAT : inhibitor of β -catenin and TCF-4, APC : *adenomatous polyposis coli*.

factor/lymphoid enhancer factor) et possédant un domaine HMG (High Mobility Group protein) d'interaction avec l'ADN (**Figure 8**). On aura alors transcription des gènes-cibles de la voie de signalisation Wnt- β -caténine (Xu and Kimelman, 2007).

2. Voie wnt canonique divergente

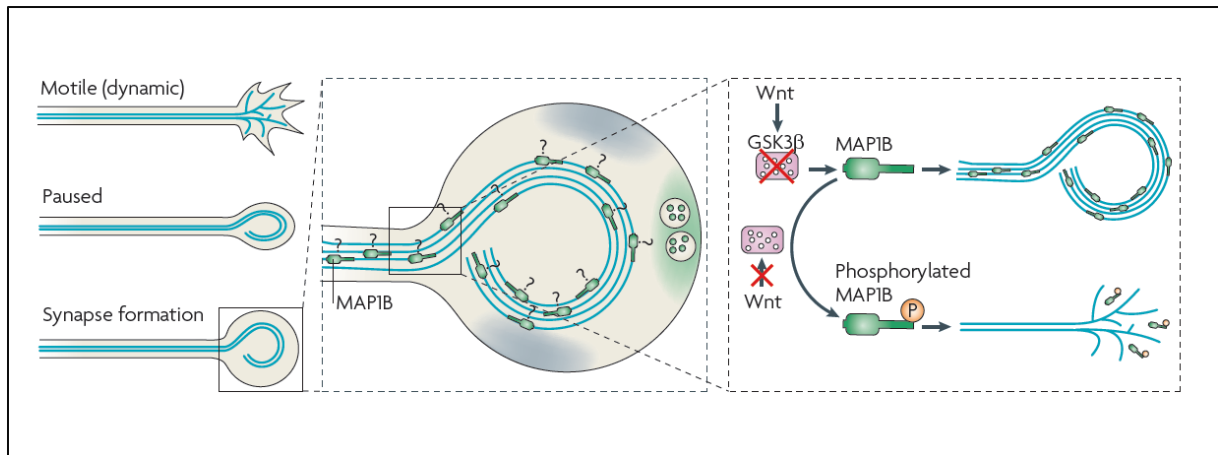
En absence de Wnt sur le récepteur Fzd, la protéine β -caténine peut être impliquée dans le soutien du cytosquelette cellulaire en interagissant avec l' α -caténine, ou dans l'organisation des jonctions cellulaires lorsqu'elle est associée aux cadhérines (Xu and Kimelman, 2007).

Concernant la voie canonique divergente, elle met en jeu les mêmes protéines que la voie canonique (**Figure 7**) et de la même manière, lorsque le ligand wnt se sera fixé à son récepteur, l'activité kinase de GSK-3 β sera inhibée du fait qu'elle n'est plus stabilisée au sein du complexe cytoplasmique. Elle ne pourra donc plus phosphoryler MAP1b (Microtubule associated protein) qui est une protéine impliquée dans l'assemblage des microtubules, très exprimée dans les neurones au cours du développement et qui permet l'extension axonale (Conde and Cáceres, 2009).

Contrairement à la voie canonique classique, nous n'aurons pas ici d'impact sur la transcription, mais plutôt sur la dynamique des microtubules. En effet, pour permettre la croissance axonale, les microtubules subissent des cycles d'assemblage / désassemblage permanent (Conde and Cáceres, 2009), cela étant permis notamment par MAP1b sous son état phosphorylé. De fait, lorsqu'elle ne sera plus phosphorylée —par exemple dans le cadre d'une inhibition de l'activité de GSK-3 β — alors les microtubules seront dits « en pause », tout comme la croissance axonale (**Figure 9**).

3. Voie de la PCP (Planar Cell Polarity)

Au cours du développement, un processus fondamental chez les organismes multicellulaires est le contrôle spatial et temporel de la prolifération, de la différenciation, de la survie et de la polarité cellulaire. Les cellules épithéliales sont par exemple



Modifié d'après Conde and Cáceres, 2009

Figure 9 : Régulation du cytosquelette de microtubules synaptiques.

L'architecture du cytosquelette de microtubules est un élément essentiel au contrôle de la morphologie et de la motilité des cônes de croissance au cours de la formation des synapses. Pendant le développement du bouton synaptique, des *microtubule loops* (*Paused* et *Synapse formation*) ont été observées. Le contrôle de l'organisation des microtubules par MAP1B (Protéine associée aux microtubules) représente un mécanisme de régulation de la motilité du cône de croissance et du développement synaptique. La phosphorylation de MAP1B par GSK-3 β (Glycogène Synthase Kinase- β 3) permet le maintien des microtubules dans un état dynamique nécessaire à la motilité du cône de croissance. Par opposition l'activation de la voie wnt permet le maintien les microtubules sous une conformation *looped* stable plutôt orientée vers la formation de synapses.

caractérisées par leur polarité apico-basale, avec la membrane apicale orientée vers l'extérieur ou le lumen, alors que la membrane basale est accolée aux cellules des couches inférieures (Simons and Fuller, 1985). De la même manière, les cellules mésenchymateuses possèdent elles aussi une orientation. Des voies de signalisation vont être activées au sein des cellules afin de permettre la mise en place de cette polarité ainsi que des mouvements migratoires au sein des tissus. Il est cependant nécessaire qu'une coordination entre toutes les cellules d'un territoire existe pour le bon développement du futur organe. La voie de la PCP est impliquée dans cette bonne coordination (Gao, 2012).

Cette voie wnt non canonique ne met en jeu ni GSK-3 β , ni β -caténine mais son déclenchement aboutit toutefois à une activation de la transcription. Le ligand wnt se fixe à son récepteur transmembranaire Fzd (**Figure 7**) pour entraîner le recrutement à la membrane de Dvl1. Cela va favoriser l'activation des GTPases Rho et Rac qui activeront la c-Jun N-terminal kinase (JNK). JNK phosphorylera alors le facteur de transcription c-jun pour lui permettre de transloquer dans le noyau et de s'y associer avec le co-activateur ATF2 (Facteur de Transcription dépendant de l'AMPc 2). Ce complexe va finalement autoriser l'expression des gènes nécessaires à la mise en place de la polarité des cellules (Fanto and McNeill, 2004).

4. Voie wnt dépendante du calcium

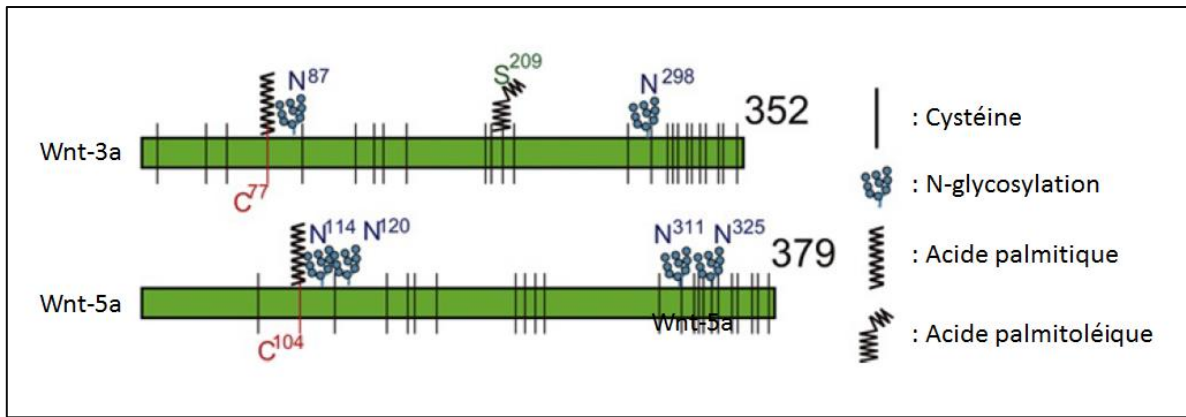
Afin de permettre l'activation de la voie wnt Ca²⁺-dépendante (**Figure 7**), le ligand Wnt-5a va se fixer à son récepteur membranaire Fzd, et donc autoriser le recrutement du co-récepteur à activité tyrosine kinase Ror1/2 (De, 2011). Ce dernier va pouvoir phosphoryler la phospholipase C membranaire (PLC) qui catalyse la transformation du PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en DAG (diacylglycérol) et IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate). De manière classique, l'IP₃ permet la libération de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique et active ainsi la protéine kinase C (PKC) qui peut phosphoryler le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding factor). Par ailleurs, les ions calciques permettent aussi l'activation de la calmoduline kinase II (CamKII) et de la calcineurine qui régulent positivement le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of

activated T-cells). Les gènes transcrits par CREB seront impliqués dans le contrôle de la survie cellulaire alors que ceux transcrits par NFAT seront plutôt impliqués dans l'inflammation (Hogan et al., 2003).

B. Les ligands wnt

Les ligands wnt sont des glycoprotéines qui interagissent avec des récepteurs à sept domaines transmembranaires de la famille Fzd. Elles possèdent des modifications post-traductionnelles par des lipides, notamment l'ajout covalent d'acide palmitique ou palmitoléique (**Figure 10**) nécessaires à leur bonne reconnaissance par Fzd (Takada et al., 2006). Dix-neuf ligands appartenant à cette famille ont été mis en évidence chez l'Homme et la souris. Ils possèdent des actions qui peuvent différer par exemple en fonction du type cellulaire, ou au contraire être redondantes (Kikuchi et al., 2011). Ils sont de plus le point commun entre les différentes voies de signalisation wnt décrites précédemment.

Dans les voies dépendantes de β -caténine (canonique et canonique divergente), on retrouvera principalement une activation par Wnt-1, Wnt-3a et Wn8 alors que dans la PCP Wnt-5a et Wnt-11 seront les premiers messagers extracellulaires les plus communs, même s'il ne s'agit pas d'une règle absolue (Veeman et al., 2003). Malgré le nombre extrêmement élevé de travaux portant sur la voie wnt, la manière dont chaque récepteur va reconnaître un ligand particulier à un moment spécifique et dans un type cellulaire donné n'est pas comprise. L'hypothèse actuelle soutient que ce sont les modifications post-traductionnelles des ligands qui permettent l'interaction avec le bon récepteur (Willert and Nusse, 2012). De plus, il aura fallu un vingtaine d'année afin de purifier une protéine wnt active mais il aura fallu dix ans de plus pour obtenir sa structure en haute résolution par cristallographie (Janda et al., 2012). Ces travaux sont relativement récents et permettront de bien mieux comprendre ces interactions.



Modifié d'après Kikuchi et al., 2011

Figure 10 : Modifications post-traductionnelles des ligands wnt.

Wnt-3a et Wnt-5a sont deux des ligands wnt les plus répandus au sein du système nerveux central. Leur structure est similaire et ils possèdent des modifications post-traductionnelles qui leur sont propres et il semblerait qu'elles permettent la reconnaissance spécifique par le récepteur Fzd dans un type cellulaire donné. On y trouve notamment des N-glycosylations, des palmitoylations et des palmitoylations. La position des acides-aminés modifiés est également représenté.

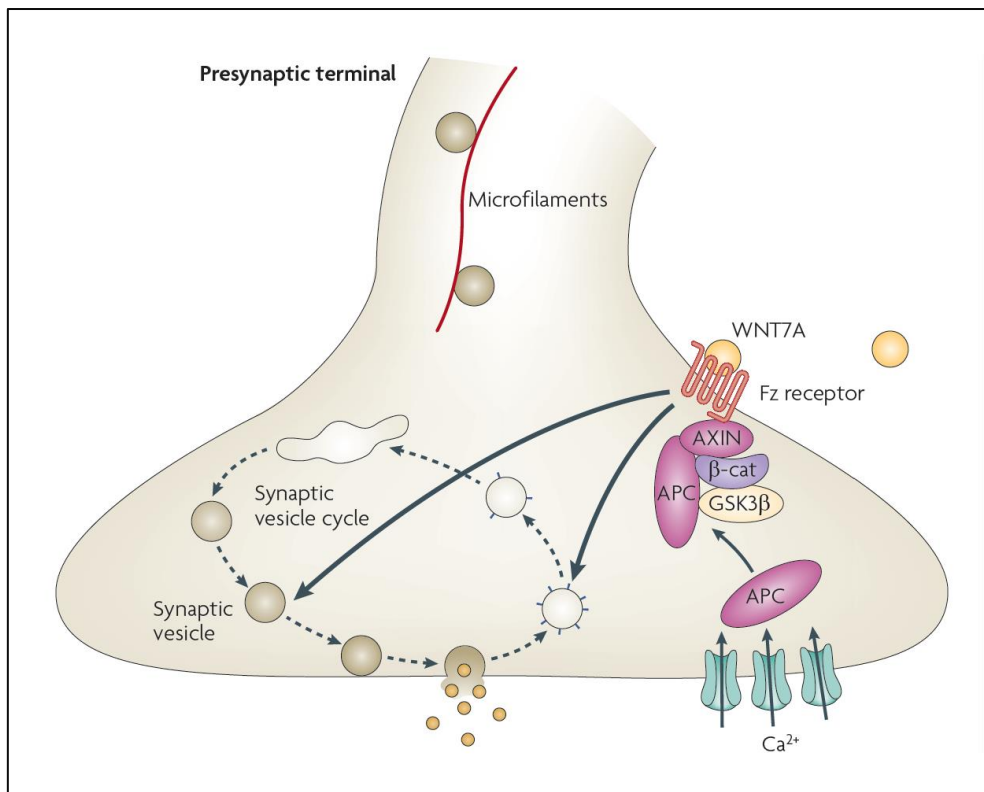
C. Voies wnt et système nerveux central

1. Importance de la voie wnt dans la fonction synaptique

La voie wnt est à l'origine connue pour la mise en place de la polarité de l'embryon chez *D. melanogaster*, mais le fait que le ligand wnt-7a permette d'augmenter l'agrégation de la synapsine 1 dans les cellules granulaires a permis de mettre en évidence son rôle dans l'assemblage présynaptique au cours du développement du cervelet (Ciani and Salinas, 2005). De même, la voie wnt joue un rôle primordial au cours du développement post-natal du cervelet par sa capacité à réguler la croissance et la différenciation cellulaire ce qui permet la bonne mise en place du réseau synaptique (Lucas and Salinas, 1997; Salinas et al., 1994).

Chez l'adulte, l'expression persistante de Wnt au niveau central —tout en connaissant son implication dans la modulation de la neurogenèse et de la neuroplasticité— sous-entend que les voies qu'il active jouent un rôle important dans la neuroprotection et la maintenance des connexions synaptiques tout au long de la vie de l'individu (Inestrosa and Arenas, 2010). Par ailleurs, il a été montré que wnt-7a permettait de coordonner la bonne transmission de l'influx au niveau de la synapse *via* la régulation de la formation des vésicules synaptiques (**Figure 11**) dans les neurones hippocampiques matures (Cerpa et al., 2008). Ici aussi, le type de ligand est important car si wnt-3a possède —dans une moindre mesure— la même capacité, wnt-5a et wnt-1 n'affectent pas le recyclage des vésicules présynaptiques. De même, des résultats d'électrophysiologie montrent qu'un double mutant Wnt-7a^{-/-} et Dvl1^{-/-} présente des défauts de relargage de neurotransmetteur du côté présynaptique (Ahmad-Annur et al., 2006). Si wnt-7a est un ligand qui permet très fréquemment de déclencher les voies dépendant de β -caténine, il semblerait tout de même que la régulation présynaptique se fasse sans transcription de gènes-cibles, ce qui sous-entend une prépondérance de la voie canonique divergente dans le contrôle de ces mécanismes (Ahmad-Annur et al., 2006; Bamji et al., 2003; Cerpa et al., 2008; Inestrosa and Arenas, 2010).

D'autres expériences d'électrophysiologie montrent aussi l'implication des voies wnt en post-synaptique ainsi que le rôle de wnt-5a dans l'activation des voies Ca²⁺-dépendantes



D'après Inestrosa and Arenas, 2010

Figure 11 : La voie wnt canonique régule les composants présynaptiques dans le système nerveux central.

Les ligands wnt sont relargués dans les terminaisons post-synaptiques et modulent le trafic vésiculaire du côté pré-synaptique, notamment l'endocytose et l'exocytose de neurotransmetteurs vers la fente synaptique.

et de la PCP sans implication de β -caténine (Fariás et al., 2009). Ces résultats suggèrent que wnt-5a régule l'assemblage et les fonctions postsynaptiques dans le cerveau mature. Wnt-7a joue cependant un rôle important dans ces fonctions en promouvant le recrutement de composants post-synaptiques et en permettant notamment l'agrégation de la protéine *scaffold* PSD95 (Ciani et al., 2011) nécessaire à la bonne transmission synaptique. Le niveau d'expression de PSD95 est réduit dans le cervelet des femelles MDD (Pourié et al., 2015), ce qui pourrait expliquer en partie les défauts structuraux précédemment décrits. Enfin, ces défauts structuraux sont très certainement à l'origine de déficits moteurs et cognitifs, avec par exemple des travaux montrant qu'une surexpression de GSK-3 β dans les épines dendritiques est à l'origine d'un mauvais apprentissage spatial évalué grâce à la piscine de Morris (Hernández et al., 2002).

2. Voies wnt et cervelet

Dans le cervelet, Wnt-7a permet le remodelage axonal et la différenciation synaptique au niveau des cellules granulaires comme expliqué précédemment (Lucas and Salinas, 1997). En effet, l'expression de la synapsine I y est régulée par wnt-7a *via* GSK-3 β (Lucas et al., 1998) ce qui démontre l'implication des voies canoniques dans ces processus. En revanche, les cellules de *Purkinje* présenteront quant à elles une expression de wnt-3a augmentée au cours du développement postnatal, au moment où les cellules granulaires commenceront à établir leurs contacts avec elles. Chez l'adulte, wnt-3a est toujours exprimée, mais uniquement dans ces cellules de *Purkinje* (Salinas et al., 1994).

De manière plus générale, les voies de signalisation wnt joueront un rôle essentiel dans la guidance axonale, le développement dendritique, l'assemblage des synapses et le contrôle de la transmission synaptique dans le SNC (Oliva et al., 2013).

3. Maintien de la voie wnt chez l'adulte

C'est au cours du développement que la neurogenèse est la plus importante. Il subsiste cependant à l'âge adulte deux zones contenant des progéniteurs neuronaux qui seront

capables de proliférer et de se différencier en neurones matures : la SVZ (zone sub-ventriculaire) située au niveau des ventricules latéraux du cortex et la SGZ (zone sub-granulaire) du gyrus denté de l'hippocampe. La voie wnt est impliquée dans la différenciation de ces progéniteurs, les ligands wnt étant décrits comme des facteurs extrinsèques régulant ce processus (Ming and Song, 2005; Nusse, 2008). Wnt-3 est exprimé dans les progéniteurs hippocampiques chez l'adulte et va permettre l'activation de la voie canonique et l'augmentation de la transcription de NeuroD1 notamment (Gao et al., 2009), un facteur neurogénique spécifiquement exprimé dans les cellules indifférenciées en cours de division dont la délétion aboutit à l'arrêt de la neurogenèse *in vivo* chez l'adulte (Kuwabara et al., 2009).

D. Voies wnt et donneurs de méthyles

Les voies de signalisation wnt sont très impliquées dans la carcinogenèse et on les retrouve dérégulées dans nombre de cancers comme le cancer du poumon, le cancer colorectal ou encore le médulloblastome (Roussel and Hatten, 2011; Sherwood, 2015). De la même manière, le métabolisme des monocarbones est lui aussi impliqué dans des pathologies similaires et le statut en folates est associé au risque de cancer colorectal par exemple (Mason and Tang, 2017). Le lien entre les voies wnt et le métabolisme des monocarbones réside aussi dans leur implication dans le contrôle de la prolifération, *via* l'expression de gènes-cibles pour la voie wnt (Crott et al., 2008) et *via* la synthèse d'ADN pour le cycle des folates.

Des travaux portant sur un modèle murin de cancer colorectal ont permis de mettre en évidence qu'une légère carence en folates causait des altérations de la voie wnt canonique tels qu'une diminution d'expression de la β -caténine, d'APC et de la cycline D1 (Liu et al., 2015). De manière intéressante, il a aussi été montré que des embryons de souris soumis à de fortes doses d'Hcy puis supplémentés en folates présentaient non seulement moins d'altérations développementales (NTD et anomalies cardiaques) que les contrôles, mais aussi une restauration de la voie wnt et de ses gènes-cibles, permettant ainsi de faire le lien entre carence en donneurs de méthyles, voie wnt et NTD (Han et al., 2009b).

IV. Les régulations épigénétiques

Pendant très longtemps, le seul contrôle de l'expression génique connu a été celui de la transcription, notamment *via* des facteurs permettant sa régulation (facteur de transcription). Ainsi, l'expression des gènes peut être régulée au niveau transcriptionnel afin de répondre à un stress environnemental par exemple. Cependant, le contrôle de la transcription seul ne suffit pas à expliquer « pourquoi toutes les cellules d'un organisme ne sont pas identiques ». Si c'est Morgan (*The theory of the Gene*, 1926) qui a mis cela en évidence, il faudra attendre 1942 pour que Waddington pose le terme « épigénèse » sur ce qui deviendra « l'épigénétique » 60 ans plus tard, et un des champs de la biologie les plus porteurs. A l'heure actuelle, la définition d'épigénétique a évolué et fait consensus malgré des dissonances concernant les systèmes mis en jeu. L'épigénétique est donc l'étude de changements –potentiellement- héritable dans l'expression des gènes ne mettant pas en jeu de modifications de la séquence de l'ADN, c'est-à-dire des changements de phénotypes sans modification du génotype (Sherbet, 1974). Elle permet d'expliquer notamment l'expression différentielle des gènes de manière spatio-temporelle au sein d'un individu. Au moins trois mécanismes permettent d'initier et de maintenir un changement épigénétique : la méthylation de l'ADN, la modification des protéines histones et les modifications d'expression des gènes *via* des ARNs non- codant.

A. La méthylation de l'ADN

1. Généralités

La première mise en évidence de méthylation au niveau de l'ADN date de 1898 par Ruppel qui découvre ce qu'il pense être un nouvel acide aminé, mais qui s'avérera, des années plus tard, être une cytosine méthylée. Ce n'est en effet qu'en 1948 que la présence de m⁵C (5-méthyl cytosine) au sein de l'ADN a été démontrée (**Figure 12** ; Wyatt, 1950). La méthylation de l'ADN est essentielle pour l'expression de gènes spécifiques en fonction du

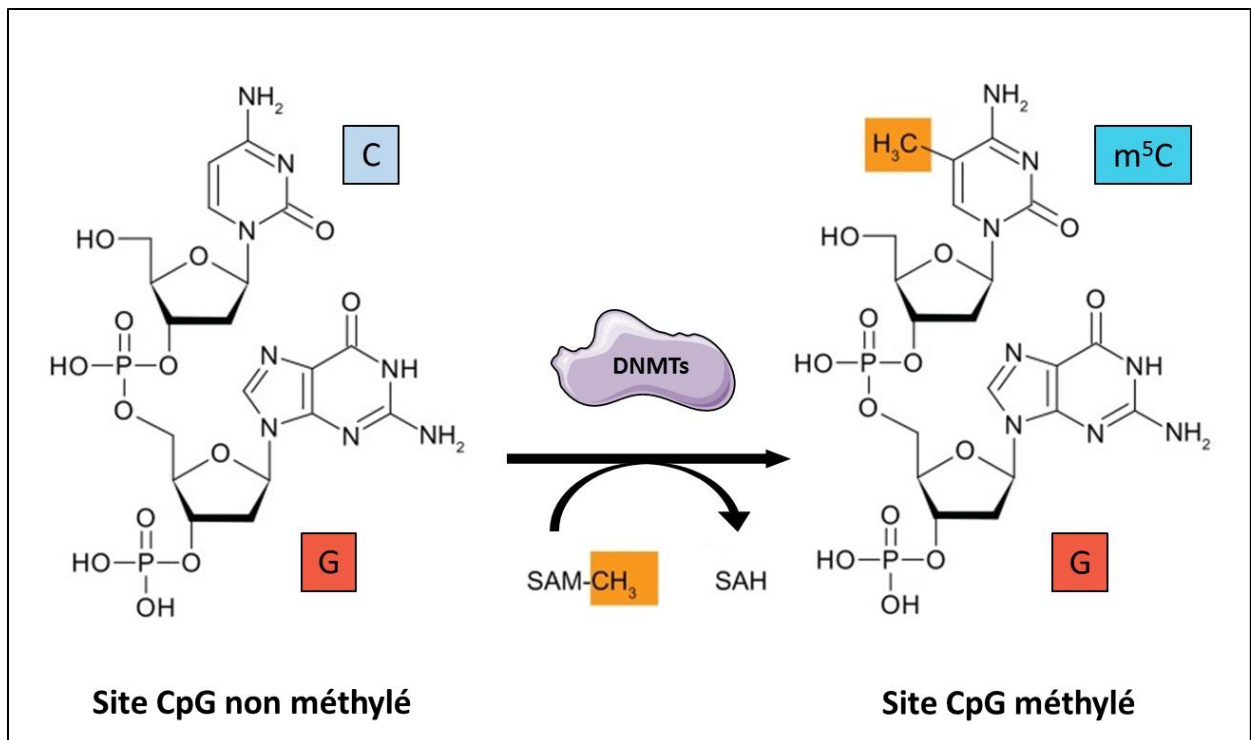


Figure 12 : Méthylation des cytosines par les DNMTs sur l'ADN génomique.

Sur l'ADN génomique, un groupement méthyle peut être ajouté sur les cytosines (C) pour former des 5-méthylcytosines (m⁵C). Les enzymes catalysant cette réaction sont les ADN-méthyltransférases (DNMTs) et elles utilisent le -CH₃ fourni par le donneur universel de groupements méthyles, la S-adenosylméthionine (SAM). Ce procédé est plus fréquent sur les cytosines suivies d'une guanine (5' CG 3'). De nombreux gènes au sein du génome présentent en amont des régions riches en CG que l'on appelle îlots CpG. La méthylation de ces régions entraîne généralement une répression de l'expression du gène en aval.

tissu ou du type cellulaire, pour le contrôle du mécanisme d’empreinte parentale, pour le *silencing* d’éléments rétroviraux ou encore l’inactivation du chromosome X.

2. Les sites et îlots CpG

Chez les mammifères, la méthylation de l’ADN a lieu majoritairement en position 5 des résidus cytosines (**Figure 12**) au niveau des dinucléotides Cytosine – Guanine (CG ou CpG si l’on représente le groupement phosphate séparant les deux nucléotides). En revanche, seuls certains sites CpG sont méthylés et on retrouve un profil de méthylation qui dépendra du tissu, du type cellulaire ou encore du stade du développement. De même, ces profils dépendront aussi de l’expression des méthylases responsables de leur formation.

Au sein du génome humain, on trouve environ 56 millions de sites CpG et ceux-ci sont majoritairement méthylés (entre 60 et 80 %) ce qui correspond statistiquement à environ 5 % du total de cytosines présentes dans le génome (Lister et al., 2009). Cependant, la répartition des CpG y est grandement inégale : ils sont depletés dans les séquences *inter* et *intra*-géniques et enrichis dans les séquences répétées. Au niveau de ces dernières, on va notamment retrouver des « îlots CpG » qui sont des portions d’ADN longues de plusieurs centaines de paires de bases (au moins 550 pb) et contenant une proportion de CpG bien plus élevée que dans le reste du génome (un ratio de CG observés / CG attendus $> 0,65$, soit en moyenne cinq fois plus que dans le reste du génome) (Takai and Jones, 2004).

On retrouve par ailleurs ces îlots CpG (CGIs) — d’une longueur moyenne de 1 kb — au sein des promoteurs. En effet, environ 70 % des gènes totaux présentent des CGIs dans leur promoteur (Saxonov et al., 2006). Ils sont présents à la fois dans les promoteurs des gènes de ménage, mais aussi dans ceux présentant une expression tissu-spécifique (Larsen et al., 1992). Il est communément admis que l’hyperméthylation du promoteur d’un gène va conduire à sa répression. Par conséquent, les gènes dit « actifs » d’un point de vue transcriptionnel présentent souvent un promoteur hypométhylé au niveau basal (Lister et al., 2009).

Il existe de plus un lien entre méthylation de l’ADN et interaction avec les protéines histones. En effet, les CGIs présentent globalement moins de nucléosomes que les autres

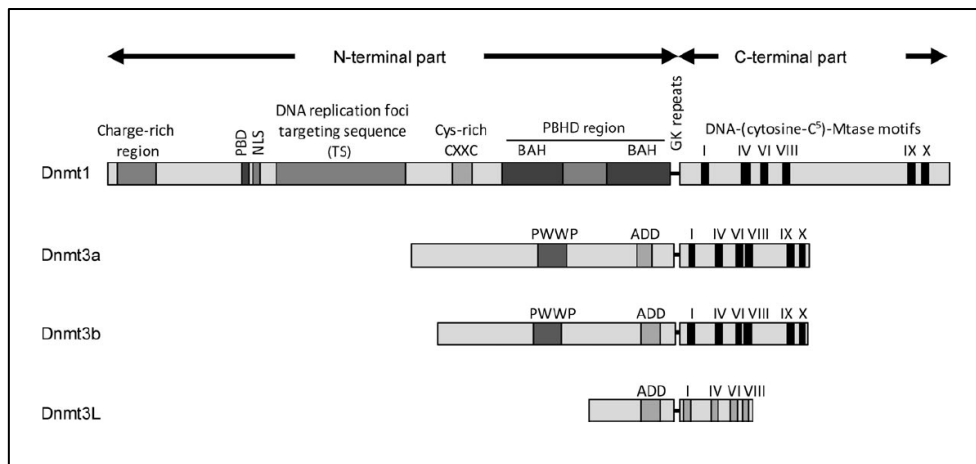
régions, ce qui leur confère une accessibilité plus grande aux facteurs de transcription (Choi, 2010). Ainsi, les promoteurs actifs présentent un niveau de méthylation faible et un nombre de nucléosomes faible lui aussi, les seuls présents portant généralement des marques favorisant la transcription ($H_3K_4Me_3$ et $H_3K_{36}Me_3$ par exemple) (Mikkelsen et al., 2007).

Enfin, il est nécessaire de préciser que si la méthylation de l'ADN est étudiée depuis de nombreuses décennies, il demeure cependant beaucoup d'incompréhensions. Par exemple, l'hypométhylation d'un promoteur peut parfois être corrélée avec son inhibition (Hargreaves et al., 2009) ainsi qu'à la présence de marques histones dites activatrices telles que $H_3K_4Me_2$ (Weber et al., 2007). On peut donc avoir des CGIs inactifs au sein de la chromatine active et l'expression des gènes concernés sera la conséquence d'une régulation fine de la balance méthylation du promoteur / état de la chromatine.

3. Les ADN-méthyltransférases

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout covalent d'un groupement méthyle en position 5 du cycle pyrimidine des cytosines (**Figure 12**). Cette réaction enzymatique est catalysée par les DNMTs (DNA méthyltransférases) qui sont des enzymes utilisant la SAM comme donneur de groupement méthyle. Chez les mammifères, on retrouve 3 DNMTs fonctionnelles : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b à la structure semblable (**Figure 13**) : un domaine C-terminal à activité catalytique et une partie N-terminale avec des domaines spécifiques qui sont propres à chaque enzyme (Jurkowska et al., 2011).

En effet, les 3 DNMTs n'ont pas la même fonction au sein de la cellule. DNMT1 est l'ADN méthyltransférase majeure, et elle possède une forte affinité pour l'ADN hémi-méthylé ainsi qu'un rôle de maintenance permettant de méthyle le brin-fils d'ADN lors de la réplication (Fatemi et al., 2001; Goyal et al., 2006). De ce fait, DNMT1 interagit avec la fourche de réplication lorsque la cellule entre en phase S et se fixe au niveau de l'ADN nouvellement synthétisé (Leonhardt et al., 1992). Elle va par la suite reproduire le motif de méthylation présent au niveau du brin parental sur le brin néo-synthétisé (Hermann et al., 2004). De la même manière, DNMT1 est capable de réparer les dommages de méthylation de l'ADN à l'inverse de DNMT3a et DNMT3b (Mortusewicz et al., 2005).



D'après Jurkowska et al., 2011

Figure 13 : Structure des ADN méthyltransférases retrouvées chez les mammifères.

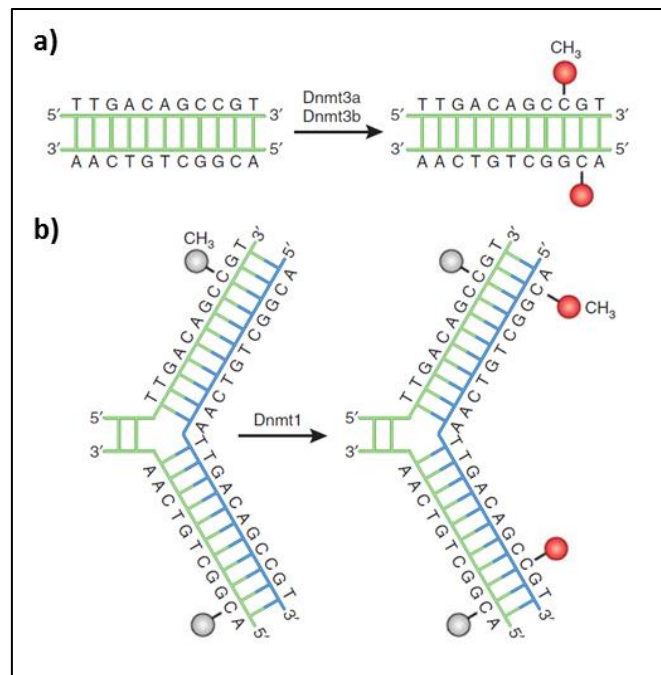
Les domaines régulateurs des ADN méthyltransférases (DNMTs) sont situés à l'extrémité N-terminale alors que l'extrémité C-terminale contient les domaines catalytiques conservés entre les différentes DNMTs (DNA-(cytosine-C⁵)-Mase motifs). A l'inverse des domaines catalytiques, la partie N-terminale de Dnmt1 et Dnmt3a/3b diffère grandement. Le domaine ADD des DNMT3 permet des interactions de type protéine-protéine, notamment avec des facteurs de transcription, des histones déacétylases et certains résidus de la queue de l'histone H₃. Le domaine PWWP de Dnmt3a et 3b est quant à lui un domaine d'interaction avec la chromatine.

Concernant Dnmt1, le domaine *Charge-rich region* est impliqué dans la stabilité de l'enzyme alors que PBD (PCNA Binding Domain) permet l'interaction avec PCNA, une protéine augmentant la processivité des ADN-polymérase. On retrouve plusieurs séquences de localisation nucléaire (NLS) ainsi que des domaines d'interaction à la chromatine (TS, *Targeting Sequence* ; CXXC) et des domaines d'interaction protéine-protéine dans la région PBHD (*polybromohomology domain*).

DNMT3a et DNMT3b sont quant à elles fortement exprimées au cours du développement au stade blastocyste, et durant la formation de la lignée germinale où les nouveaux profils de méthylation de l'ADN se mettent en place (Li, 2002). Elles n'ont pas d'affinité particulière pour l'ADN hémi-méthylé comme c'est le cas pour DNMT1 (Yokochi and Robertson, 2002) et c'est la raison pour laquelle on parle de méthylases *de novo*, pouvant introduire de nouveaux profils de méthylation de l'ADN (**Figure 14**). Elles vont cibler préférentiellement les sites CpG et dans une moindre mesure les CpA et CpT (Aoki et al., 2001). Si leur activité est identique et parfois complémentaire, on retrouvera un profil d'expression différent entre ces deux ADN méthyltransférases. DNMT3a est exprimée de manière ubiquitaire avec cependant une spécialisation dans l'établissement de la méthylation dans la lignée germinale ainsi que dans les neurones (Chédin, 2011) alors que DNMT3b est faiblement exprimée dans la majorité des tissus différenciés à l'exception du testicule, de la thyroïde et de la moelle osseuse (Xie et al., 1999). En revanche, un Knock-Out (KO) DNMT3a^{-/-} entraînera une mort 4 semaines après la naissance chez la souris, alors qu'un KO DNMT3b^{-/-} conduira à une létalité embryonnaire, ce qui démontre le rôle précoce que joue DNMT3b au cours du développement (Okano et al., 1999).

4. Méthylation de l'ADN et carence précoce en donneurs de méthyles

Des résultats précédents du laboratoire ont permis de montrer l'impact d'une carence précoce sur la méthylation globale de l'ADN. Ainsi au cours du développement embryonnaire à E20, cette méthylation est réduite dans les tissus cérébraux chez les ratons carencés et il en est de même sur un modèle cellulaire de progéniteurs hippocampiques carencés (Kerek et al., 2013). On retrouve ces altérations dans les bulbes olfactifs, où l'on observe en revanche un effet plus important de la carence chez les femelles qui présentent une diminution globale du taux de méthylation de l'ADN, alors qu'aucune variation n'est observée chez les mâles à J₂₁ (El Hajj Chehadeh et al., 2014a). Il est intéressant de noter qu'une supplémentation tardive en folates permet de récupérer le niveau normal de méthylation globale de l'ADN dans les embryons E20 carencés (Geoffroy et al., 2016).



D'après Moore et al., 2013

Figure 14 : La méthylation de l'ADN

Les ADN-méthyltransférase (Dnmts) catalysent le transfert d'un groupement méthyle depuis la S-adénosyl-méthionine (SAM) vers le 5^{ème} carbone d'un résidu cytosine afin de former une 5-méthylcytosine (m⁵C).

a) Dnmt3a et Dnmt3b permettent la méthylation de l'ADN *de novo* et transfèrent le groupement méthyle (en rouge) sur l'ADN nu non-méthylé.

b) Dnmt1 est appelée l'ADN méthyltransférase de maintenance car elle permet de conserver le motif de méthylation de l'ADN au cours de la réplication. Au cours de la réplication semi-conservative, le brin d'ADN parental garde son motif de méthylation (en gris). Dnmt1 permet de répliquer fidèlement le motif de méthylation (en rouge) du brin parental (en vert) sur le brin fils néo-synthétisé (en bleu).

Le méthylome des rats J₂₁ a aussi été réalisé dans le foie. Les résultats ont permis de mettre en évidence une méthylation différentielle du promoteur d'environ 7% du génome par rapport aux contrôles. Un grand nombre de ces gènes est impliqué dans des fonctions hépatiques mais aussi mitochondriales (Chen et al., 2015). D'autres études ont également montré une relation entre statut en folates et méthylation de l'ADN. Ainsi, de manière ciblée, certains *loci* soumis à empreinte tels *IGF2/H19*, présentent une augmentation de la méthylation chez les mères ayant été supplémentées en période périconceptionnelle (Tserga et al., 2017)

Des apports excessifs en acide folique ont eux aussi un effet sur le méthylome. Des changements de méthylation (hypo- et hyperméthylation) des sites CpG dans le promoteur de gènes impliqués dans le développement ont par exemple été retrouvés dans les hémisphères cérébraux de rats issus de mères supplémentées pendant la gestation, avec des doses d'acide folique dix fois supérieures aux recommandations (Barua et al., 2014). Des résultats similaires ont été observés dans le cervelet avec des méthylations différentielles des gènes impliqués dans des fonctions neuronales et dans la physiopathologie de l'autisme (Barua et al., 2015). Au-delà des changements de méthylation, la transcription et donc l'expression de ces gènes sont aussi altérées chez les rats de manière dépendante du sexe avec des mâles et femelles qui sont autant touchés, mais ne présentent pas les mêmes profils de méthylation (Barua et al., 2016).

Une supplémentation trop importante en folates pendant la grossesse peut aussi avoir des effets similaires à une carence avec des retards de croissance embryonnaire, des altérations de la mémoire à court terme et une diminution d'expression et d'activité de l'enzyme MTHFR dans le foie (Bahous et al., 2017). Ainsi, plus que la simple carence, c'est le statut en folate qui importe réellement, et la fortification en acide folique semble aussi reliée à une augmentation de l'incidence de cancer colorectal (Ami et al., 2016), ce qui pose la question de la supplémentation systématique en période périconceptionnelle.

B. Les modifications des protéines histones

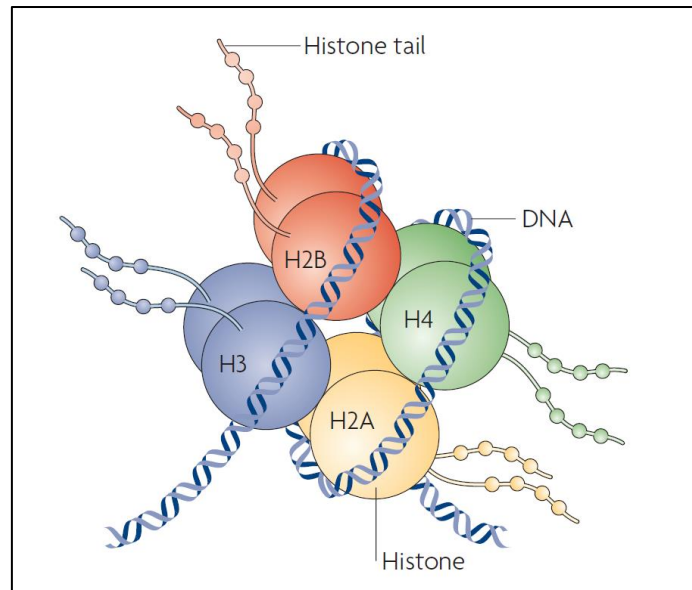
La chromatine n'est pas inerte au sein de la cellule. Au contraire, il s'agit d'une structure extrêmement dynamique permettant à la fois une protection de l'ADN et une réponse aux stimuli extérieurs *via* des activations ou répressions transcriptionnelles par exemple. La modification des protéines histones est un des principaux dispositifs permettant ou non l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription. Les régulations de ces modifications sont donc elles aussi extrêmement dynamiques au cours de la vie d'un individu et participent à la mise en place de l'épigénome. Nous allons ici décrire la structure et le fonctionnement de ces protéines histones même s'il reste encore beaucoup à découvrir aujourd'hui afin de comprendre parfaitement ces mécanismes.

1. Structure des nucléosomes

Les histones jouent un rôle structural et fonctionnel essentiel dans la transition entre l'état actif et l'état inactif de la chromatine. Elles ont un haut degré de conservation au sein du Vivant et permettent la régulation de l'expression des gènes. Les cellules eucaryotes stockent leur information génétique au sein de molécules d'ADN longues de plus de 1 m. Il est donc nécessaire qu'elles soient compactées afin de tenir dans les cellules. C'est le rôle premier des histones qui s'associent en un complexe protéique octamérique (nucléosome) qui, en interaction avec l'ADN et d'autres facteurs protéiques, forment la chromatine.

Un nucléosome, qui est donc le premier niveau d'organisation de la chromatine, est composé de deux copies de chaque histone : H₂A, H₂B, H₃ et H₄ (**Figure 15**) assemblées en noyau (*core*) octamérique ainsi que d'environ 147 pb d'ADN enroulées autour (Tsankova et al., 2007). Deux nucléosomes sont séparés par un *linker* d'ADN de taille variable associé avec une molécule d'histone H₁. Nous ne parlerons pas ici des niveaux d'empaquetage supplémentaires permettant d'aboutir à la structure finale de la chromatine.

Chaque histone possède de plus un domaine N-terminal (queue de l'histone ou *histone tail*) qui sera la cible de modifications post-traductionnelles qui possèdent un rôle très



D'après Tsankova et al., 2007

Figure 15 : Représentation d'un nucléosome.

L'ADN (~147 pb) est enroulé autour d'un octamère d'histones composé de deux copies de chaque histone H₂A, H₂B, H₃ et H₄. L'extrémité N-terminale des histones formant leur queue (*histone tail*) est orientée vers l'extérieur et subira des modifications post-traductionnelles qui impacteront la structure de la chromatine.

important dans la stabilité de l'octamère (Brower-Toland et al., 2005) et donc dans la structure globale de la chromatine.

La composition des nucléosomes mais aussi leur structure et leur localisation sur l'ADN peut être modifiée par des complexes de remodelage de la chromatine qui vont introduire des modifications post-traductionnelles au niveau des *histone tails*. Cela conduira à des changements locaux de structure de la chromatine (**Figure 16**) et autorisera ou interdira l'accès à l'ADN à des facteurs de transcription par exemple (Peterson and Laniel, 2004).

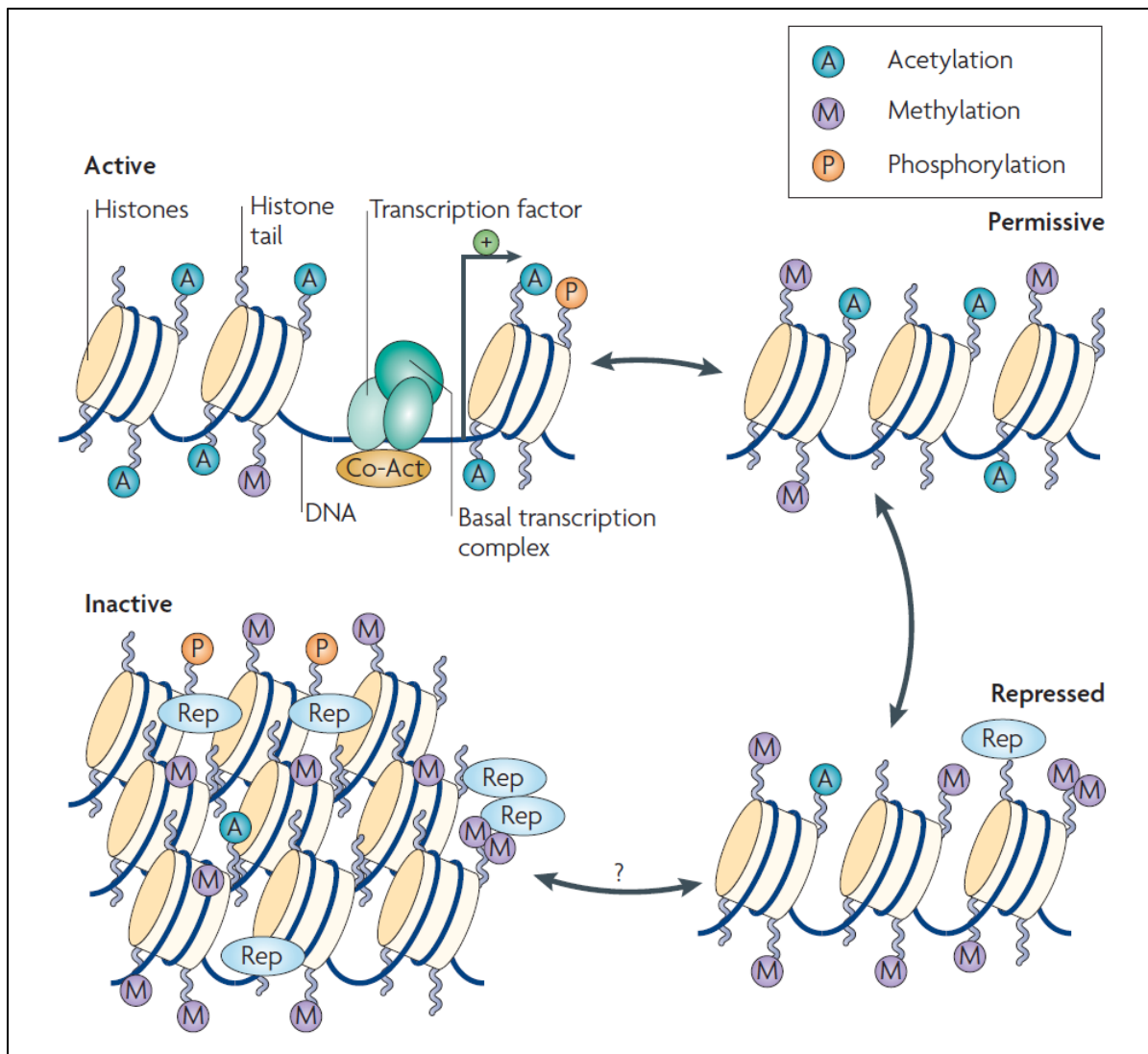
2. Modifications post-traductionnelles des histones

Les *histone tails* peuvent subir de nombreux types de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitinylation, la sumoylation, la biotinylation, la phosphorylation, l'acétylation ou encore la méthylation —ces trois dernières étant les plus représentées et les plus étudiées (**Figure 16**). Ces modifications auront un impact sur l'empaquetage de l'ADN et donc sur l'accès ou non à la chromatine.

Les trois types de modifications post-traductionnelles cités plus haut ont notamment été les plus étudiées au cours des dernières années, ce qui a permis d'améliorer grandement la compréhension de ce mécanisme de régulation épigénétique qui a été surnommé le « code des histones ». Ainsi, chaque modification d'un résidu sur une histone donnée aura un impact spécifique sur l'activité transcriptionnelle (Peterson and Laniel, 2004).

a. Acétylations

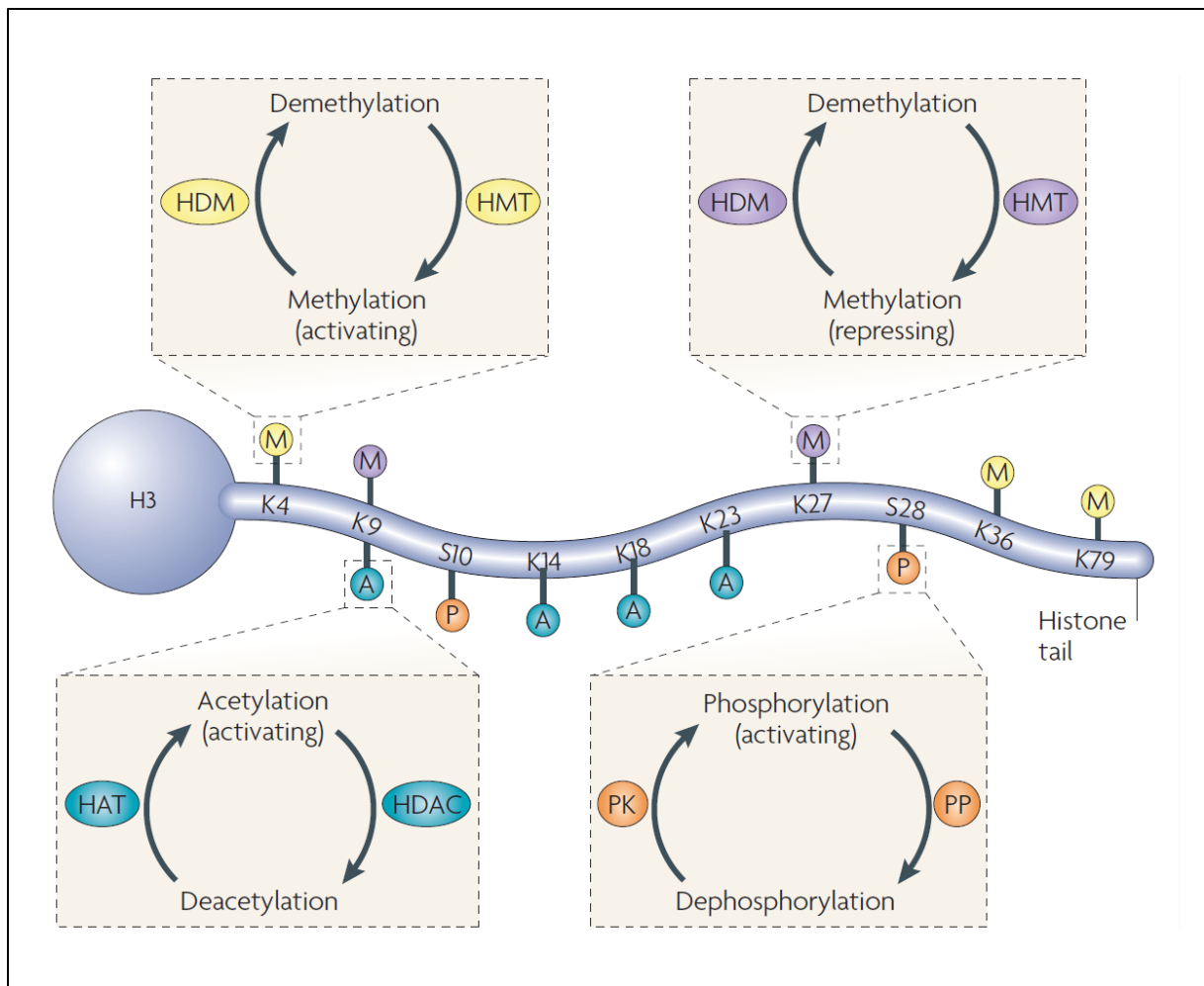
L'acétylation des histones est étudiée depuis les années 1960 et prend place au niveau des résidus Lysine (K). Comme toutes les modifications post-traductionnelles au sein des nucléosomes, l'équilibre entre acétylation —par les histone acétyl-transférases (HATs)— et déacétylation —par les histones déacétylases (HDACs) — est très dynamique (**Figure 17** ; Allfrey et al., 1964). Biochimiquement, les groupements acétyles permettent de neutraliser les charges positives des lysines et de ce fait, de déstabiliser les interactions avec l'ADN qui lui, est chargé négativement. Cela favorisera donc la plupart du temps l'accès de l'ADN aux



(Tsankova et al., 2007)

Figure 16 : Structure de la chromatine.

La chromatine est représentée sous deux états : ouverte (ou active) aussi appelée euchromatine (en haut à gauche), dans lequel l'acétylation (A) des histones est associée à leur ouverture et à l'interaction avec des facteurs de transcription et leurs co-activateurs ; ou condensée (inactive, en bas à gauche) aussi appelée hétérochromatine, dans lequel l'activité des gènes est réprimée. En réalité la structuration de la chromatine est un processus extrêmement dynamique où plusieurs états s'alternent en permanence : actif, permissif (en haut à droite), réprimé (en bas à droite) et inactif. Les acétylations, les méthylations (M) ou les phosphorylations (P) des histones au niveau de leur queue N-terminale, tout comme la fixation de facteurs de transcription et leurs co-activateurs (Co-Act) ou répresseurs modulent en permanence l'état transcriptionnel du nucléosome.



D'après Tsankova et al., 2007

Figure 17 : Résumé des modifications post-traductionnelles de H₃.

H₃ peut être modifiée de manière post-traductionnelle par acétylation (A), méthylation (M) et phosphorylation (P) sur plusieurs résidus. Les phosphorylations et acétylations les plus communes portent sur S₁₀ et K₁₄. L'acétylation est catalysée par des histone-acétyltransférases (HAT) et l'activité inverse par les histone-déacétylases (HDACs). La méthylation (pouvant être activatrice ou inhibitrice) est catalysée par des histone-méthyltransférases (HMTs) et l'activité inverse par des histone-déméthylases (HDMs). Enfin, la phosphorylation post-traductionnelle des histones est réalisée par des kinases (PK) et la déphosphorylation par des phosphatases (PP).

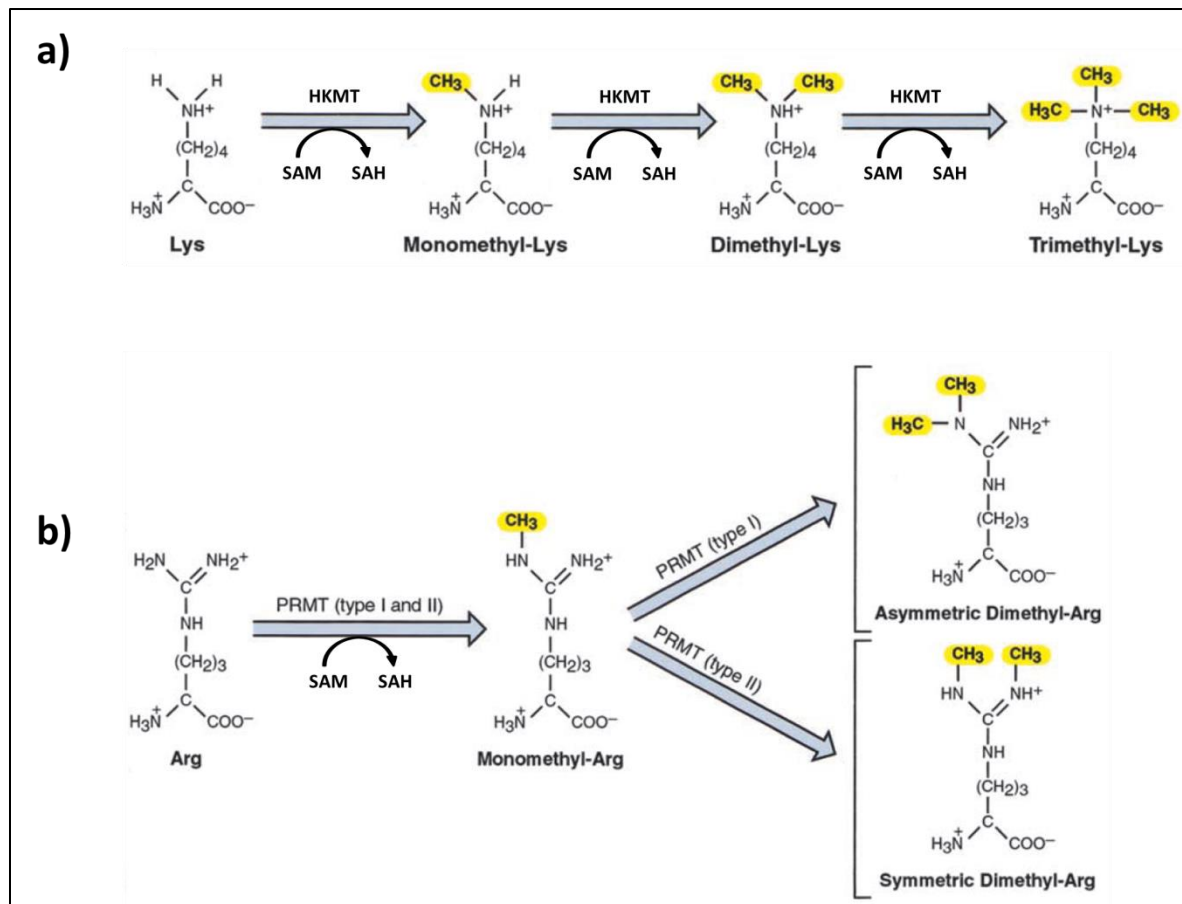
K : résidu lysine ; S : résidu sérine.

facteurs de transcription (**Figure 16** ; Yang and Seto, 2007). Parmi les acétylations les plus étudiées, nous pouvons citer sur H₃ : H₃K₄Ac, H₃K₉Ac, H₃K₁₄Ac et H₃K₃₆Ac, qui possèdent toutes un effet activateur. Il est important de noter que ces modifications peuvent être apportées par différentes HATs (**tableau code histones annexe 1**), ce qui permettra une régulation fine de la transcription en réponse à un stimulus précis. Sur H₄, les acétylations les plus connues sont H₄K₈Ac et H₄K₁₆Ac qui entraînent elles aussi une activation de la transcription.

b. Méthylation

La méthylation des protéines histones est la modification post-traductionnelle qui a été la plus étudiée au cours des dernières décennies. On va la retrouver la plupart du temps au niveau des chaînes latérales des résidus lysines (K) et arginines (R) des histones (**Figure 17**). La différence majeure par rapport à l'acétylation est que la méthylation n'altère pas la charge des histones (Ng et al., 2009). Ainsi, il est beaucoup plus difficile de prédire l'impact d'une méthylation sur la transcription. Il existe de plus un niveau de complexité supplémentaire à prendre en compte qui porte sur le fait que les lysines peuvent être « mono », « di » ou « tri »-méthylées alors que les arginines peuvent être « mono » ou « di »-méthylées de manière symétrique ou asymétrique (**Figure 18** ; Bedford and Clarke, 2009).

Les enzymes responsables de la méthylation des histones seront différentes selon le résidu qui va être modifié. Les lysine méthyltransférases (HKMT) utilisent la SAM comme donneur de méthyle afin d'ajouter la plupart du temps un ou plusieurs groupement -CH₃ sur l'*histone tail* (Rea et al., 2000). De nombreux membres de cette famille d'enzymes sont aujourd'hui connus et chacun va agir de manière spécifique, c'est-à-dire dans une condition donnée et sur un résidu lysine bien précis. Par exemple, SET7/9 cible H₃K₄ en le monométhylant (Xiao et al., 2003) alors que DIM5 va cibler spécifiquement H₃K₉ et le triméthyliser (Tamaru et al., 2003).



Modifié d'après (Zhang and Reinberg, 2001)

Figure 18 : Méthylation des résidus lysines et arginines au sein des histones.

a) Structure moléculaire de la lysine et de sa mono-, di- et tri-méthylation. Ces réactions enzymatiques sont catalysées par des histone-lysine-méthyltransférases (HKMT)

b) Structure moléculaire de l'arginine et de sa mono- et di-méthylation. Les protéines arginine-méthyltransférases (PRMT) de type I et II catalysent la diméthylation asymétrique et symétrique respectivement.

La déméthylation de ces résidus lysines n'a été mise en évidence que récemment (Shi et al., 2004) *via* la découverte de la déméthylase spécifique des lysines 1 (LSD1), capable de mono et di-déméthylation.

Enfin, concernant les arginines, il existe plusieurs classes d'enzymes possédant l'activité catalytique nécessaire à leur méthylation au sein des histones, on parle d'arginine méthyltransférases (PRMTs) (Wolf, 2009). Chaque enzyme appartenant à cette famille aura, elle aussi une cible bien spécifique. Cependant, les enzymes permettant leur déméthylation sont encore très peu décrites et un faible nombre d'arginine déméthylases ont à ce jour été mises en évidence (Chang et al., 2007).

c. Phosphorylation

Concernant les phosphorylations, on aura cette fois plusieurs résidus impliqués : les sérines (S), les thréonines (T) et les tyrosines (Y) (**Figure 17** ; Bannister and Kouzarides, 2011). Les protéines qui vont les modifier seront des kinases et des phosphatases, et elles ajouteront ou retireront respectivement des groupements phosphates sur ces acides aminés. De ce fait, une phosphorylation ajoutera des charges négatives sur les histones, ce qui va diminuer leurs interactions avec l'ADN et entraînera fréquemment une activation de la transcription ($H_3S_{10}P$ et $H_3S_{28}P$ pour les plus étudiées). Il existe cependant des contre-exemples, notamment concernant des phosphorylations (**tableau code histones annexe 1**) que l'on va retrouver sur H_2A telles que H_2AS_1P et $H_2AT_{120}P$.

3. Modifications des histones et carence précoce en donneurs de méthyles.

Au laboratoire, des travaux sur le modèle MDD ont porté sur l'étude des modifications des marques histones dans le foie en réponse à la carence (Pellanda et al., 2012). Les résultats ont montré des diminutions de $H_4K_{20}Me_3$ et de H_4K_{16Ac} chez les MDD à E20 par rapport aux contrôles. Une étude menée aux Etats-Unis a montré l'impact d'une fortification en acide folique sur la marque $H_3K_9Me_3$ au sein d'une population de patientes atteintes d'un cancer du col de l'utérus (Piyathilake et al., 2010). Celle-ci augmente en

fonction du grade de la tumeur. De manière intéressante, ce travail montre aussi l'effet de la fortification en acide folique sur cette marque histone. La fortification aurait un impact protecteur sur l'initiation tumorale mais à l'inverse un effet délétère dans les tumeurs avancées.

Une équipe américaine a étudié en détails l'impact de la carence sur les dérégulations épigénétiques et notamment les marques des histones, au niveau hépatique. Ainsi, ils ont montré dans un modèle murin d'hépatocarcinogenèse induite par une carence en méthyles, une augmentation de $H_3K_9Me_3$ et par opposition, une diminution de $H_4K_{20}Me_3$, corrélées à une augmentation et une diminution respectivement, des histone-méthyltransférases associées (Pogribny et al., 2006). Ils ont de plus obtenu d'autres résultats montrant des altérations de plusieurs autres marques histones et des enzymes associées sur le même modèle animal (Pogribny et al., 2007). Ainsi, H_3K_9Ac et $H_4K_{20}Me_3$ sont diminuées dans le foie en réponse à la carence en donneurs de méthyles. A l'inverse, $H_4K_{16}Ac$ est quant à elle augmentée. Ces altérations se font de manière progressive, avec par exemple une triméthylation de H_3K_9 qui est plus faible à 9 semaines qu'à 36 semaines. Ces résultats démontrent les impacts d'une carence en folates prolongée, sur l'épigénome. De même, au sein de ce modèle de carence prolongée pendant 36 semaines, les marques $H_3K_9Me_3$ et $H_3K_{27}Me_3$ diminuent progressivement dans le cerveau alors que dans le même temps, $H_4K_{20}Me_3$ augmente (Pogribny et al., 2008). Ainsi, les modifications épigénomiques des marques histones sont très difficilement prévisibles et ne sont pas modifiées de la même manière d'un organe à un autre. Il est cependant certain que la carence en donneur de méthyle les influence, d'une manière que nous ne parvenons pas encore totalement à décrypter.

C. Les ARNs non-codants

Bien que l'épigénétique est un pan de la biologie de plus en plus étudié depuis plusieurs décennies, les mécanismes pouvant être considérés comme appartenant à ce domaine restent très discutés au sein de la communauté scientifique. Si la méthylation de l'ADN et

les modifications des marques histones ne font aucun débat, ce n'est néanmoins pas le cas de la régulation de l'expression génique *via* des ARNs ne codant pas pour des protéines.

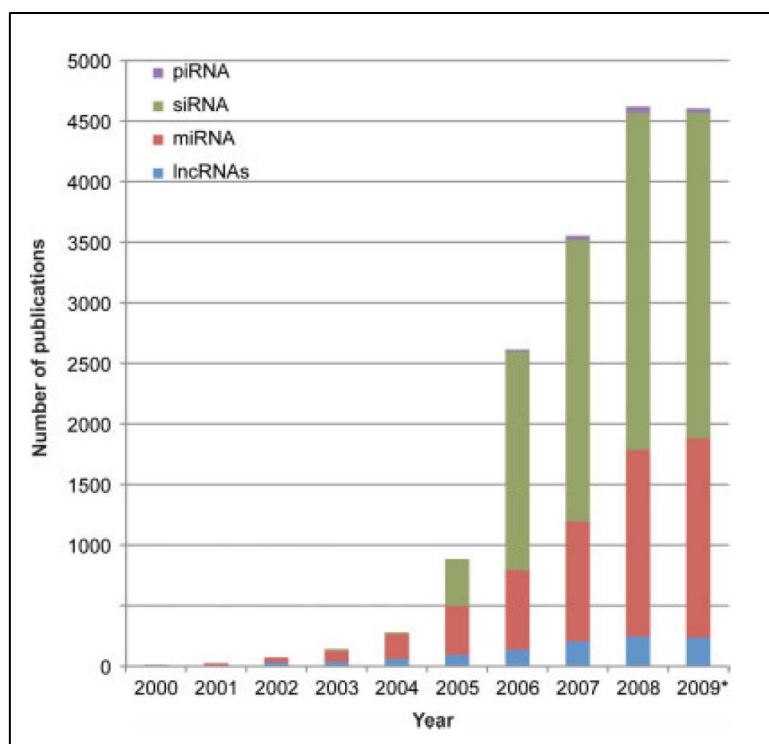
Ces ARNs non-codants (ncARNs) concernent finalement la majorité des transcrits chez l'être humain et peuvent être de grande taille (> 200 pb) –et on parlera alors de longs ARNs non-codants (lncARNs)– ou de petite taille (< 200 pb). Leur origine génomique peut différer tout comme leur mécanisme d'action. Ces ncARNs permettent une régulation spatio-temporelle fine de l'expression génique et peuvent donc être considérés comme faisant partie des régulations épigénétiques. Enfin, nous pouvons souligner un niveau de complexité supplémentaire du fait qu'ils peuvent interférer avec les mécanismes « classiques » de régulations épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Ces ncARNs sont de plus en étudiés et de nouvelles classes sont décrites régulièrement (**Figure 19** ; Taft et al., 2010).

1. Les longs ARNs non-codants

Les lncARNs ne sont pas réellement une famille d'ARNs à proprement dit mais simplement une classification sur critère de taille. Ainsi, de nombreux types de lncARNs possédant des mécanismes d'action différents vont être inclus dans ce groupe (**Figure 20**). D'une part, il a été démontré que différentes classes de lncARNs sont transcrits à partir de régions situées en amont de promoteurs (PROMPTs), d'*enhancers* (eARNs), de régions intergéniques (lincARNs) ou encore à partir du brin complémentaire de gènes codant des protéines (NATs). D'autre part, de nombreux lncARNs sont générés à partir de longs transcrits primaires *via* des mécanismes non communs.

2. Les petits ARNs non-codants : exemple des microARNs

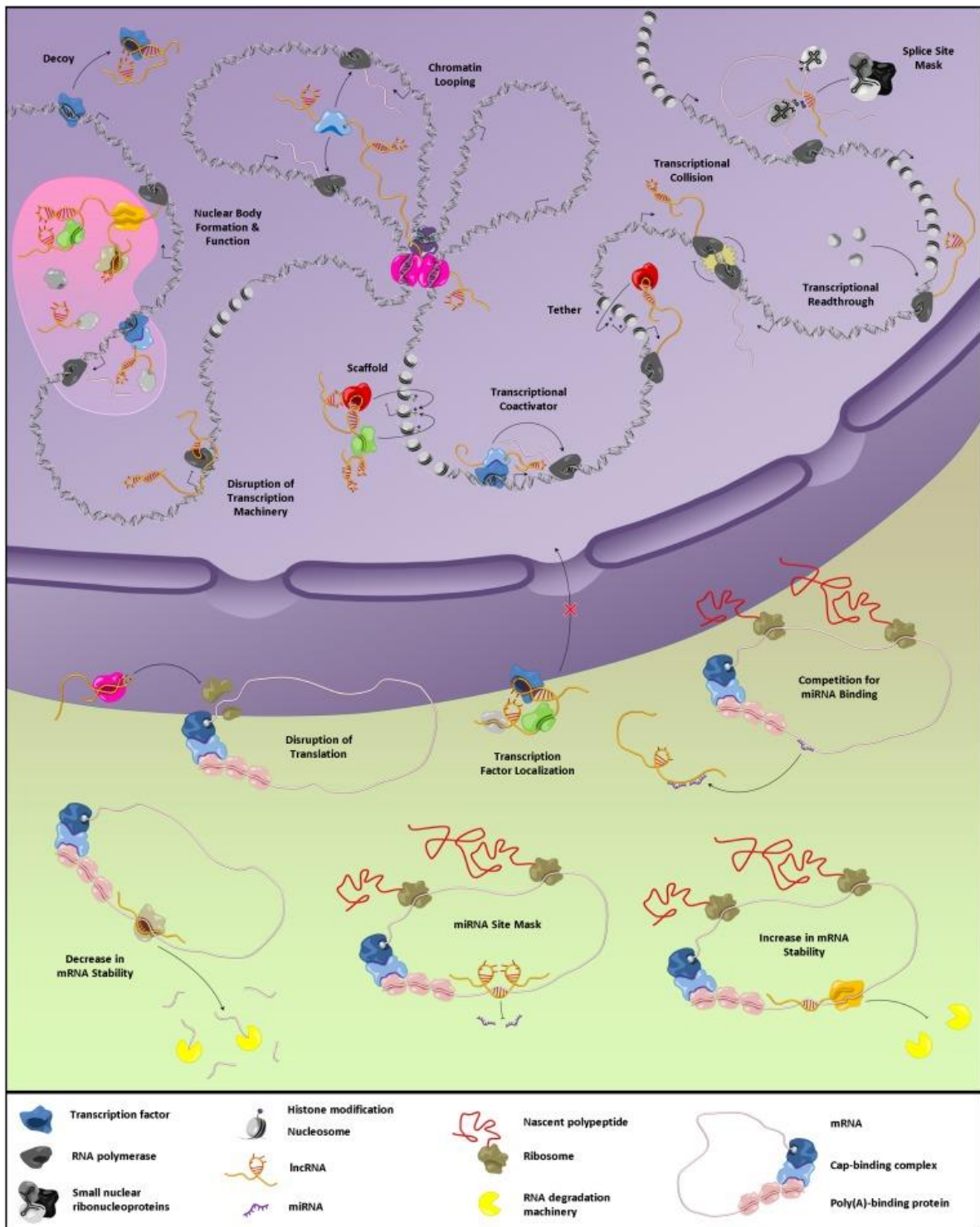
De la même manière que pour les lncARNs, il existe de nombreuses classes de petits ARNs non-codants (< 200 pb). Cependant, au cours de ces dernières années ces petits ncARNs ont été beaucoup étudiés et largement classifiés en fonction de leur origine génomique et de leur mécanisme d'action (Peschansky and Wahlestedt, 2014). Les petits



D'après Taft et al., 2010

Figure 19 : Augmentation du nombre de publications par année sur les ARNs non-codants au cours des années 2010.

Le nombre de publications indexées sur PubMed dont le titre, le résumé ou les mots-clés correspondent à au moins une classe d'ARN non-codant est représenté. Les termes utilisés pour la recherche sont : piRNA, PIWI RNA, PIWI-associated RNA, PIWI-interacting RNA, siRNA, small interfering RNA, endo-siRNA, endogenous siRNA, miRNA, microRNA, non-coding RNA, non-coding RNA, non-protein-coding RNA, ncRNA and lincRNA.



D'après Kung et al., 2013

Figure 20 : Fonctions et mécanismes d'actions des longs ARNs non-codants.

La nature et la fonction des longs ARNs non-codants (lncARNs) sont très variées et leur action peut se faire aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Ils permettent le recrutement, l'attachement et le soutien de protéines impliquées dans la plupart des processus biologiques et notamment de facteurs régulant la structure de la chromatine. Ils jouent aussi un rôle dans la

transcription en co-régulant des facteurs de transcription, en les séquestrant, ou encore en inhibant l'ARN polymérase II. Ils sont aussi impliqués dans la mise en place de complexes ribonucléoprotéiques (RNPs) ainsi que la formation et structuration de certains compartiments cellulaires comme les paraspeckles.

Au niveau cytoplasmique, on les retrouve dans des processus de régulation post-transcriptionnelle impliquant la maturation, la stabilité et la traduction des ARNm. Les lncARNs peuvent par ailleurs posséder plusieurs mécanismes d'action ce qui rend leur étude et leur catégorisation encore plus difficile.

ncARNS possèdent eux aussi des rôles divers dans les processus cellulaires-clés et sont notamment impliqués dans la régulation de l'expression génique (Schonrock et al., 2012). Leur expression est finement régulée et permet une réponse rapide à un stress environnemental par exemple. Nous allons ici détailler l'exemple des micro-ARNs (miARNs) qui permettent d'inhiber l'expression de transcrits ou d'empêcher leur traduction en interagissant avec des séquences plus ou moins spécifiques que l'on retrouve très souvent dans les régions 3' non traduites (3'UTR) de leurs cibles.

a. Généralités sur les micro-ARNs

Les micro-ARNs (miARNs) sont une classe d'ARNs non-codants de petite taille (de 21 à 24 nucléotides en moyenne) découverts dans les années 1990, caractérisés au début des années 2000 (Lagos-Quintana et al., 2001) et dont l'étude et la compréhension n'a cessé d'augmenter depuis (**Figure 19**). De par leur taille et leur séquence nucléotidique, ils permettent d'inhiber l'expression d'un gène de manière post-transcriptionnelle. En effet, suite à l'appariement avec leur(s) ARN-messagers (ARNm) cible(s), ils entraîneront leur dégradation, ou l'inhibition de leur traduction, ce qui conduira à la diminution d'expression de la protéine correspondante (Fabian et al., 2010). Un miARN peut de cette manière réguler un grand nombre de transcrits, ce qui fait que de subtiles variations du niveau d'expression d'un miARN peuvent avoir d'importantes répercussions au niveau cellulaire. De fait, les miARNs sont impliqués dans la plupart des processus cellulaires et physiologiques et leurs dérégulations sont la cause ou la conséquence de nombreux processus pathologiques. Ils sont prédits comme régulant 60 % de la totalité des gènes codants du génome (Friedman et al., 2009).

b. Biogenèse des micro-ARNs

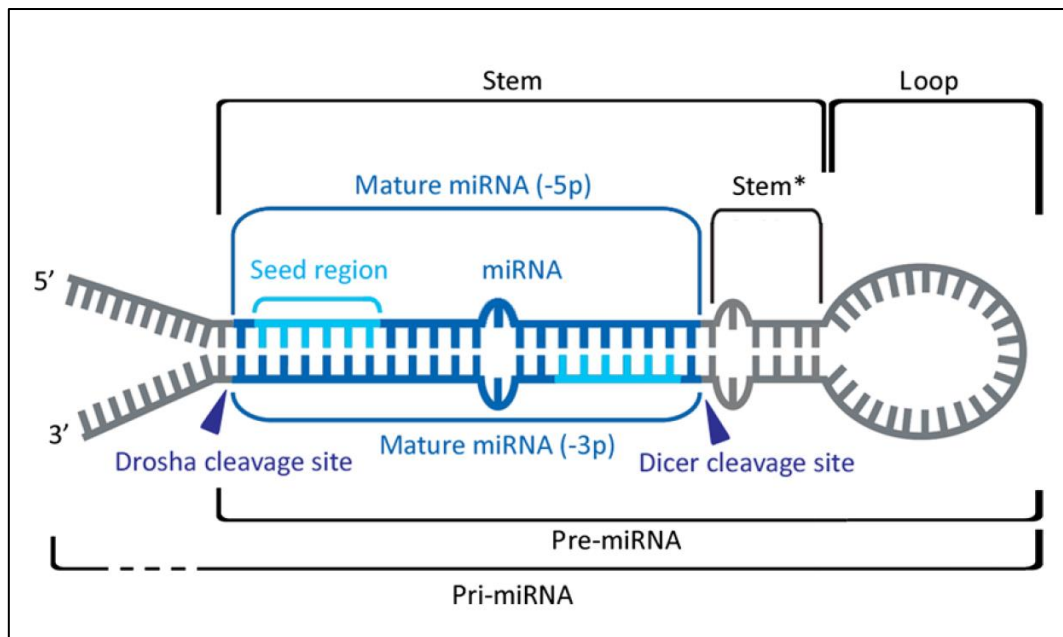
Les miARNs sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II (Lee et al., 2004), même si une minorité peut l'être par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006). Ils peuvent notamment être localisés dans les introns ou les exons d'unités transcriptionnelles, et

également dans des régions intergéniques (Altuvia et al., 2005). Les transcrits primaires obtenus sont appelés pri-miARN (pri-micro ARN) et contiennent une structure tige-boucle de 33 pb ainsi qu'une « boucle terminale » flanquée de séquences simple-brin de plusieurs centaines —voire milliers— de bases (**Figure 21**). Ces pri-miARNs possèdent généralement une coiffe au niveau de leur extrémité 5' ainsi qu'une région polyadénylée en 3' (Cai et al., 2004).

Le pri-miARN va ensuite être pris en charge (**Figure 22**) par un complexe (appelé microprocesseur) composé de Drosha, une ribonucléase de type III, et de son partenaire DGCR8 (Di George syndrome critical region 8) qui reconnaît la structure double brin spécifique du pri-miARN et permet de stabiliser le complexe (Han et al., 2009a). Drosha va cliver le pri-miARN de manière très précise 11 nucléotides en amont de la structure en épingle (Blaszczyk et al., 2001). Une autre fonction de DGCR8 est de diriger le clivage du pri-miARN par Drosha afin d'obtenir un pré-miARN possédant une structure tige-boucle d'environ 70 à 100 nucléotides (Zeng and Cullen, 2003).

Il existe en parallèle un deuxième mode de biosynthèse des miARNs qui a été découvert plus récemment, il s'agit de la voie des miRtrons (Berezikov et al., 2007). Des séquences de pré-miARNs sont en effet présentes dans la plupart des introns au sein du génome et peuvent être maturées en pré-miARNs de manière indépendante du microprocesseur (**Figure 22**).

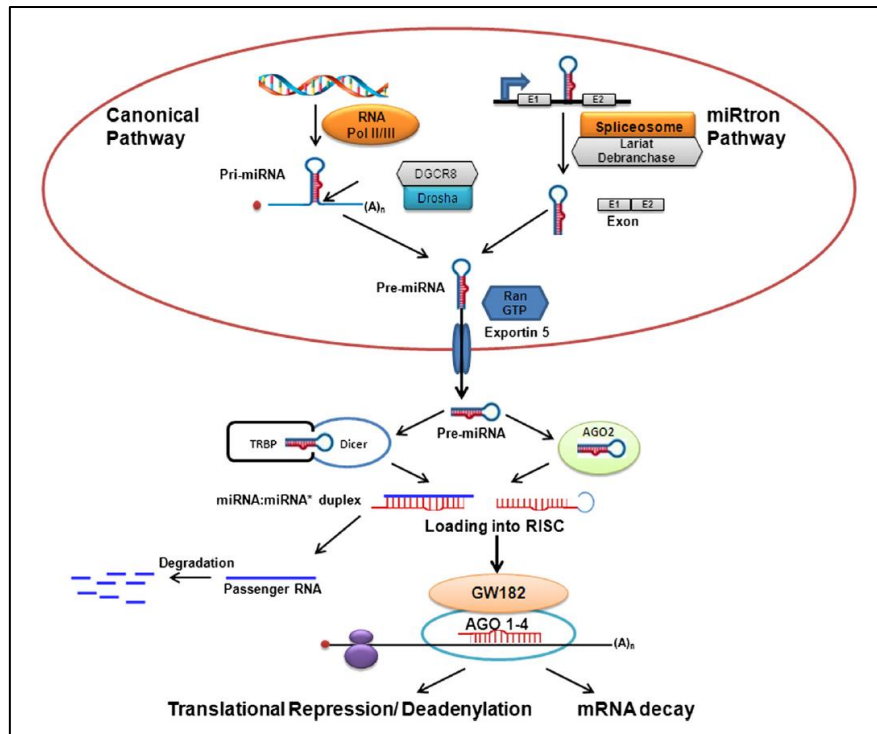
Les précurseurs miARNs sont ensuite exportés hors du noyau par l'exportine 5, une protéine Ran-GTP dépendante. Dans le cytoplasme, les pré-miARNs sont pris en charge par Dicer, une protéine à domaine PAZ permettant la reconnaissance de la coupure spécifique laissée par Drosha dans le pri-miARN, et à domaine dsRBD (double strand RNA binding domain) qui reconnaît la structure double brin du pré-miARN (**Figure 23**). Dicer possède aussi deux domaines à activité RNase III qui vont permettre la maturation du pré-miARN en miARN (Adlakha and Saini, 2014). Dicer clive donc le pré-miARN en un duplex de miARNs matures de 22 nucléotides : miARN :miARN*, où miARN* est appelé brin passager (Feng et al., 2012) et sera ou non dégradé par la suite (Marco et al., 2012).



D'après Jevsinek Skok et al., 2013

Figure 21: Structure secondaire d'un miARN.

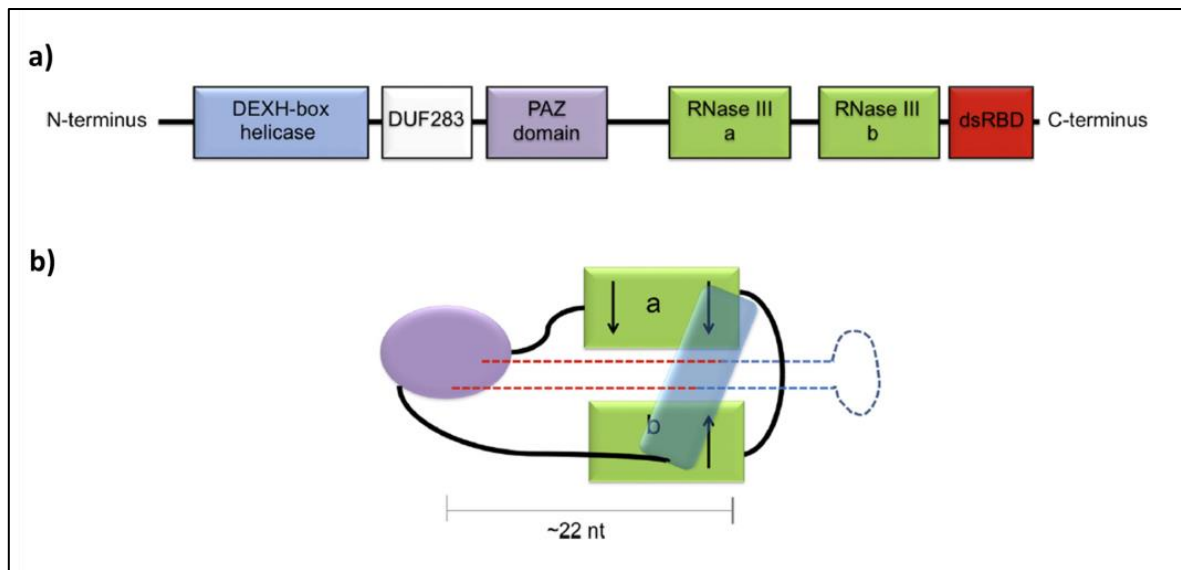
Le transcrit primaire (pri-miARN) est maturé par Drosha (le site de clivage est indiqué) en précurseur tige-boucle (pré-miARN). Ce dernier est ensuite pris en charge et clivé par Dicer afin de donner un miARN mature composé d'une région *seed* permettant la reconnaissance spécifique des cibles du miARN par appariement par complémentarité de séquence et une région où l'appariement sera moins strict, ce qui confère leur capacité flexible aux miARNs.



D'après Adlakha and Saini, 2014

Figure 22 : Voies de biogenèse et fonctions des miARNs.

Les miARNs sont transcrits dans le noyau à partir d'introns ou d'exons de gènes codant pour des protéines ; ou à partir d'introns de de longs ARNs non-codant (lncARNs), afin de donner des transcrits primaires (pri-miARNs). Ces pri-miARNs sont ensuite pris en charge dans le noyau par le microprocesseur, un complexe composé, entre autres, de l'endoribonucléase de type III Drosha et de DGCR8 (Di George syndrome critical region 8), une protéine d'interaction avec l'ARN double-brin. Dans la voie canonique d'une part, Drosha-DGCR8 transforme le transcrit en précurseur tige-boucle appelé pré-miARN. D'autre part, les miARNs issus d'introns sont appelés miRtrons et possèdent leur propre voie de biogenèse *via* le *spliceosome* qui aboutira aussi à la formation de pré-miARN. Les précurseurs issus de ces deux voies de biogenèse seront exportés vers le cytoplasme selon le même mécanisme dépendant de l'exportine 5. Ils y seront pris en charge soit par un complexe composé de Dicer, une autre endonucléase de type III, et de TRBP (HIV-1 TAR RNA binding protein), une protéine d'interaction avec l'ARN double-brin ; soit par Ago2 afin de donner dans les deux cas un duplex de miARNs de 20 à 25 pb. Ce duplex sera ensuite chargé au sein du complexe RISC composé de protéines Argonaute où l'un des deux brins sera sélectionné et donnera le miARN mature alors que son brin complémentaire (miARN*) sera le plus souvent dégradé. Le miARN mature produit pourra alors aller interagir avec ses transcrits-cibles afin d'inhiber leur traduction, ou d'entraîner leur dégradation.



D'après Fiorenza and Barco, 2016

Figure 23 : Structure de Dicer et modèle de coupure double-brin.

a) Plusieurs domaines fonctionnels hautement conservés composent Dicer. Les enzymes appartenant à cette famille partagent une structure commune composée par un domaine N-terminal à boîte DEXH à activité hélicase, un domaine DUF283 dont la fonction n'est pas connue, un domaine PAZ, deux domaines en tandem à activité RNase III (en vert) et un domaine C-terminal de reconnaissance de l'ARN double-brin (dsRBD). Le domaine PAZ (nommé ainsi après que les 3 premières protéines découvertes portant ce domaine soient nommées Piwi, Argonaute et Zwiille) est hautement conservé et est composé de 130 acides aminés.

b) Bien que Dicer soit fonctionnelle sous forme de monomère, les domaines catalytiques RNase IIIa et IIIb forment un pseudo dimère intra-moléculaire en interaction avec l'ARN double-brin et permettent la formation d'un site de coupure unique sur l'ARN. Les flèches indiquent les sites à activité catalytique. La séquence du miARN mature est indiquée par ligne rouge pointillée.

Le second brin (brin guide) va pouvoir être incorporé au sein du complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex), un complexe multi-protéique composé notamment de Dicer, Ago2 (une protéine appartenant à la famille des Argonautes qui peut se lier à l'ARN) et des protéines de stabilisation (**Figure 22**). La liaison du miRNA au RISC est médiée par les domaines PAZ des protéines Ago (Song et al., 2003). Le complexe RISC chargé avec le miARN (on parle alors de miRISC) va pouvoir fonctionner comme un guide afin de reconnaître les cibles du miARN et entraîner la répression de leur traduction, leur dégradation ou leur séquestration (Eulalio et al., 2008).

c. Mode d'action des micro-ARNs

Dans la plupart des cas, les miARNs vont cibler un ou des transcrits et permettront l'inhibition de leur expression de manière post-transcriptionnelle. La compréhension de la biosynthèse et du rôle des miARNs au sein de la cellule s'est considérablement améliorée au cours de ces dernières années cependant, leur mode d'action demeure encore à préciser.

Le miARN s'apparie de manière générale dans la partie 3'UTR du transcrit-cible et la reconnaissance de cette région par plusieurs molécules d'un même miARN permet une régulation fine de son niveau d'expression. Cela vient du fait que l'interaction d'un miARN avec sa cible n'est en effet pas parfaite. Un miARN, s'il est composé d'une région "seed" (nucléotide 2 à 7), dont l'appariement complet avec la cible est nécessaire, possède aussi une autre région moins spécifique (**Figure 21**). Ces mésappariements confèrent aux miARNs leur flexibilité dans l'appariement avec leurs transcrits-cibles ainsi que la capacité à réguler plusieurs ARNm (Lagos-Quintana et al., 2001).

Le premier mécanisme de régulation des transcrits par les miARNs consiste en leur dégradation. L'appariement du brin-guide avec le transcrit-cible permet l'activation d'une protéine argonaute appartenant au RISC. Cette dernière va alors permettre de dégrader l'ARNm-cible après qu'il a été déadénylé (suppression de la queue poly-A) et « décappé » (Behm-Ansmant et al., 2006).

Les miARNs possèdent aussi d'autres modes d'action permettant l'inhibition de l'expression génique de manière post-transcriptionnelle. Ils peuvent notamment empêcher la traduction, et ce à plusieurs étapes : inhibition de l'initiation, de l'élongation, permettre une terminaison prématurée ou une dégradation co-traductionnelle de la protéine (Eulalio et al., 2008). S'il est difficile de déterminer dans quelle proportion les transcrits sont régulés par ces mécanismes plutôt que par dégradation, il est en revanche clair que ce processus est moins bien compris et étudié.

Enfin, les miARNs peuvent aussi séquestrer leurs cibles au niveau de granules cytoplasmiques, les P-bodies (Processing bodies). En effet, les protéines argonautes, les miARNs ainsi que leurs transcrits-cibles colocalisent dans ces granules, tout comme dans protéines impliquées dans le *decapping* notamment (Eulalio et al., 2007). Au sein de ces P-bodies, les transcrits ne peuvent donc pas être pris en charge par la machinerie de traduction et finiront par être dégradés dans le sens 5' vers 3' *via* le système *mRNA decay* (Parker and Sheth, 2007).

En raison de la petite taille des séquences *seed* (6-8 nt), les miARNs montrent deux propriétés très importantes de point de vue mécanistique. Ainsi, un miARN peut réguler plusieurs dizaines voire centaines de transcrits (multiplicité), ce qui peut permettre une inhibition de l'expression de gènes impliqués dans un même processus biologique par exemple et donc une réponse fine et rapide à un stress environnemental. De façon similaire, un même transcrit peut contenir de séquences cibles pour plusieurs miARNs (coopérativité) ce qui aura pour conséquence ici aussi une régulation spécifique à un stimulus donné.

d. Conséquences de dérégulations de l'expression des micro-ARNs dans le système nerveux central

Les miARNs jouent un rôle très important dans le développement en particulier au niveau du système nerveux central. Ils sont impliqués notamment dans les processus de neurogenèse, de différenciation neuronale ou encore de plasticité synaptique (Nowak and Michlewski, 2013). Par exemple, miR-9 permet d'orienter des cellules-souches embryonnaires en progéniteurs neuronaux et est ensuite impliqué dans leur

différenciation ; miR-124 est impliqué dans de nombreux processus de prolifération et de différenciation de cellules-souches neuronales ainsi que dans le l'établissement des synapses (Olde Loohuis et al., 2012); miR-134 permet de moduler la croissance dendritique et la plasticité synaptique en coopération avec miR-132 et mir-138 (Bicker et al., 2014).

Ainsi, des dérégulations de leur expression vont mener à des altérations développementales extrêmement délétères. Par exemple, des variations anormales d'expression de miR-124a, de miR-125b et de miR-132 au cours développement seront impliquées dans le syndrome du X fragile (FXS) alors que miR-132, 184 et le *cluster* miR-379-410 jouent un rôle dans le syndrome de Rett (Cao et al., 2016).

D'autre part, les miARNs jouent un rôle très important dans la survenue et le développement de pathologies neurologiques, neurodégénératives ou neurocomportementales à l'âge adulte. Des dizaines d'ARNs non-codants dont une majorité de miARNs interviennent ainsi dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Tan et al., 2013) et il en est de même, dans une proportion moindre, pour la maladie de Parkinson (Molasy et al., 2017) et de Huntington (Goodall et al., 2013).

Enfin, concernant le cervelet, la littérature fait état d'un nombre inférieur de publications mais recense tout de même de nombreux miARNs impliqués dans la tumorigenèse et l'évolution de la cancérisation dans le cadre du médulloblastome (Vidal et al., 2013). Ainsi, dans ce cancer qui est le plus fréquent chez l'enfant, l'expression de plusieurs dizaines de miARNs peut être altérée selon le type et le grade de la tumeur. Par exemple, miR-124 —un des miARNs les plus étudiés au niveau cérébral— présente très fréquemment une baisse de niveau dans les cellules tumorales. Cela est associé à des dérégulations de la prolifération des progéniteurs cérébelleux (Pierson et al., 2008). Les miARNs appartenant au *cluster* miR17~92 voient en revanche leur expression augmenter dans le cadre des médulloblastomes, ce qui est associé à des dérégulations de la voie de signalisation *sonic hedgehog* (SHH), qui possède un rôle primordial au cours du développement (Uziel et al., 2009). MiR-124, tout comme miR-9, est par ailleurs impliqué dans la maladie de Huntington et constitue une cible potentielle dans son traitement et dans la compréhension de sa pathogenèse (Chandrasekaran and Bonchev, 2016).

Les fonctions des miARNs commencent seulement à être élucidées, et sont la plupart du temps identifiées grâce à des modèles d'études de pathologies. Ainsi, nombre de miARNs sont montrés comme étant dérégulés dans la maladie d'Alzheimer par exemple, sans que leurs cibles, ni leur mode d'action ne soient clairement définis en conditions normales. C'est le cas notamment de miR-455-3p, que l'on retrouve impliqué dans la différenciation des chondrocytes (Zhang et al., 2015), mais qui semble aussi être un marqueur périphérique de la maladie d'Alzheimer plutôt prometteur, car étant plus exprimé dans le plasma des malades que dans celui des individus sains (Kumar et al., 2017).

Tout ne reste pas cependant à découvrir concernant l'implication des miARNs dans le développement du cervelet. Par exemple, miR-10 est associée à une diminution d'expression du gène à boîte homéotique *Otx2*, impliqué dans le développement précoce du cervelet, ce qui permet alors d'activer la transcription de marqueurs de différenciation (Jönsson et al., 2015). De même, miR-9 dont nous avons parlé précédemment, joue aussi un rôle important dans l'organogenèse du cervelet et dans la neurogenèse prenant place au cours de sa formation. Cela a été montré par des expériences de surexpression et d'inhibition *in vivo* mais aussi par des études *in silico* (Leucht et al., 2008).

Enfin, des études plus descriptives ont permis de montrer que le profil d'expression des miARNs différait selon la structure cérébrale. De ce fait, chez l'adulte, miR-497 et miR-206 sont plus exprimés dans le cervelet que dans le reste du cerveau. A l'inverse, miR-221 et miR-222 le sont moins par rapport à ce qui est mesuré dans l'hippocampe par exemple (Olsen et al., 2009). Ces données vont dans le sens de l'existence de miARNs spécifiques à certains organes, ou à certaines structures cérébrales, alors que d'autres possèdent un rôle ubiquitaire.

e. La relation entre miARNs et donneurs de méthyles

Certaines études du laboratoire ont montré que la carence précoce en donneurs de méthyles avait un impact délétère sur le niveau d'expression de certains miARNs spécifiques. Ainsi, dans le cerveau, les embryons E20 de rats MDD présentent une augmentation d'expression de miR-124 — un miARN impliqué dans la neurogenèse

(Krichevsky et al., 2006)— et une diminution de sa cible, le facteur de transcription Stat3 (Kerek et al., 2013). Des résultats identiques ont été observés sur un modèle de progéniteurs hippocampiques carencés en vitamine B9 (Kerek et al., 2013). De même, à E20, les embryons carencés voient l'expression de Let-7a et miR-34 —deux miARNs impliqués dans le développement (Shookhoff and Gallicano, 2010)— augmenter (Geoffroy et al., 2016). Il est intéressant de noter qu'une supplémentation tardive en folates permet de restaurer l'expression normale de ces deux derniers miARNs ainsi que certains défauts morphologiques et structuraux précédemment décrits (Geoffroy et al., 2016).

Il existe quelques autres études portant sur la dérégulation de miARNs en situation de carence. Par exemple, des travaux portant sur une lignée cellulaire lymphoblastique ont montré une dérégulation globale des miARNs en réponse à une carence en folates (Marsit et al., 2006). Une autre publication a montré qu'un régime alimentaire carencé en donneurs de groupements méthyles entraîne le développement de stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) ainsi que des dérégulations du niveau d'expression de plusieurs miARNs, ces derniers pouvant d'ailleurs être retrouvés au niveau plasmatique, et être utilisés comme biomarqueurs d'atteintes hépatiques induites par la carence (Tryndyak et al., 2012).

Enfin, plusieurs études ont montré que la régulation de l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme des monocarbones était sous la dépendance de miARNs (Shookhoff and Gallicano, 2010). Ainsi, miR-24 cible spécifiquement DHFR (**Figure 2**) ce qui aboutit à une diminution du niveau de THF alors que miR-34a est quant à lui associé à la quantité de 5-MTHF *via* MTHFR (Shookhoff and Gallicano, 2010). De ce fait, la MDD aura un impact sur le métabolisme des monocarbones au-delà de la simple diminution de disponibilité en donneurs de méthyles, qui pourra aller jusqu'à une dérégulation globale du miRnome.

V. Objectifs de travail

Depuis plusieurs décennies, les carences précoces en donneurs de méthyles sont connues pour être à l'origine d'anomalies du développement telles que des retards de croissance *in utero* ou des défauts de fermeture du tube neural (anencéphalies et *spina bifida*, Mattson and Shea, 2003). La découverte de l'importance de la supplémentation en acide folique pendant la période périconceptionnelle a permis non seulement de réduire l'incidence de ces malformations, mais a aussi constitué une première étape dans la compréhension des mécanismes liés à la carence (Czeizel and Dudás, 1992). Cependant, malgré cette supplémentation, le taux de malformation reste aujourd'hui encore non nul.

Les anomalies développementales ne sont en revanche pas les seules altérations dont la MDD est responsable. En effet, un enfant né de mère carencée pendant la grossesse présentera un risque accru de développer des pathologies complexes (cardiovasculaires par exemple) à l'âge adulte (Blom and Smulders, 2011). C'est l'hypothèse de la programmation foétale : des perturbations environnementales au cours du développement auront un impact délétère à l'âge adulte. Enfin, les donneurs de méthyles sont aussi impliqués dans l'apparition et la progression de maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives chez l'adulte, ce qui ne fait que renforcer la nécessité de compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans la réponse à la MDD (Obeid, 2013).

Afin de répondre à cette problématique, le laboratoire a développé un modèle murin de carence périconceptionnelle en donneurs de méthyles : le modèle de rat MDD. Il a facilité et amélioré la compréhension des mécanismes de réponse à la carence, notamment au niveau du système nerveux central (Blaise et al., 2007; El Hajj Chehadeh et al., 2014b **annexe 2**, 2014a; Geoffroy et al., 2016a; Kerek et al., 2013; Pourié et al., 2015). Des altérations de la coordination locomotrice ont été décrites, tout comme des défauts structuraux et fonctionnels du cervelet. De plus, des résultats récents ont montré des déficiences de la NSG chez les femelles carencées à J₂₁. Ces résultats ont montré un effet du sexe dans la réponse à la carence, avec des femelles globalement plus affectées que les mâles. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse à la carence

demeurent encore incompris. Ainsi, mon projet de thèse se décline en deux axes principaux :

- **Analyse transcriptomique du cervelet des ratons femelles carencés à J₂₁ :**

Nous avons étudié les gènes et les voies de signalisation dérégulées en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles. Nous avons donc réalisé une analyse du transcriptome des femelles MDD à J₂₁ que nous avons comparé à celui des femelles contrôles. Nous avons utilisé une analyse par classification hiérarchique permettant de regrouper ensemble les gènes corrélés dans leur expression, puis nous nous sommes intéressés aux groupes de gènes dérégulés. Cette approche intégrative a permis de déceler les faibles variations de plusieurs gènes impliqués dans la même fonction biologique (même métabolisme, même voie de signalisation etc.). Nous avons ensuite validé ces résultats sur d'autres animaux par qPCR et western blot, en ciblant certains gènes et protéines d'intérêt impliqués dans les fonctions dérégulées en réponse à la carence. Nous avons enfin analysé les défauts structuraux du cervelet causés par la MDD par immunohistofluorescence.

- **Etude de l'épigénome du cervelet en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles :**

D'autre part, nous avons vu l'implication de mécanismes épigénétiques dans la réponse à la carence. Que ce soit au niveau de modifications de méthylation de l'ADN, des marques histones ou de l'expression de certains miARNs, le modèle MDD a déjà permis de mettre en évidence des dérégulations de plusieurs de ces mécanismes (El Hajj Chehadeh et al., 2014a; Geoffroy et al., 2016; Kerek et al., 2013; Pellanda et al., 2012; Pourié et al., 2015). Nous avons cependant voulu aller plus loin dans la compréhension de ceux-ci au niveau du cervelet. Nous avons donc réalisé l'étude du miRnome sur des ratons J₂₁ MDD et contrôles, mâles et femelles, et validé ces résultats sur d'autres animaux. Par ailleurs, nous nous sommes aussi intéressés aux les modifications des marques histones dans le cervelet des femelles en réponse à la carence à J₂₁. Ces résultats seront présentés au sein d'une seconde

partie qui aura donc pour thème l'étude de l'épigénome en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles.

Matériels et méthodes

I. Animaux

Les expériences décrites dans ce travail ont été menées sur des rats Wistar (Janvier Labs) en accord avec les directives éthiques européennes (2010-63-UE) et françaises (décret 2013-118) au sein d'un établissement agréé (A54-54-722 puis B54-54-722 depuis 2016). Les animaux sont maintenus en animalerie sous des conditions de laboratoire standard à température ambiante constante (22-23 °C) et selon un cycle de lumière/obscurité de 12 h avec un accès à la nourriture et à l'eau *ad libitum* (régime standard A04, Safe).

Un mois avant la mise en accouplement des animaux, les rates du groupe carencé ont reçu une alimentation dépourvue de donneurs de groupements méthyles (absence de vitamines B9 et B12 et faible dose de choline ; *Special Diet Service*). Ce régime a été maintenu tout au long de la gestation (figure MDD) et durant l'allaitement des ratons, jusqu'à leur sevrage, c'est-à-dire 21 jours après leur naissance. Les rates du groupe contrôle ont reçu un régime alimentaire standard (régime standard A04, Safe).

II. Récupération des tissus

Les ratons sont mis à mort à J₂₁ par overdose d'isoflurane puis décapités selon les recommandations du comité d'éthique de Lorraine. Des échantillons de sang sont prélevés sur héparine à l'aide d'une seringue hypodermique par ponction intracardiaque pour la mesure ultérieure des concentrations plasmatiques en Hcy et de ses déterminants. Les tubes sont centrifugés à 3000 xg pendant 10 min et les séra sont stockés à -80 °C. Les structures cérébrales d'intérêt (cervelet, cortex et hippocampe) sont récupérées après microdissection et conservées à -80 °C pour de futures expérimentations, ils seront alors broyés dans l'azote puis pesés et 20 mg de tissu seront utilisés.

Pour l'immunohistofluorescence, la moitié droite du cerveau a été récupérée et déposée dans une solution de paraformaldehyde 4 % sur la nuit. Les demi-cerveaux sont ensuite rincés trois fois au PBS 1x et incubés dans une solution de PBS 1x + 10 % de saccharose pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Cette étape est répétée avec une solution de PBS 1x + 20 % de saccharose puis 30 % de saccharose. Les demi-cerveaux sont ensuite congelés

dans du méthylbutane précédemment refroidi à -30 °C. Des coupes sagittales de 12 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20°C (Thermoscientific MicromHM560) sur les demi-cerveaux après inclusion dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4 %. Les coupes sont finalement stockées à -80 °C en attendant les analyses d'immunohistofluorescence.

III. Dosage radio-immunologique des vitamines B9 et B12 plasmatiques

Les dosages ont été effectués à l'aide du kit SimulTRAC-SNB (MP Biomedicals) sur 20 mg de cervelet broyés dans l'azote liquide. Le principe de ce test repose sur l'entrée en compétition des vitamines B9 et B12 endogènes avec leurs homologues radiomarqués sur le nombre restreint de sites de fixation disponibles sur l'agent de fixation, ce qui réduit la quantité de folates ou vitamine B12 marqués liés au réactif. De ce fait, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon ou de l'étalon. Ce test permet de déterminer simultanément la concentration des échantillons en vitamines B9 et B12 dans un seul tube. Tout d'abord, 200 µL d'une solution active de marquage (TRACER) / DTT (dithiothréitol) sont ajoutés à chaque extrait. Après 15 min d'incubation à température ambiante, 100 µL de réactif d'extraction sont ajoutés. Après avoir été vortexés, les échantillons sont ensuite repris dans 1 mL de réactif de liaison et incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 60 min. Ils sont ensuite centrifugés à 1000 xg pendant 10 min. Après élimination du surnageant, la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur gamma Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies) et un Compteur COBRA-IIrTM autogamma (Packard) à double canal. Une gamme étalon est établie en parallèle et permet de déterminer la concentration en vitamine B9 et B12 dans les échantillons.

IV. Dosages de l'homocystéine plasmatique

La mesure de la concentration en homocystéine plasmatique a été réalisées au Service de Biochimie du CHU de Nancy-Brabois par chromatographie liquide à ultra-haute

performance (Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μm ; 2.1 x 50 mm, Waters) couplée à une détection par spectrométrie de masse (4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex).

V. Détermination de la concentration en calcium libre intratissulaire

La concentration en calcium libre intratissulaire a été mesurée dans le cervelet de rats contrôles ou carencés à J₂₁ grâce au kit Calcium Detection Kit Colorimetric (Abcam). Ce dernier utilise le complexe chromogénique formé entre les ions calcium et la O-cresolphthaléine afin de déterminer la quantité de calcium intratissulaire. Vingt mg de cervelet ont été broyés dans l'azote et lysés sur glace par le tampon Calcium Assay Buffer. Après 3 min de centrifugation à 10000 $\times g$ à 4 °C, les surnageants ont été récupérés et 50 μL de chaque échantillon ont été déposés dans une plaque 96 puits. Quatre-vingt-dix μL de réactif Chromogenic Reagent et 90 μL de tampon Calcium Assay Buffer ont été ajoutés dans chaque puits, selon les recommandations du fabricant. En parallèle, une gamme étalon a été réalisée avec le Calcium Standard et la Densité Optique a finalement été mesurée à 575 nm.

VI. Etude des protéines

A. **Extraction protéique**

1. **Tampon RIPA**

Après broyage dans l'azote, 20 mg de cervelet de rats Contrôles ou MDD de 21 jours ont été solubilisés dans 220 μL de tampon de lyse RIPA (140 mM NaCl, 0,5 % désoxycholate de sodium (m/v), 1 % (v/v) Igepal CA-630, 0,1 % (m/v) sodium dodécylsulfate et 1 % d'inhibiteurs de protéases). Les tissus sont ensuite lysés dans un bain à ultrasons pendant 30 min et centrifugés à 4 °C pendant 30 min à 18000 $\times g$. Les surnageants sont récupérés pour la mesure de la concentration en protéines totales.

2. Tampon Gerdy

Après broyage dans l'azote, 20 mg de cervelet de rats Contrôles ou MDD de 21 jours ont été solubilisés dans du tampon de lyse Gerdy (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 % (m/v) sodium dodécylsulfate) (2,5 v/v) puis homogénéisés par 10 allers-retours à la seringue. Les échantillons sont ensuite soniqués pendant 10 sec puis homogénéisés avant la mesure de la concentration en protéines et seront ensuite dosés par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA).

3. Extraction des protéines histones

De par leur charge et leur petite taille, les histones doivent subir une extraction acide et être enrichies afin de pouvoir être étudiées par western blot. Ainsi, 35 mg de cervelet de femelles contrôles (N = 6) et MDD J₂₁ (N = 6) ont été broyés dans l'azote puis resuspendus dans 700 µL de tampon de lyse hypotonique (10 mM Tris pH 8, 1mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 5 mM NaBu, 2 % cocktail inhibiteurs de protéases (v/v)). Les cellules ont ensuite été broyées par 15 allers-retours à la seringue et les extraits ont été incubés pendant 30 min à 4 °C sur un agitateur rotatif. Ils ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 10000 xg à 4 °C afin d'isoler les noyaux et le surnageant a été éliminé. Les culots ont été repris dans 400 µL d'acide sulfurique H₂SO₄ 0,2 M (0,4 N) et incubés 2 h à 4 °C sur un agitateur rotatif puis centrifugés pendant 10 min à 14000 xg à 4 °C. Les surnageants contenant les histones ont été récupérés et dialysés sur la nuit contre 200 mL d'acide acétique 2,5 % (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 3.5K MWCO, 0.5 mL, Thermo Fisher). Le lendemain, les extraits ont été récupérés dans des tubes *low binding* (Thermo Fisher), mis à -80 °C pendant 1 h puis lyophilisés (Savant SC110A-120 Speed Vac Plus Vacuum Concentrator, Thermo Fisher). Les histones lyophilisées ont finalement été resuspendues dans 100 µL d'eau Milli-Q avant d'être dosées par la méthode BCA et aliquotées par 5 µg, soit la quantité nécessaire à un dépôt.

B. Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique

La concentration en protéines dans le surnageant (pour les extractions au tampon RIPA) ou dans les extraits totaux (pour les extractions au tampon Gerdy) a été déterminée grâce au kit BCA Protein Assay Kit (Interchim). Ce dosage colorimétrique repose sur le fait que les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est quant à lui un réactif colorigène hautement spécifique du Cu(I) qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique pouvant être lue entre 540 et 590 nm. Cette absorbance est proportionnelle à la concentration en protéines contenues dans l'échantillon. Les extraits à doser sont dilués au dixième dans du tampon RIPA ou Gerdy dans une plaque 96 puits puis 200 μL d'un mélange composé de 50 volumes de réactif A et 1 volume de réactif B sont ajoutés dans chaque puits. La réalisation en parallèle d'une gamme étalon à partir d'une solution d'albumine bovine sérique (NaCl 0,9%, NaN_3 0,05 %, albumine bovine sérique 2 mg/mL) permet de déterminer la concentration protéique de chaque échantillon. La plaque est ensuite mise à incuber à l'obscurité à 37 °C pendant 30 min et la D.O est lue à 570 nm (1420-041 Multilabel Plate Counter Victor3, Perkin Elmer)

C. Analyse par western Blot

1. Séparation des protéines par SDS-PAGE

Après détermination de la concentration protéique des échantillons, 30 μg de protéines sont repris dans du tampon Laemmli 5 $\times$ (SDS 10 %, Glycérol 50 %, 2-mercaptoethanol 25 %, bleu de bromophénol 0,01 %, Tris 250 mM, pH 6,8) puis dénaturés 5 min à 95 °C. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide dont le pourcentage dépendra de la taille des protéines étudiées. La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire est permise par migration électrophorétique (environ 2 h à 100 V) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) dans du tampon de migration (Tris base 25 mM, glycine 0,191 M, SDS 0,1 %, pH 8).

2. Western blot et immunorévélation

Le transfert sur membrane de nitrocellulose ou PVDF (selon l'anticorps utilisé) est ensuite réalisé en milieu liquide dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 10%, pH 8,3) pendant 70 min à ampérage constant (350 mA). La qualité du transfert est ensuite vérifiée par une coloration réversible des protéines dans une solution de rouge Ponceau. La membrane est saturée pendant 1h sous agitation lente dans une solution de tampon-tris salin et Tween20 (TBST) (Tris 50 mM, NaCl 170 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,3) avec du lait ou de la BSA à 5 % (v / m). La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps primaire pour la nuit à 4 °C (**Tableau I et Tableau II**). Le lendemain, elle est rincée trois fois sous agitation dans du TBST 1X puis mise en présence de l'anticorps secondaire (dilué au 1/10000) pendant une heure à température ambiante (Anticorps anti-immunoglobuline de lapin ou de souris couplé à la peroxydase, Jackson ImmunoResearch). Après trois lavages de 5 min au TBST 1× sous agitation, l'activité peroxydase est révélée par une solution de chimioluminescence (BioRad) à l'aide d'un système d'imagerie de chimioluminescence Fusion Fx7 (Thermo Fisher).

Les conditions optimales ont préalablement été mises au point sur des échantillons de cervelet contrôle et le pourcentage en acrylamide des gels de migration, les durées de migration, de transfert ainsi que les concentrations en anticorps primaires ont été adaptées en fonction de la protéine à détecter et de l'anticorps primaire utilisé (données non présentées).

La quantité totale de protéine par ligne a été normalisée en quantifiant le niveau d'expression de la protéine GAPDH ou de la protéine Vinculine (**Tableau I**) (ou les histones totales H₃ et H₄ pour les western blots concernant les modifications des marques histones, **Tableau II**), et les analyses densitométriques ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ v1.49.

Tableau I : Références et conditions d'utilisation des anticorps en western blot et immunofluorescence

Anticorps	Fournisseur	Référence anticorps	Conditions dilution	
Alexa Fluor 594 donkey anti Goat	Abcam	ab150136	1/1000	BSA
α -tubuline	Abcam	ab185067	1/2000	BSA
β -catenin	Cell Signaling Technology	9581	1/1000	BSA
Anti-mouse IgG	Jackson Immuno (Interchim)	715-035-151	1/10000	Lait/BSA
Anti-rabbit IgG	Jackson Immuno (Interchim)	711-035-152	1/10000	Lait/BSA
Calbindin D28	Santa Cruz Biotechnology	sc-7691	1/100	BSA
CamKII	Gentex	GTX111401	1/3000	BSA
Caspase 9 clivée	Cell Signaling Technology	9504	1/1000	BSA
Ccd1	Proteintech	13816-1-AP	1/1000	BSA
C-myc	Santa Cruz Biotechnology	sc-788	1/1000	BSA
Cyclin-D1	Cell Signaling Technology	2926	1/800	BSA
GAPDH	Abcam	ab9482	1/10000	BSA
Gria2	Abcam	ab133477	1/1000	BSA
GSK-3 β	Cell Signaling Technology	9315	1/1000	BSA
IGF-1R	Novus Bio	NBP1-77680	1/1000	BSA
JNK	Cell Signaling Technology	9252	1/1000	BSA
MAP1b phospho	Novus Bio	NBP1-42827	1/1000	BSA
NeuroL	USBiological	N2165-08	1/100	BSA
P300	Santa Cruz Biotechnology	sc585	1/700	Lait
PARP-clivée	Cell Signaling Technology	5625	1/1000	BSA
phospho SAPK/JNK (thr 183/tyr185)	Cell Signaling Technology	9251	1/1000	Lait
Vinculin	Chemicon	MAB3574	1/2000	BSA
Wnt3a	Abcam	ab28472	1/1000	BSA
Wnt7a	ProteinTech	10605-1-AP	1/1000	BSA

Tableau II : Références et conditions d'utilisation des anticorps anti-histones utilisés en western blot

Anticorps	Fournisseur	Référence de l'anticorps	Conditions de dilution	
H ₃ total	Abcam	Ab10799	1/10000	Lait
H ₃ K ₁₄ Ac	Abcam	Ab52946	1/5000	Lait
H ₃ K ₂₇ Ac	GeneTex	gtx128944	1/5000	Lait
H ₃ K ₄ Me ₂	Abcam	Ab10158	1/5000	Lait
H ₃ K ₉ Me ₃	Abcam	Ab8898	1/5000	Lait
H ₃ K ₃₆ Me ₃	Abcam	Ab9050	1/5000	Lait
H ₃ R ₂ Me ₂	Millipore	05-808	1/5000	Lait
H ₃ S ₁₀ P	Abcam	Ab5176	1/5000	Lait
H ₄ total	Abcam	Ab10158	1/10000	Lait
H ₄ K ₈ Ac	GeneTex	gtx128957	1/5000	Lait
H ₄ K ₁₆ Ac	Millipore	07-329	1/5000	Lait
H ₄ K ₂₀ Me ₃	Millipore	07-463	1/5000	Lait
H ₄ R ₃ Me _{2a}	Active Motif	39705	1/5000	Lait

D. Dés hybridation douce de la membrane

Afin de quantifier de manière relative l'expression de deux protéines possédant un poids moléculaire proche, il est parfois nécessaire de recourir à une dés hybridation de la membrane, permettant de rompre les interactions non-covalentes entre les protéines fixées à la membrane et les anticorps –primaires et secondaires- utilisés au cours de la révélation. Après révélation, les membranes ont été incubées dans un tampon de *stripping* (3,5 mM SDS, 200 mM Glycine, 1 % Tween 20 (m / v), pH 2,2) sous agitation à température ambiante deux fois 10 min. Elles ont ensuite subi 2 lavages de 10 min au PBS 1×, puis 2 lavages de 5 min au TBST 1×. Enfin, les membranes sont bloquées dans une solution de tampon-Tris salin et Tween-20 (TBST) (Tris 50 mM, NaCl 170 mM, Tween 20 0,1 %, pH 7,3) contenant du lait ou de la BSA 5 % (v / m) puis incubées en présence d'un nouvel anticorps primaire.

E. Immunohistofluorescence

Les analyses d'immunohistofluorescence ont été réalisées sur des coupes sagittales de 12 µm de cerveau de rat contrôle ou MDD à J₂₁, générées au cryostat (ThermoScientific MicromHM560) à -20 °C. Après avoir été déposées sur lame et parafinées, les sections sont fixées pendant 15 min dans une solution de paraformaldéhyde 4 % (Sigma-Aldrich). Les coupes sont ensuite lavées aux PBS 1X pendant 5 min à trois reprises puis perméabilisées dans une solution de PBS-0,1 % Triton pendant 10 min à température ambiante. Les lames ont par la suite été incubées dans une solution de PBS-BSA 10 % (m/v) pendant 1 h à température ambiante afin de bloquer les potentiels sites de fixation aspécifiques de l'anticorps primaire. Ce dernier (**Tableau I**) est ensuite mis en présence des coupes de cerveau sous agitation lente en chambre humide pendant 48 h à 4 °C après dilution au 1/200 dans du PBS-Triton 0,01 % - BSA 10 %. Après 3 lavages de 5 min au PBS 1×, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (**Tableau I**) dilué dans du PBS – BSA 10 % - Triton 0,01 % pendant 2 h à température ambiante en chambre humide. Les lames sont encore une fois lavées au PBS 1× et les noyaux contremarqués au 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.5 mg/ml in PBS; Sigma-Aldrich). Les marquages sont ensuite observés en

microscopie à fluorescence (BX51WI, Olympus) au grossissement x 20 et les photographies ont été prises avec une caméra digitale (MF ProgRes, Jenoptik) à l'aide du logiciel cellF (Soft Imaging System, Olympus).

1. Mesure de l'épaisseur de la couche de cellules granulaires dans le cervelet

Après un marquage au DAPI (0.5 mg/ml in PBS; Sigma-Aldrich), les coupes sagittales de cerveau de femelles contrôles ou MDD J₂₁ ont été observée en microscopie à fluorescence (BX51WI, Olympus) au grossissement x20 et les photographies ont été prises avec une caméra digitale (MF ProgRes, Jenoptik) à l'aide du logiciel cellF (Soft Imaging System, Olympus). Dans un souci d'homogénéité et de constance, toutes les mesures ont été faites dans le lobule VII du cervelet et ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ v1.49. L'épaisseur de la couche granulaire a été déterminée comme montrée dans la **Figure 3-A** article en mesurant la plus grande distance entre l'intérieur et l'extérieur de cette couche granulaire (GC) et a été appelée distance a . Une seconde distance a été mesurée : il s'agit de la moyenne des distance $b1$ et $b2$ (appelée b) et qui a été mesurée entre la couche de cellules la plus à l'intérieur de la GC et la couche de cellules la plus à l'extérieur tout en formant un angle droit avec la distance a .

2. Comptage des cellules de *Purkinje* dans le cervelet

Afin de compter le nombre de cellules de *Purkinje* dans le cervelet, les coupes sagittales de cerveaux ont été marquées à la calbindine D28, un marqueur spécifique des cellules de *Purkinje*. Les photographies ont été prises au grossissement x20 avec une caméra digitale (MF ProgRes, Jenoptik) à l'aide du logiciel cellF (Soft Imaging System, Olympus). Les cellules de *Purkinje* ont été comptées dans un champ de microscope et leur nombre a été reporté à 1000 μm^2 .

VII. Etude des ARNs

A. Extraction d'ARNs totaux

Vingt mg de cervelet ou de cortex femelle contrôle ou MDD J₂₁ sont broyés dans l'azote liquide puis repris dans 1 mL de TriZol (Invitrogen), vortexés brièvement et mis à incuber à température ambiante pendant 3 min. Un volume de 200 µL de chloroforme est ajouté à chaque échantillon qui est ensuite agité vigoureusement pendant 30 sec et incubé 3 min à température ambiante avant d'être centrifugés pendant 15 min à 10 000 *xg* à 10°C. La phase aqueuse contenant les ARNs est ensuite récupérée et ces derniers sont précipités à l'aide d'isopropanol (v/v) pendant 10 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 min à 10000 *xg* à 4 °C. Les culots sont ensuite lavés à l'éthanol 70 %.

Après lavage, les culots sont resuspendus dans un mélange contenant 1 µL de Turbo DNase (2U/µL ; Ambion), 15 µL de son tampon 10x, 1 µL de RNase Out (Invitrogen) et 133 µL d'eau Milli-Q et incubés pendant 30 min dans un bain sec à 37 °C. Les ARNs sont ensuite extraits avec 150 µL de phénol-chloroforme, vortexés, centrifugés 3 min à 10 000 *xg* à température ambiante et la phase aqueuse est récupérée. Par la suite, les ARNs sont précipités par l'ajout d'éthanol absolu (2,5 v/v), d'acétate d'ammonium (0,1 v/v) et une incubation à -80 °C pendant 1 h. Après une centrifugation de 10 min à 10 000 *xg* à température, les culots sont lavés dans 200 µL d'éthanol 70 %, puis les culots d'ARNs sont repris dans 30 µL d'eau Milli-Q. Le dosage est ensuite réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific) et les rapports DO_{260nm} / DO_{280nm} et DO_{260nm} / DO_{230nm} permettent d'évaluer la pureté des échantillons d'ARNs. Seuls les échantillons avec des rapports supérieurs à 2 sont utilisés pour la suite des manipulations.

B. Etude des ARNm

1. Transcription inverse des ARNs totaux pour amplification des ARNm

Les ARNs totaux ont été rétrotranscrits à l'aide du kit iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (BioRad). Cinq-cents ng d'ARN totaux ont été repris puis homogénéisés dans un mix contenant 4 µL de tampon 5× iScript advanced reaction mix et 1 µL de transcriptase inverse iScript advanced reverse transcriptase. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 30 min à 42 °C dans un Thermocycler PHC-3 (Techne) afin de permettre l'amplification, puis ils ont subi une étape d'inactivation de l'enzyme rétrotranscriptase pendant 5 min à 85 °C. Pour la réaction de RT-qPCR, 1 µL de cette rétrotranscription (RT) sera utilisé par la suite.

2. PCR quantitative

Pour la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR), le kit SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) a été utilisé. Un µL de RT a été repris dans un mix contenant 10 µL de tampon 2× SsoAdvanced et 1 µL de Prime PCR Assay 20× (**Tableau III**). Les échantillons ont ensuite été déposés en plaque 96-puits et après scellage, les plaques ont été centrifugées à 200 xg pendant 1 min. La réaction d'amplification ensuite réalisée à l'aide du StepOne Plus Real-Time PCR System Thermal Cycling Block selon le programme suivant : 2 min à 95 °C, puis 40 cycles comprenant ces deux étapes : 5 sec à 95 °C et 30 sec à 60 °C. La lecture de la fluorescence se fait sur cette deuxième étape. Après ces 40 cycles, une courbe de fusion est réalisée comme suit : 15 sec à 95°C, 1 min à 60 °C, la fluorescence est ensuite lue tous les 0,5 °C jusqu'à atteindre un maximum de 95 °C. Le niveau d'expression relatif transcrit d'intérêt chez les MDD par rapport aux contrôles est déterminé par la méthode de calcul $2^{-\Delta\Delta C_t}$ via le logiciel DataAssist v3 (ThermoFisher).

Tableau III : Amorces de qPCR utilisées pour mesurer l'expression de 29 gènes d'intérêt

Gène	Protéine	Référence PrimePCR™ SYBR® Green Assay BioRad
Axin2	Axine 2	qRnoCID0050993
Arid4b	AT-rich interactive domain-containing protein 4B	qRnoCED0005473
Atf1	Activating Transcription Factor 1	qRnoCID0002413
Atxn7	Ataxine 7	qRnoCED0011585
Brcc3	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36	qRnoCED0002326
Cadps2	Ca++-dependent secretion activator 2	qRnoCED0017999
Ctnnb1	β-caténine	qRnoCID0053256
Dixdc1	Coiled-Coil Protein DIX1	qRnoCID0004096
Emt1	euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1	qRnoCID0009266
Ep300	E1A binding protein p300	qRnoCED0002792
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	qRnoCID0057018
Gria2	Glutamate receptor 2 isoform 1 precursor	qRnoCED0006426
IGF1r	Insulin-like growth factor 1 receptor	qRnoCID0004983
Kansl2	KAT8 regulatory NSL complex subunit 2	qRnoCED0017696
Kdm5b	Lysine (K)-specific demethylase 5B	qRnoCID0008895
Map3k12	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12	qRnoCED0001194
Mecp2	Methyl-CpG-binding protein 2	qRnoCED0007725
Ncoa3	Nuclear Receptor Coactivator 3	qRnoCID0001078
NeuroD1	Neurogenic differentiation factor 1	qRnoCED0001500
Phf17	Protein Jade-1	qRnoCIP0027640
Psme4	Proteasome activator subunit 4	qRnoCID0051041
Rcor1	REST corepressor 1	qRnoCID0002883
Rpl27a	60S ribosomal protein L27a	qRnoCED0005155
rps6ka5	Ribosomal protein S6 kinase alpha-5	qRnoCID0003633
Sall1	Sal-like protein 1	qRnoCED0002411
Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondria	qRnoCID0057011
Sdhc	Succinate dehydrogenase complex, subunit C	qRnoCED0003343
Setd8	Histone-lysine N-methyltransferase SETD8	qRnoCID0008043
Suv420h	Histone-lysine N-methyltransferase SUV420H1	qRnoCED0008168

C. Etude des miARNs

1. Transcription inverse des ARNs totaux pour amplification des miARNs

La transcription inverse (RT) est réalisée avec le miScript II RT Kit (Qiagen). Pour réaliser la RT, 1 µg d'ARN est utilisé et est repris dans un mélange contenant 4 µL de tampon 5X miScript Hispec Buffer, 2 µL de miScript Nucleics Mix 10× et 2 µL de miScript Reverse Transcriptase Mix. Le volume est complété à 20 µL avec de l'eau Milli-Q.

La réaction d'amplification s'effectue dans un Thermocycler PHC-3 (Techne) pendant 60 min à 37 °C puis 5 min à 95 °C et 200 µL d'eau MQ sont ensuite ajoutés aux échantillons afin de les diluer selon les recommandations du fournisseur.

2. PCR quantitative

Les qPCR sont réalisées à l'aide du kit miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Pour chaque qPCR, 2,5 µL de RT dilués 5 ou 10 fois sont utilisés, auxquels sont ajoutés 22,5 µL d'un mélange contenant 12,5 µL de SYBR Green, 2,5 µL d'amorce universelle (**Tableau IV**), 2,5 µL d'amorce spécifique 1x du miARN d'intérêt (miScript Primer Assay, Qiagen) et 5 µL d'eau-Milli-Q. Un deuxième mélange est utilisé afin d'amplifier un ARN non codant de référence, dont l'expression ne varie pas en fonction des conditions utilisées. Après dépôt des ADNc et des mélanges dans chaque puits d'une plaque 96 puits, la plaque est centrifugée 1 min à 200 xg et la réaction d'amplification est ensuite réalisée à l'aide du StepOne Plus Real-Time PCR System Thermal Cycling Block selon le programme suivant : 15 min à 95 °C, puis 40 cycles comprenant ces trois étapes : 15 sec à 94 °C, 30 sec à 55 °C et 30 sec à 70 °C. La lecture de la fluorescence se fait sur cette dernière étape. Puis, après ces 40 cycles, l'établissement d'une courbe de fusion est réalisé selon les étapes suivantes : 15 sec à 95 °C, 1 min à 60 °C, la fluorescence est ensuite lue tous les 0,3 °C jusqu'à atteindre un maximum de 95 °C. Le niveau d'expression relatif du miARN d'intérêt chez les MDD par rapport aux contrôles est déterminé par la méthode de calcul $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau IV : Amorces utilisées pour mesurer l'expression des petits ARNs non-codants d'intérêt

miARN	Amorces utilisées	Références amorces	miRBase mature miRNA ID
mir-134-5p	Rn_miR-134_1 miScript Primer Assay	MS00000364	MIMAT0000840
mir-181a-5p	Rn_miR-181a_2 miScript Primer Assay	MS00013125	MIMAT0000858
mir-194-3p	Rn_miR-194*_1 miScript Primer Assay	MS00026978	MIMAT0017148
mir-219b	Rn_miR-2964_1 miScript Primer Assay	MS00027244	MIMAT0017882
mir-330-3p	Rn_miR-330*_2 miScript Primer Assay	MS00033446	MIMAT0000568
mir-344-5p	Rn_miR-344b-5p_1 miScript Primer Assay	MS00027454	MIMAT0017811
mir-369-5p	Rn_miR-369-5p_1 miScript Primer Assay	MS00005768	MIMAT0003206
mir-374 5p	Rn_miR-374*_1 miScript Primer Assay	MS00028056	MIMAT0003208
mir-380-3p	Rn_miR-380*_1 miScript Primer Assay	MS00028084	MIMAT0017302
mir-410-3p	Rn_miR-410_1 miScript Primer Assay	MS00013601	MIMAT0005311
mir-485-3p	Rn_miR-485*_1 miScript Primer Assay	MS00028259	MIMAT0017222
mir-487b-3p	Rn_miR-487b_1 miScript Primer Assay	MS00001134	MIMAT0003200
snrna-u6	Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay	MS00033740	—

VIII. Modèles cellulaires

A. Entretien des lignées cellulaires

Les PC-12 sont une lignée dérivée de phéochromocytome de rat (*Rattus norvegicus*) originaire de la crête neurale. Elles sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D6046, Sigma Aldrich) supplémenté avec 4,5 g/L de glucose (Sigma Aldrich), 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio) et 1 % d'un mélange de pénicilline et streptomycine (Sigma Aldrich). Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C sous une atmosphère à 5 % de CO₂. Elles sont passées au dixième deux fois par semaine après avoir été rincées au PBS 1× puis décollées par 1 mL de trypsine pendant 1 min à 37 °C.

B. Surexpression de miR-344

1. Transfection et contrôles utilisés

La surexpression de miARNs par transfection de mimics (analogues synthétiques de miRs endogènes) est une technique permettant d'identifier les fonctions d'un miARN d'intérêt. L'utilisation de contrôles positifs et négatifs est cependant essentielle pour l'interprétation correcte des résultats de transfection. Les différents contrôles utilisés sont représentés dans le **Tableau V**.

2. Protocole de surexpression

Les PC-12 ont étéensemencées en plaques 6 puits par $2,5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans 2,3 mL de milieu d'entretien dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Cent cinquante ou 300 ng du miR-mimic d'intérêt (concentration finale 5 ou 10 nM) sont ensuite repris dans du DMEM sans sérum (D6046, Sigma Aldrich) jusqu'à un volume final de 194 µL. Puis, 6 µL du réactif HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) sont ajoutés au mélange qui est alors vortexé, selon les recommandations du fournisseur. Le mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante afin de permettre la formation des complexes de

Tableau V : Réactifs et contrôles utilisés pour la surexpression de miR-344 dans la lignée PC-12

Réactif	Référence	Fonction
Syn-rno-miR-344b-5p (miScript miRNA Mimic)	MSY0017811	Surexpression de miR-344
Syn-hsa-miR-1-3p (miScript miRNA Mimic)	MSY0000416	Surexpression de miR-1 dont les cibles sont connues. Ce contrôle permet de vérifier l'efficacité de la transfection en regardant l'expression de SRSF1 par western blot
AllStars Negative Control siRNA	1027280	Mélanges de miARNs synthétiques n'ayant pas de cible chez les eucaryotes. Contrôle permettant d'évaluer l'effet de la transfection
AllStars Mm/Rn Cell Death Control siRNA	SI04939025	Mélange de siARNs ciblant des gènes de survie cellulaire. Contrôle positif de transfection
HiPerFect Transfection Reagent	301704	Réactif de transfection

transfection et il est finalement ajouté goutte à goutte sur les cellules. La plaque 6 puits est incubée pendant 10 min à température ambiante avant d'être remise à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂.

Après 48 ou 72 h, des photographies ont été réalisées à l'aide de la caméra Moticam X (Motic) et du logiciel Moti Image Plus (Motic) au grossissement ×60.

Le tapis cellulaire a été rincé avant d'être repris dans 200 µL de d'extraction Gerdy afin d'extraire les protéines totales, puis de les doser selon la méthode BCA.

IX. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été menées à l'aide du logiciel RStudio, version 1.0.143. Les variables continues et les analyses densitométriques des Western Blots sont exprimées en moyennes ± SD (Standard Deviation). L'égalité des variances a été vérifiée par un test de Fisher. Un test de Student a ensuite été réalisé afin de comparer les moyennes entre les groupes Contrôles et MDD. Une *p* value < 0,05 est considérée comme indiquant une différence statistique significative entre les groupes.

Résultats 1^{ère} partie

Gènes et voies de
signalisation dérégulés dans
le cervelet en réponse à la
carence précoce en
donneurs de méthyles

I. Analyse du transcriptome et résultats associés

A. Publication

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires qui sont mis en jeu dans la réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet nous avons étudié le transcriptome de cette structure à J₂₁, période à laquelle le développement post-natal de cette structure cérébrale s'achève. Les études effectuées précédemment dans l'équipe avaient montré un effet sexe-dépendant de la réponse à la carence, les femelles étant plus affectées que les mâles, notamment en ce qui concerne l'altération de la NSG. Nous avons donc réalisé l'analyse *microarray* sur des échantillons issus de rats femelles.

Cette première partie a donné lieu à un manuscrit qui a été soumis pour publication au FASEB Journal au mois de septembre 2017. Je vais dans un premier temps introduire cette publication et discuter des résultats obtenus. Enfin, je présenterai des résultats complémentaires qui ne rentrent pas dans le cadre de l'article.

1. Introduction

Les effets de la MDD ont largement été décrits ainsi que leur impact sur le développement cérébral et les fonctions associées (Berrocal-Zaragoza et al., 2014). De plus, selon l'hypothèse de la programmation foétale, ces effets délétères au cours du développement auront un impact sur la survenue de pathologies à l'âge adulte (Mattson and Shea, 2003). Au niveau cellulaire, l'accumulation d'Hcy est associée à une altération de la NSG (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**) et de la fonction synaptique (Pourié et al., 2015) dont les conséquences sont observées au niveau fonctionnel avec des troubles cognitifs et de coordination motrice (Blaise et al., 2007). Même si des études récentes permettent d'expliquer en partie les processus moléculaires impliqués dans cette réponse à la MDD (Geoffroy et al., 2016a), il demeure cependant des zones d'ombres. C'est la raison pour laquelle nous avons effectué cette étude transcriptomique sur le cervelet des femelles à J₂₁.

2. Résultats

L'analyse des résultats a mis en évidence trois *clusters* contenant respectivement 1875, 1144 et 602 gènes corrélés dans leur expression (**Figure 2 article**). Afin de sélectionner les gènes d'intérêt au sein de ces données nous ne nous sommes pas simplement intéressés aux grandes variations d'expression ou à la significativité de ces changements, mais nous avons utilisé une approche intégrative plus globale. Ainsi, les gènes impliqués dans des fonctions similaires (même métabolisme ou voie de signalisation par exemple) sont regroupés ensemble sous un numéro qui sera spécifique à la fonction, on parle de GO ID ou terme GO. Nous avons analysé ces termes GO afin de comprendre quelles fonctions étaient dérégulées en réponse à la carence dans le cervelet des femelles. L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que dans le cadre d'une approche classique, de légères variations d'expression peuvent ne pas être décelées ou ne pas sembler impactantes. L'analyse statistique et la significativité portent alors sur l'ensemble des gènes regroupés dans le GO ID et les résultats montrent combien de gènes au sein de ce groupe présentent une expression différentielle en réponse à la carence.

Dans le premier *cluster* (**Tableau III article**), 1875 gènes voient leur expression augmenter chez les femelles MDD ($p \leq 0.05$). Les annotations fonctionnelles révèlent que de nombreux gènes dérégulés sont associés au métabolisme du glutathion (ex : GO ID 1901685), à la traduction de manière générale (ex : GO ID 6415, 44391) ou à la structure du ribosome (ex : GO ID 5761). La fonction mitochondriale est aussi extrêmement représentée dans ce cluster, avec des augmentations de gènes impliqués dans la synthèse d'ATP couplée au transport de protons (ex : GO ID 42776), la phosphorylation oxydative (ex : GO ID 6119) ou encore l'assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire (ex : GO ID 33617).

A l'inverse, dans le second et le troisième *cluster*, on retrouve des gènes qui voient leur expression baisser en réponse à la MDD (1144 et 602 gènes diminués respectivement, $p \leq 0.05$). Dans le *cluster 2* (**Tableau IV article**) beaucoup de gènes sont impliqués dans la structure et la morphogénèse du cervelet (ex : GO ID 21683, 21692, 21697, 21587, 21549), la fonction synaptique (ex : GO ID 1904861, 97119, 60079, 7269, 35249), le comportement locomoteur (ex : GO ID 7626) et le développement de prolongements neuronaux (ex : GO

ID 16358, 45773, 2000171). Dans le troisième *cluster* (**Tableau V article**), des gènes impliqués dans des fonctions similaires présentent une baisse d'expression chez les femelles carencées : fonction synaptique (ex : GO ID 99572, 45202, 99536) et projection neuronale (ex : GO ID 44306, 97458).

Dans le deuxième *cluster*, des gènes régulant le développement des cellules de *Purkinje* et de la couche moléculaire sont diminués (GO ID 21684 et 21692 respectivement, FDRs < 0.001; **Tableau IV article**). Nous avons donc mesuré l'épaisseur de la couche granulaire ($p \leq 0.05$, **Figure 3-B article**) et montré une diminution chez les MDD tout comme le nombre de cellules de *Purkinje* ($p \leq 0.05$, **Figure 3-D article**), ce qui confirme les effets délétères de la carence sur le développement et l'architecture du cervelet des ratons femelles.

Par ailleurs, les gènes impliqués dans la signalisation dépendante de wnt sont aussi diminués dans le cervelet des femelles MDD par rapport aux contrôles (GO ID : 16055, **Tableau IV article**). Cette voie est connue pour jouer un rôle prépondérant dans le développement du cervelet *via* le contrôle de la balance prolifération / apoptose et la mise en place de la polarité cellulaire (Lucas and Salinas, 1997; Lucas et al., 1998; Oliva et al., 2013). Nous avons vérifié et validé ces résultats *microarray* par western blot en nous intéressant directement au niveau protéique des acteurs des différentes voies wnt précédemment décrites.

La voie wnt canonique présente une diminution d'activation chez les femelles MDD avec une augmentation de l'expression de GSK-3 β et une diminution subséquente du niveau de β -caténine ($p \leq 0.05$, **Figure 4-B article**). De ce fait, les gènes-cibles de cette voie sont moins exprimés ($p \leq 0.05$, **Figure 4-B article**). Il en est de même pour la voie canonique divergente où l'on retrouve cette augmentation de GSK-3 β , associée cette fois à une augmentation de phosphorylation de MAP1b (**Figure 6-B article**), la protéine impliquée dans le contrôle de la croissance dendritique et de la formation synaptique (Conde and Cáceres, 2009). Un point important sur l'activation de ces deux voies en réponse à la MDD concerne le fait qu'elle n'est pas la conséquence d'une diminution de la sécrétion de ligand wnt-3a et wnt-7a, les deux ligands wnt exprimés dans les cellules de *Purkinje* et granulaires respectivement (**Figure 4-A article**). Les dérégulations des voies wnt canoniques sont donc le fait d'une

hausse de l'expression de GSK-3 β plutôt que d'une sur-stimulation du récepteur Fzd par augmentation de la sécrétion de ligand.

Nous n'avons en revanche pas observé de modification concernant l'activation de la voie de la PCP, avec des niveaux de Ccd1 (**Figure 5-D article**) et de JNK phosphorylée (**Figure 5-A article**) qui ne varient pas en réponse à la carence, malgré une hausse de l'expression du gène *Ccd1* ($p \leq 0.05$, **Figure 5-B article**). Ces résultats suggèrent que la polarité des cellules n'est pas affectée par la carence en donneurs de groupements méthyles dans le cervelet des femelles à J₂₁.

Enfin, la dernière voie wnt qui a retenu notre attention est la signalisation dépendante du calcium. De précédents résultats du laboratoire ont montré une activation de PKC réduite dans le cervelet des femelles carencées, ainsi qu'une diminution de la forme active du facteur de transcription associé CREB (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Nous avons ici obtenu des résultats complémentaires avec une baisse du taux de calcium libre intratissulaire chez les femelles carencées ($p \leq 0.05$, **Figure 6-A article**). De manière surprenante cependant, CamKII voit son expression augmenter chez les femelles carencées par rapport aux contrôles ($p \leq 0.05$, **Figure 6-C article**).

Le transport et la libération du calcium sont par ailleurs très impliqués dans la fonction synaptique et au-delà des défauts de la voie wnt Ca²⁺- dépendante, et les altérations que nous avons décrites pourraient être associées à un dysfonctionnement des synapses. Les résultats de l'analyse transcriptomique abondent en ce sens avec, comme montré précédemment de nombreux gènes appartenant au *cluster* 2 et 3 qui présentent une baisse d'expression chez les femelles carencées (**Tableau IV et V article**). Il en est de même pour Gria2, une sous-unité des récepteurs glutamatérgiques AMPA exprimés au niveau des membranes post-synaptiques et dont l'expression est elle aussi diminuée chez les MDD ($p \leq 0.05$, **Figure 6-D article**).

3. Conclusion et discussion

Il est connu que la carence précoce en donneurs de méthyles favorise la survenue de pathologies du développement (Mattson and Shea, 2003). De précédents résultats obtenus au laboratoire nous ont permis de mieux comprendre l'impact d'une telle déprivation sur le développement du cervelet et les atteintes fonctionnelles qui en découlent (Blaise et al., 2007; El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Au cours de notre étude, nous avons approfondi la compréhension des mécanismes moléculaires qui se mettent en place en réponse à la MDD au cours du développement du cervelet. Nous avons observé que des groupes de gènes impliqués dans la morphogenèse et la croissance cérébelleuse voyaient leur expression diminuer (**Tableau IV article**). Par ailleurs, de nombreux gènes associés aux fonctions synaptiques et à la croissance des prolongements neuronaux sont eux aussi dérégulés chez les rats issus de mère carencée (**Tableau IV et V article**). Cela pourrait être à l'origine de défauts architecturaux du cervelet tels qu'une diminution de l'épaisseur de la couche granulaire chez les MDD ($p \leq 0.05$, **Figure 3-B article**) et un trop faible nombre de cellules de *Purkinje* ($p \leq 0.05$, **Figure 3-D article**) comme nous l'avons montré ici. Par ailleurs, les voies wnt canoniques (**Figure 4-B article**) et Ca^{2+} -dépendante (**Figure 6 article**) sont elles aussi totalement dérégulées chez les carencées et ce indépendamment de l'activation des récepteurs Fzd par leurs ligands (**Figure 4-A article**). L'importance de ces voies de signalisation dans le développement du cervelet est connue et leurs dérégulations peuvent être à l'origine des anomalies que nous avons mises en évidence.

Enfin, selon l'hypothèse de la programmation fœtale, la MDD a un effet délétère sur la survenues de pathologies neurologiques et neuropsychiatriques chez l'adulte tels que troubles bipolaires, dépression, autisme et schizophrénie (Mattson and Shea, 2003; Obeid, 2013). Le statut en folates est aussi corrélé à l'apparition et la progression de pathologies neurodégénératives au cours du vieillissement (Parkinson, Huntington, Alzheimer; Douaud et al., 2013). Les mêmes liens existent cependant entre les voies wnt et l'incidence de ces pathologies avec par exemple certains polymorphismes ou surexpressions du gène *gsk3b* qui sont associés à la maladie d'Alzheimer (Oliva et al., 2013). Il sera donc intéressant à l'avenir d'aller plus loin dans l'étude de ces interactions, notamment à l'âge adulte afin de

mieux comprendre les effets de la programmation fœtale mais aussi la physiopathologie des troubles précédemment cités.

Wnt-signaling pathways are deregulated in rat female cerebellum following early methyl donor deficiency

Jérèmy Willekens, Sébastien Hergalant, Grégory Pourié, Fabian Marin, Jean-Marc Alberto, Lucie Georges, Justine Paoli, Christophe Nemos, Jean-Luc Daval, Jean-Louis Guéant, Brigitte Leininger-Muller*, Natacha Dreumont*.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 954, Nutrition-Genetics and Environmental Exposure, Medical Faculty and University Hospital Center, Nancy University, Vandoeuvre lès Nancy, France.

Correspondence : Inserm U954, Nutrition-Genetics and Environmental Exposure, Lorraine University, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

brigitte.leininger@univ-lorraine.fr; natacha.dreumont@univ-lorraine.fr

*These authors contributed equally to this work

Short title: Wnt signaling pathways in methyl donor deficiency

List of nonstandard abbreviations

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

APC: *Adenomatous polyposis coli*

CA1: Cornu Ammonis 1

CamKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

Ccd1: Coiled-Coil Protein DIX1

CREB: cAMP response element-binding protein

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

Dvl1: Dishevelled 1

EGL: External granular layer

Egr1: Early growth response protein 1

ER α : Estrogen receptor alpha

FDR: False discovery rate

Fzd: Frizzled

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GO: Gene ontology

GSK-3 β : Glycogen synthase-3 β

Hcy: Homocysteine

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LEF: Lymphoid enhancer factor

MAP1b: Microtubule associated protein-1b

MDD: Methyl donor deficiency

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

P21: Postnatal day 21

PCP: Planar cell polarity

PKC : Protein kinase C

PLC: Phospholipase C

PolII: RNA polymerase II

PSD95: Postsynaptic density protein 95

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer

SAH: S-adenosylhomocysteine

SAM: S-adenosylmethionine

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Syn1: Synapsin 1

TCF: T-cell factor

Abstract

Gestational methyl donor –especially B9 and B12 vitamins- deficiency (MDD) is involved in birth defects and brain development retardation. Molecular mechanisms that take place in response to MDD still remain poorly understood. In this study we took advantage of a validated rat nutritional model and performed a microarray analysis on progeny cerebellum in order to identify which genes and molecular pathways are disrupted in response to MDD. We found that cerebellum development is altered in female pups, with a decrease of the granular cell layer thickness at postnatal day 21. Furthermore, we investigated the involvement of the Wnt-signaling pathway, a major molecular pathway involved in neuronal development and later on in synaptic assembly and neurotransmission mechanisms. We found that Wnt canonical and Ca^{2+} pathways are disrupted following early MDD. Notably, we identified GSK3 β as a pivotal player disturbing synaptic assembly and signaling. These results could explain the structural brain defects previously observed in response to early MDD and highlighted new genes and a new molecular pathway affected by nutritional methyl donor deprivation.

Keywords: methyl donor deficiency, cerebellum, transcriptomics, Wnt signaling pathway, neuroplasticity.

Introduction

Methyl donor deficiency (MDD) during pregnancy results in deleterious effects on brain development in the progeny, including the well-known neural tube defects, as well as learning and memory deficits (Berrocal-Zaragoza et al., 2014). According to the fetal programming hypothesis (Guéant et al., 2013), early MDD displays also long-term effects, occurring during adolescence and later in adulthood and aging, with an increased incidence of cognitive impairments (Smith and Refsum, 2016), and neurological diseases such as anxiety disorders, autism or schizophrenia (Mattson and Shea, 2003).

Metabolic consequences of MDD have been largely described in the literature (Guéant et al., 2013, 2014). A deficiency in methyl donors (essentially vitamin B9, *i.e.* folate, and vitamin B12, *i.e.* cobalamin) results in the accumulation of the neurotoxic amino acid homocysteine (Hcy) and a decrease of the S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio. SAM is the universal methyl group donor used for the transmethylation reactions involved in epigenomic and epigenetic regulations of gene expression, which are altered following MDD (Guéant et al., 2013).

At the cellular level, the deleterious effects of early MDD are strongly related to Hcy accumulation, affecting neurogenesis and synaptic plasticity during the cerebral development (Guéant et al., 2013). In an animal model based on rats born to dams fed a MDD diet during gestation and lactation (Blaise et al., 2007), we reported that Hcy accumulates in the cerebellar Purkinje cells of 21-day-old (P21) rat offspring (Blaise et al., 2007; El Hajj Chehadeh et al., 2014a). We also described the hallmarks of increased apoptosis in selective brain structures of the progeny, including the pyramidal neurons of the CA1 region as well as postnatal neurogenic areas such as the hippocampal *dentate gyrus* (Blaise et al., 2007; Kerek et al., 2013) and the olfactory bulbs (El Hajj Chehadeh et al., 2014a). At the functional level, the rat pups exhibited cognitive defects and an impairment of locomotor coordination (Blaise et al., 2007), the young females being less efficient than the males in the cerebellum-dependent negative geotaxis behavioural test (Pourié et al., 2015). In addition to its well-known role in motor coordination, the cerebellum is also involved in cognitive tasks (attention, emotional behaviour) through the coordination of the cortico-thalamic-cerebellar-cortical circuit (Bugalho et al., 2006). Recent studies showed its implication in psychiatric disorders such as anxiety, autism and

schizophrenia(Schmahmann et al., 2007). At the molecular level, we observed a strong decrease of neurosteroidogenesis and the related cAMP-mediated signaling pathway, in association with a decreased expression of estrogen receptors(El Hajj Chehadeh et al., 2014b) and synapsins, which are involved in the regulation of neurotransmitter release at the synapse(Pourié et al., 2015), in a sex-dependent manner, females being more affected than males.

As pinpointed above, the cerebellum is particularly affected by early MDD or exposure to other environmental factors, since cerebellar maturation mainly occurs during the postnatal period and is achieved around the third postnatal week(Ranade et al., 2012; Sillitoe and Joyner, 2007). The cerebellum contains relatively few cell types and its architecture is somewhat simple compared with other brain structures, with 3 layers composing the cerebellar cortex: the innermost granular layer, the middle Purkinje cell layer and the outermost molecular layer. The principal cytostructure is set during early development but neurogenesis and axonogenesis take place after birth. During the first two postnatal weeks, Purkinje cells undergo maturation by developing dendritic trees and synaptic connections, and form a single cell layer. The granular cells (representing about half the number of total neurons in the brain) migrate after birth from the external granular layer (EGL) to enter the molecular layer and finally reach their final destination. Among the cellular pathways involved in postnatal cerebellum development, the Wnt pathway plays a critical role in regulating cellular growth and differentiation, allowing synapse formation and axon guidance(Lucas and Salinas, 1997; Salinas et al., 1994). Wnt ligands are recognized by their cell surface receptors and through several cytoplasmic components, notably glycogen synthase-3 β (GSK3 β), signal to β -catenin, which enters the nucleus and co-activates transcription of target genes to regulate cell fate decision (**Figure 1A**). In addition, Wnt signaling regulates microtubule cytoskeleton through a divergent branch of this canonical pathway (**Figure 1B**). Two non-canonical pathways, the planar cell polarity (**Figure 1C**) and the calcium pathways (**Figure 1D**) are independent of GSK3 β and β -catenin, and control cell polarity and regulate cell movement, respectively. Wnt family proteins do not only regulate early embryonic development. Recent evidence suggests that they also modulate synaptic development and function. In the cerebellum, Wnt-7a is expressed in granular cells at the time when mossy fiber axons make synaptic contact with granular cells(Lucas and Salinas, 1997), thereby regulating axon remodeling and synaptic

differentiation. Wnt-3a expression in Purkinje cells increases postnatally as granular cells start to make contacts with Purkinje cells and is restricted to these cells in adult mouse (Salinas et al., 1994).

Despite the numerous consequences of an early MDD on the development of the central nervous system, the molecular mechanisms underlying cellular response to MDD remain poorly understood, even more in the cerebellum. Here we investigated the impact of MDD on cerebellum development in female rats (these being more affected than males) by carrying out whole transcriptome analysis, with the aim of identifying new genes and molecular pathways associated with the functional alterations previously observed (Blaise et al., 2007; Pourié et al., 2015).

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed on Wistar rats (Janvier Labs) in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in an accredited establishment (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 954) according to the UE guidelines 2010-63-UE and to French governmental decree 2013-118. Adult rats were maintained under standard laboratory conditions on a 12h light / dark cycle with access to food and water ad libitum. One month before pregnancy, female rats were fed either a standard diet (A04 Standard Diet, Safe, Augy, France), or a diet deficient in folate and vitamin B12 and lowered in choline (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). These diets were maintained until the offspring was weaned at postnatal day 21 (P21).

Tissue Collection

Rat pups were euthanized at P21 with an overdose of isoflurane. Intracardiac blood samples were drawn for the measurement of Hcy plasma concentrations. Cerebellums were harvested and kept frozen in liquid nitrogen until biochemical analyses. For immunohistofluorescence analyses, brains were fixed with paraformaldehyde 4% for 24h,

washed 3 times in PBS 1×, dehydrated in a sucrose gradient (10 to 30%) and finally frozen in methylbutane previously chilled to -30 °C and stored at - 80°C.

Biochemical Analyses

Plasma concentrations of vitamins B9 and B12 were determined using a radioisotope dilution assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals, Laval, France) as previously described (6). Concentrations of Hcy, SAM and SAH were measured using high-performance liquid chromatography as previously described (17).

Microarray experiment

Total RNA was extracted from 20 mg of grinded cerebellum from female P21 pups (control, N=4; MDD, N=3) using TriZol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's recommendations. RNA was further digested with Turbo DNase (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) and phenol-chloroform extracted. Quality of total RNAs was attested by O.D.260 nm / O.D.280 nm and O.D.260 nm / O.D.230 nm determination by spectrophotometry using a Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies; Wilmington, DE, USA) and using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Massy, France). The samples with a RNA integrity number > 8 were selected. RNA samples were aliquoted and stored at -80 °C for subsequent microarray.

Microarray experiments were performed following the minimal information about a microarray experiment criteria (18). Briefly, RNA samples were amplified, and labeled using the one-color microarray-based gene expression labeling kit (Agilent Technologies; Massy, France) following the manufacturer's instructions. The RNA was denatured and reverse transcribed to cDNA. The cDNA was transcribed *in vitro* to RNA using T7 RNA polymerase and labeled with fluorescent cyanine 3-CTP. The fragmented cRNA was hybridized to a G4853A SurePrint G3 Rat GE 8X60K microarray (Agilent Technologies; Massy, France). The microarrays were performed in triplicate and washed, stabilized, and dried using acetonitrile and stabilization and drying solution (Agilent Technologies; Massy, France). The slides were scanned and the images were extracted using feature extraction software version 9.5.3 (Agilent Technologies; Massy, France).

Bioinformatic analysis

Raw expression values were extracted from the Agilent data files, control probes were removed and the 58,717 remaining probes were fully annotated at transcript and gene levels with up to date symbols using the local rat Ensembl database (core and funcgen 83_6) (19). Non-linear effects such as background or saturation were corrected by the Lowess algorithm (20) against a median profile of all 7 samples. Hierarchical clustering (performed with Cluster3.0 (21)) was then used to identify clusters of co-expressed genes from the whole dataset, on log-transformed and gene-median-centered data, using uncentered Pearson's correlation as similarity metric. From the gene clustering tree, sets separating Control (N=4) and MDD (N=3) samples were delineated and a collective p-value (Student t-test) was computed between each group, hence allowing us to dismiss multi-testing correction. For each selected gene cluster, functional annotations were obtained with GoMiner (22) on the Gene Ontology (GO) database (October 2016 version). Enrichment of GO terms was determined as follows: Enrichment = frequency of GO term in the cluster/frequency of GO term in the whole chip.

Measurement of granular cell layer thickness and Purkinje cell counting

After 4,6-diamidino-2-phenylindole nuclear fluorescent dye (DAPI) staining, 12 μm sagittal brain sections were observed under fluorescence microscopy (BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan) at $\times 20$ magnification. All measurements were performed in the cerebellar VII lobule using ImageJ v1.49. The thickness of the granular layer was determined by measuring the maximum distance separating the two outermost points at the extremity of the lobule (*a* distance). The *b1* and *b2* distances (which were averaged and called *b*) were determined from the inside to the outside of the granular layer on the side of the lobule, forming a right angle with the greater distance *a*.

The number of Purkinje cells per microscope field was determined after specific staining with calbindin D28 and reported to 1000 μm^2 .

Immunohistofluorescence

Immunohistofluorescence analyses were carried out on cryostat-generated, 12 μ m sagittal brain sections mounted onto glass slides. For immunostaining, tissue sections previously fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for 15 min at room temperature were permeabilized for 10 min in PBS-0.1 % Triton. After three washes in PBS of 5 min each, nonspecific binding was prevented by incubation in PBS-BSA 10 % (w/vol) for 1 h. Tissue sections were further incubated for 48 h at 4 °C with primary antibody (**Table I**) used at a 1:200 dilution. Brain slices were then incubated for 2 h at room temperature in the presence of the secondary antibody (**Table I**). All slides were counterstained with DAPI (0.5 mg/ml in PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Slides were observed under fluorescence microscopy (BX51WI; Olympus, Tokyo, Japan) at $\times$ 20 magnification, and pictures were taken *via* a digital camera and the cellF software (Soft Imaging System; Olympus, Tokyo, Japan).

Western Blot analyses

Nitrogen-frozen cerebellum samples were solubilized in RIPA lysis buffer containing 140 mM NaCl, 0.5 % (w/v) sodium deoxycholate, 1 % (v/v) Igepal CA630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 0.1 % (w/v) sodium dodecyl sulfate, and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Samples were then homogenized in a ultrasonic bath during 30 min and finally centrifuged at 4 °C for 30 min at 18 000 *g*.

Thirty micrograms of proteins were mixed with an equal volume of 2 $\times$ Laemmli buffer, denatured by heating for 5 min at 95 °C, and then resolved by 10 % SDS-PAGE. The separated proteins were then transferred onto nitrocellulose membrane (GE healthcare Life Sciences, Marlborough, Massachusetts, USA) and blocked for 1 h under shaking with Tris-buffered Saline solution (20 mM Tris and 150 mM NaCl, pH = 7.4) and 0.1 % Tween-20 containing 5 % (w/v) bovine serum albumin. The membranes were finally incubated with different primary antibodies at 4 °C overnight (**Table I**). Secondary peroxidase-labeled antibodies (**Table I**) were used at a 1: 10, 000 dilution and were incubated with the membranes for 1 h at room temperature. Immunoreactivity was detected with a chemiluminescence kit (ECL Plus, GE healthcare Life Sciences, Marlborough,

Massachusetts, USA) and a chemiluminescence detector (Fusion FX7; Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). The total amount of proteins per lane was normalized using GAPDH or vinculin antibody (**Table I**) and densitometric analysis of the Western blot band intensity was achieved using ImageJ v1.49.

Quantitative RT-PCR analysis

One microgram of total RNA was subjected to 2-step RT-qPCR using the PrimeScript™ RT Master Mix and

SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara, Kusatsu, Japan) following the manufacturer's specifications. Real-time PCR was performed on the Applied Biosystems 7500 instrument (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) using the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Ccd1 primers were ordered from Biorad, Hercules, California, USA (PrimePCR™ SYBR® Green Assay: Dixdc1, Rat, qRnoCID0004096). Cycle threshold (Ct) was determined for each sample and Real-time PCR amplification efficiencies were expressed by calculating the ratio of crossing points of amplification curves. The expression of the genes of interest was normalized to that of gapdh and kansl2 using the 2-ΔΔCt method.

Determination of free intra-tissular calcium

Free intra-tissular calcium concentration was measured with Calcium Detection Kit Colorimetric (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Twenty mg of grinded cerebellum were lyzed on ice in Calcium Assay Buffer. After 3 min of centrifugation at 10 000 g and 4 °C, supernatants were collected and 50 µL of each sample were deposited in a 96-well plate. Ninety µL of Chromogenic Reagent and 90 µL of Calcium Assay Buffer were added to each sample as recommended by the manufacturer. A standard curve was performed in parallel with Calcium Standard and O.D. was finally measured at 575 nm.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed under RStudio, version 1.0.143. Continuous variables and densitometric analyses of Western blots were reported as means $\pm$ SD. Equality of variances was checked by Fisher's test. Differences between control and MDD groups were assessed with Student t-test. A p value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

SAM/ SAH ratio and vitamins B9 and B12 concentrations

As previously described, when female pups were fed by dams receiving the deficient diet, plasma levels of vitamins B9 and B12 were reduced compared to controls, with a concomitant increase of Hcy levels (**Table II**). The universal methyl donor SAM, generated through the methionine cycle, is demethylated to form SAH, which is finally hydrolyzed into Hcy. SAM concentration remained unchanged whereas SAH concentration was higher in MDD compared to control females (**Table II**). The SAM/SAH *ratio* was therefore lower in deficient females compared to controls (**Table II**).

Transcriptomic analysis of early MDD effects on the female rat cerebellum

We compared the whole transcriptome in control and MDD animals by applying hierarchical clustering, which separated the two groups distinctly (**Figure 2**). In addition, three distinct gene signatures with highly correlated expression profiles were delineated (**Figure 2**). The first one comprised 1875 unique genes (cluster C1) that are upregulated in MDD ($p < 0.05$). The two others contained respectively 1144 (cluster C2) and 602 (cluster C3) unique genes, downregulated in MDD vs the controls ($p < 0.05$; **Figure 2**).

Functional annotations revealed that upregulated C1 genes, in addition to glutathione metabolism and ribosome and translation, were mostly related to mitochondria, with functions such as proton transport coupled to ATP synthesis, oxidative phosphorylation and respiratory chain IV complex assembly (FDRs < 0.001 ; **Table III**). In contrast, downregulated genes in clusters C2 and C3 were related to cerebellum development (mostly

in C2) and synaptic plasticity (mostly in C3), and regulation of neurotransmitter release (FDRs < 0.001; **Tables IV and V**). We also identified functional terms related to RNA pol II co-activator activity and histone demethylation in C2, and poly(A) RNA binding in C3 (FDRs < 0.001 ; **Tables IV and V**).

Methyl donor deficiency reduces the granular cell layer thickness and the number of Purkinje cells

Interestingly, among the top hits of downregulated functions in MDD females, we found granular and Purkinje cell layer formation (GO IDs 21684 and 21692; FDRs < 0.001; **Table II**), suggesting that the cytoarchitecture of the cerebellum could be affected by MDD. We therefore measured the thickness of the granular cell layer in lobule VII (**Figure 3A**), at the extremity of it (distance *a*; **Figure 3A**) and on both sides (distance *b*; **Figure 3A**). We found that the thickness was significantly reduced in P21 female MDD pups compared to age-matched control females, for both measurements (**Figure 3B**). Similarly, the number of Purkinje cells, visualized by a specific staining with the calbindin D28 marker (**Figure 3C**), was also decreased in MDD compared to control females (about 2-fold; $p < 0.05$; **Figure 3D**).

Methyl donor deficiency affects the Wnt canonical pathway

In addition to cerebellum development, many GO terms for the downregulated genes in MDD were related to synaptic functions (**Tables IV and V**). Moreover, Wnt-signaling pathway (GO ID 160055, FDR < 0.005; **Table IV**) was also identified among these terms. We further investigated this important pathway, as both canonical and non-canonical pathways play key roles in neuronal connectivity by regulating axon guidance, dendritic development, axon remodeling and synapse formation (**Figure 1**; (Salinas and Zou, 2008)).

We first assessed the expression level of two ligand proteins, Wnt-3a and Wnt-7a, known to be expressed in the Purkinje and the granular cells, respectively. Western blot analyses revealed no change in the expression level of Wnt-7a or Wnt-3a (**Figure 4A**) between MDD and control pups. However, we observed a two-fold increase of GSK-3 β , and a concomitant decrease of β -catenin levels in cerebellum extracts from MDD females compared to controls

(Figure 4B). These two proteins are key regulators of the canonical pathway, as GSK3- β regulates the expression level of β -catenin, which after translocation in the nucleus forms the β -catenin-T-cell factor (TCF) transcription complex that activates the expression of genes involved in proliferation **(Figure 1)**. Indeed, we observed a two-fold decrease in the level of MYC and cyclin D1 proteins **(Figure 4B)**, two major targets of the Wnt-canonical pathway.

Wnt signaling has also been shown to regulate cytoskeleton through a divergent canonical pathway, independent of TCF-mediated transcription. In this case, GSK-3 β phosphorylates microtubule associated proteins such as MAP1B(Lucas et al., 1998). In agreement with the increased level of GSK-3 β **(Figure 4B)**, we observed more phosphorylated MAP1B in MDD females compared to controls **(Figure 6B)**.

Taken all together, these data show a dysregulation of the Wnt-canonical pathway in response to MDD in female cerebellum at P21.

Methyl donor deficiency affects the Wnt-Ca²⁺ pathway but not the PCP pathway

Independently of β -catenin, non-canonical Wnt pathways have been described: the planar cell polarity (PCP) and the Wnt-Ca²⁺ pathways **(Figure 1)**. In addition to cell fate, tissue polarity and cell movement, these were shown to be involved in dendritogenesis and the regulation of postsynaptic region(Inestrosa and Arenas, 2010). We therefore asked whether these pathways were also dysregulated, in addition to the Wnt-canonical signaling pathway.

The Wnt/PCP pathway is activated by the binding of Wnt proteins to their receptor, resulting in the activation of the small GTPases Rho and Rac, and finally the activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK). For this reason, we estimated the expression level in cerebellum extracts from MDD and control females of the active (phosphorylated) form of the axon-growth promoting protein kinase JNK. As shown in **Figure 5A**, we did not observe any change in the phosphorylated JNK level in MDD compared to control females, suggesting that the PCP pathway was not affected by deficiency. We also tested the expression level of *Ccd1*, which codes for an actin-binding protein, and was reported to positively regulate the Wnt-signaling pathway(Shiomi et al., 2003) and to activate JNK, thereby promoting axonal growth and parallel fiber development(Ikeuchi et al., 2009). *Ccd1*

was one of the underexpressed genes in cluster C2, and thus found in several of the downregulated GO functional families related to neuron projection in MDD females (**Table IV**). As measured by RT-qPCR, the expression level of *Ccd1* was reduced in MDD females (**Figure 5B**). This was in agreement with the decreased expression level of P300, the transcriptional coactivator of *Ccd1* (**Figure 5C**). However, the expression of the CCD1 protein remained unchanged between MDD and control females (**Figure 5D**).

Contrary to the PCP pathway, the Wnt-Ca²⁺ signaling pathway seemed to be affected by MDD, as we measured a significantly decreased intra-tissular Ca²⁺ concentration in the MDD female cerebellum (**Figure 6A**). This was in agreement with the previously reported diminution of phosphorylated PKC level in MDD female cerebellum (El Hajj Chehadeh et al., 2014b). Surprisingly, the level of CaMKII, a Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase, was elevated in MDD compared to control females (**Figure 6C**). Interestingly, levels of one subunit of the glutamatergic AMPA receptors that are present at the postsynaptic density were reduced in MDD compared to control females, suggesting alterations at the post-synaptic level (**Figure 6D**).

Discussion

Reduced intake of methyl donor nutrients (essentially vitamins B9 and B12) has been implicated in alterations of neurodevelopment, as well as in several neurological and psychological diseases, albeit the underlying mechanisms remain poorly understood. Our study showed that the Wnt canonical and Ca²⁺ pathways are deregulated in female cerebellum at P21, following exposure to vitamins B9 and B12 deficiency, likely contributing to the defects observed in synaptic assembly and signaling at the transcriptome level.

Functional alterations discovered so far in the brain of female pups born to dams fed a diet deficient in vitamins B9 and B12 affect mainly the hippocampus and the cerebellum. Notably, Hcy accumulates predominantly in the granular layer and in Purkinje cells (Blaise et al., 2007; El Hajj Chehadeh et al., 2014b). Previous studies in our laboratory demonstrated an impaired locomotor coordination in pups exposed to the deficient diet (Blaise et al., 2007). Nevertheless such a deficient behavior appeared rather transient

than strong or permanent, suggesting a developmental retardation involving gene expression and cellular pathways downregulation(El Hajj Chehadeh et al., 2014b; Pourié et al., 2015). These observations indicate that the cerebellum is particularly sensitive to MDD during the embryonic period and early after birth.

In order to identify new genes and pathways involved in the functional alterations observed in the cerebellum following MDD, we performed a transcriptional analysis at P21, at the time when the cerebellum is ending its maturation. The cerebellum undergoes several major structural transformations during embryonic development, and by embryonic day 18.5, it has acquired its three-dimensional architecture. At birth, a rudimentary set of synaptic connections has begun to become organized, and the cerebellum has established all its cell types in 3 layers around P16 in rodents(Sillitoe and Joyner, 2007). The granular cell layer forms postnatally as cells from the EGL, present at the cerebellar surface, seed the internal (and final) granular layer. The EGL ceases to exist by the end of the third postnatal week in rodents. At this period, two major extrinsic inputs to the cerebellar cortex mature with the climbing fibers connecting to the Purkinje cells and the mossy fibers to the granule cells(Goldowitz and Hamre, 1998). These are the major excitatory cell types found in the cerebellum, all using glutamate as their neurotransmitter. Wnt signaling plays a major role in axon pathfinding, dendritic development, synapse assembly and the modulation of synaptic transmission in the central nervous system(Oliva et al., 2013).

Results from the transcriptomic analysis indicated that Wnt signaling pathway was deregulated in MDD females. Indeed, by western blot analyses, we observed that GSK3 β level was increased in the cerebellum of MDD female pups compared to controls, resulting in a subsequent reduction of β -catenin levels, and a decreased expression of well-known target genes of the Wnt canonical signaling pathway involved in cell proliferation (c-Myc and Cyclin D1, **Figure 4**). This could result in decreased cell proliferation, accounting for the observed reduced thickness of the granular cell layer and the decreased number of Purkinje cells in the cerebellum of MDD pups (**Figure 3**), in agreement with the downregulated functions identified by transcriptomics (**Table IV**). There exists a tight regulation of the *ratio* of Purkinje cells to granule cells, with the number of Purkinje cells determining the size of the granule cell population(Sillitoe and Joyner, 2007). According to this, our observations suggest that the reduced number of Purkinje cells could be the primary event, resulting in the reduced size of the granular cell layer. Apoptosis is probably not

involved in this process, as we previously observed no difference in the cerebellum using an apostain marker in MDD female pups compared to controls(Pourié et al., 2015).

In addition to its role in regulating the availability of β -catenin, GSK3 β directly phosphorylates several microtubule-associated proteins that regulate microtubule stability, such as Tau or MAP1B(Lucas et al., 1998). This role of Wnt signaling in modulating microtubule cytoskeleton could contribute to synaptic assembly and glomerular rosette assembly in particular. Indeed, following GSK3 β increased expression in the cerebellum of MDD females, we detected an increased phosphorylation of MAP1B. This could result in a reduction of the formation of microtubule loops within the growth cone, and a less efficient growth cone pausing and enlargement(Ciani et al., 2004); contributing to the disruption of excitatory synapse assembly, as indicated by the transcriptomics. In addition, it was shown that Wnt could also regulate microtubule stability through JNK. However, we did not detect any change in the level of activated (phosphorylated) JNK between control and MDD pups. We also investigated the expression level of the actin-binding protein Ccd1, which was identified in many of the GO terms related to the synapse (**Table IV**). This protein was reported to activate JNK and play an essential role in parallel fiber development(Ikeuchi et al., 2009). Despite a reduced expression level of its co-activator P300 and a resulting diminished mRNA expression level, Ccd1 protein expression was not affected by the restrictive diet, suggesting (i) a post-transcriptional regulation of *Ccd1* expression, and (ii) that JNK pathway is globally not affected by MDD at P21.

Wnt-7a, released by granule cells, acts on mossy fibers to promote the formation of the glomerular rosette, the accumulation of synaptic components, such as Synapsin 1 (Syn1) to future pre-synaptic sites(Hall et al., 2000), and synaptic vesicle recycling(Ahmad-Annuar et al., 2006), through the canonical pathway and GSK3 β . Syn1 is involved in synaptogenesis, axonogenesis and the modulation of neurotransmitter release, and associates with the cytoplasmic surface of pre-synaptic vesicles. Interestingly, we previously reported a decrease of Syn1 level in the cerebellum of MDD females at P21(Pourié et al., 2015). We showed that this was due to a disruption of the ER α signaling pathway, resulting in a decreased expression of Egr1, the transcription factor regulating Syn1(Pourié et al., 2015). Our present results suggest that in addition to ER α , Wnt canonical signaling pathway could also participate in the regulation of Syn1 expression, as Wnt-7a

was reported to increase Syn1 level in cultured granule cells, an effect mediated through GSK3 β (Lucas et al., 1998).

At post-synaptic level, Wnt signaling promotes the recruitment of postsynaptic components, with an increase clustering of the scaffold protein PSD95(Ciani et al., 2011), a marker of postsynaptic activity involved in signal transduction of excitatory receptors. PSD95 levels are reduced in cerebellum protein extracts of females exposed to MDD(Pourié et al., 2015). We also observed less Gria2 protein, a subunit of the glutamatergic AMPA receptors that are present at the postsynaptic density. These observations could be due to the altered Wnt/Ca²⁺ signaling originating from a reduced Ca²⁺ content, a decreased activation of PKC(El Hajj Chehadeh et al., 2014b), and a decreased expression of transcription factors such as P300 (our present results) or CREB(El Hajj Chehadeh et al., 2014b).

The deregulation of Wnt canonical and Ca²⁺ pathways are not caused by a reduced level of either Wnt-7a or Wnt-3a, which are expressed in granular cells and Purkinje cells, respectively. The link between MDD and Wnt could be at the epigenetic or epigenomic level, as MDD is known to alter gene expression through these processes(Guéant et al., 2013). Interestingly, among the downregulated functions in MDD females, we identified histone lysine methylation and polII transcriptional activity. Preliminary results (data not shown) in our lab showed that several histone marks (for example, H₃K₃₆Me₃ or H₃K₄Me₂) were globally reduced in the cerebellum of P21 MDD female pups, while others are more present (H₄K₁₆Ac). Chromatin-immunoprecipitation analysis will help reveal whose genes that are specifically affected. An alteration in histone methylation is not surprising as methyl donors are necessary for the synthesis of SAM, the universal methyl donor used for the transmethylation of proteins, histones in particular. This could contribute to the altered expression of GSK3 β , with the subsequent deregulation of the Wnt canonical pathway.

Studies from human populations and experimental models suggest a role for MDD in the development of several neurodegenerative diseases, such as Parkinson disease, and also for psychiatric disorders, for example depression, bipolar disorder or schizophrenia(Mattson and Shea, 2003). This association between MDD and these diseases could be due in part to an increased GSK3 β that is itself linked to the same neurological disorders and neurodegeneration. Indeed, polymorphisms in *GSK3B* have been implicated in Parkinson disease and *GSK3B* overexpression may be relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease(Oliva et al., 2013). GSK3 β seems to be an essential player since lithium, which is

widely used to treat mood disorders, activates the canonical pathway through GSK3 β inhibition, hence inducing neurogenesis as well as improving behavior(Oliva et al., 2013). This possible link between MDD, neurodegenerative and neurological disorders, and GSK3 β is an interesting avenue that deserves attention for future investigations, notably in older animals.

Author's contributions

N. Dreumont, B. Leininger-Muller, J. L. Daval and J. L. Guéant designed research. J. Willekens, S. Hergalant, G. Pourié, F. Marin, J. M. Alberto, L. Georges, J. Paoli, C. Nemos, and N. Dreumont performed research. J. Willekens, S. Hergalant, G. Pourié, C. Nemos, B. Leininger-Muller and N. Dreumont analyzed data. J. Willekens, B. Leininger-Muller and N. Dreumont wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Institutional grants were received from the Region of Lorraine (France).

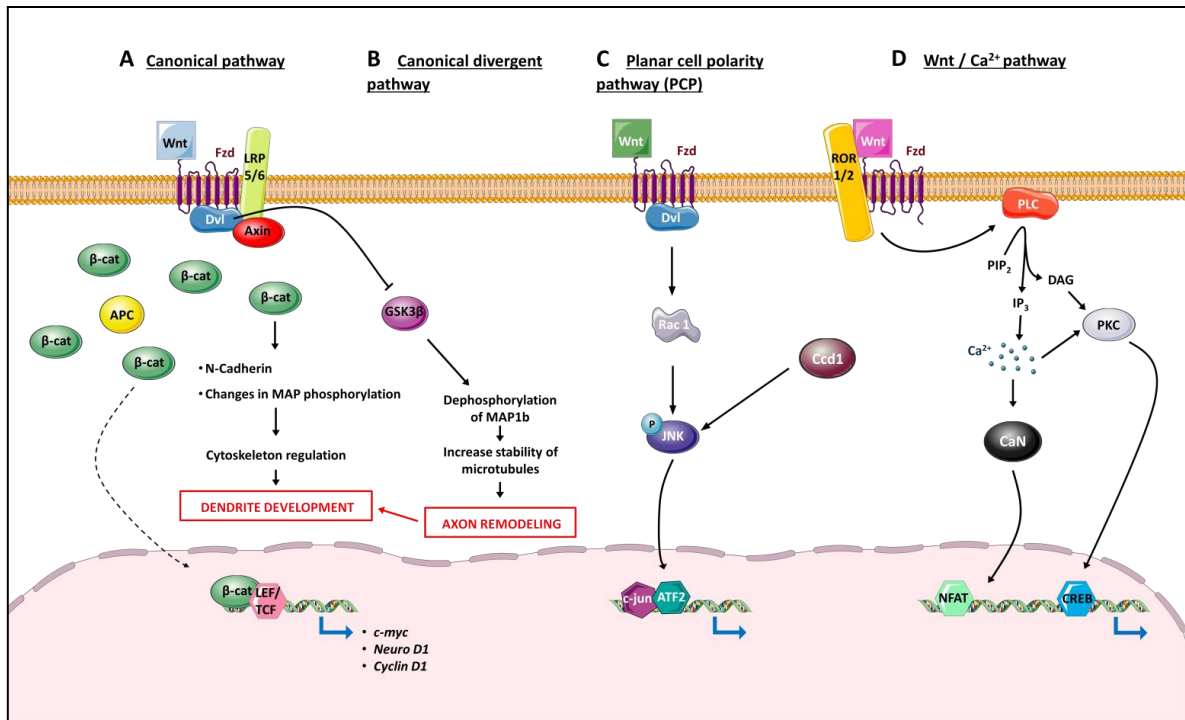


Figure 1: The Wnt signaling pathways

Four different Wnt-signaling pathways have been reported. Two of them involve the kinase GSK-3β: the canonical and the canonical divergent pathways. The other pathways are called non-canonical: the planar cell polarity pathway (PCP) and the Ca²⁺ pathway.

(A) In the canonical β-catenin pathway, the activation of the frizzled (Fzd) receptor by a Wnt extracellular ligand allows the recruitment of Disheveled-1 (Dvl1) and Axin proteins at the membrane, which causes the dislocation of the cytoplasmic protein complex composed of β-catenin, GSK-3β, APC, Dvl1 and Axin. The consequence is that β-catenin is no longer degraded and can accumulate in the cytosol and then translocate into the nucleus where its interaction with the LEF/TFC transcription factor will activate Wnt/β-catenin target genes expression (*i.e.* *c-myc*, *Cyclin D1*).

(B) Inhibition of GSK-3β will also trigger the canonical divergent pathway and lead to an increase of microtubule stability *via* MAP1b dephosphorylation. This could lead to axon remodeling and dendrite development.

(C) The PCP pathway initiates with Fzd activation by extracellular Wnt ligand and involves the activation -by phosphorylation- of JNK by Rac1, which causes PCP pathway target gene

expression. JNK can also be activated by Ccd1 that acts as a positive regulator of PCP pathway. Furthermore, JNK also can stabilize cytoskeleton and promote axonal growth.

(D) The Ca^{2+} pathway is activated when an extracellular Wnt ligand binds to Fzd and when ROR 1/2 is recruited. It leads to Ca^{2+} liberation *via* PLC activation. CamKII is a Ca^{2+} dependent kinase that can indirectly allow Ca^{2+} pathway target genes *via* NFAT activation.

Table I: List of the antibodies used in the study

Target	Source	Reference
Alexa Fluor 594 donkey anti Goat	Abcam	ab150136
Anti-mouse IgG	Jackson Immuno (Interchim)	715-035-151
Anti-rabbit IgG	Jackson Immuno (Interchim)	711-035-152
Calbindin D28	Santa Cruz Biotechnology	sc-7691
CamKII	Gentex	GTX111401
Ccd1	Proteintech	13816-1-AP
C-myc	Santa Cruz Biotechnology	sc-788
Cyclin-D1	Cell Signaling Technology	2926
GAPDH	Abcam	ab9482
Gria2	Abcam	ab133477
GSK-3 β	Cell Signaling Technology	9315
JNK	Cell Signaling Technology	9252
P300	Santa Cruz Biotechnology	sc585
phospho SAPK/JNK (thr 183/tyr185)	Cell Signaling Technology	9251
Vinculin	Chemicon	MAB3574
β -catenin	Cell Signaling Technology	9581

Table II: Effects of the diet on plasmatic concentrations of homocysteine and homocysteine determinants in 21 day-old female rat progeny.

	B9 (nM)	B12 (pM)	Hcy (μM)	SAM (nM)	SAH (nM)	SAM / SAH
Control	48.8 ± 3.5	841.8 ± 17.2	6.50 ± 0.88	440.2 ± 29.3	84.2 ± 6.8	5.27 ± 0.33
MDD	20.1 ± 2.8*	262.2 ± 12.4*	13.86 ± 2.67*	390 ± 20.3	135.6 ± 17.1*	3.31 ± 0.36*

Data are means ± SEM, *N* = 11 per group, * *p* ≤ 0,05

Hcy: Homocysteine; **Met:** Methionine; **SAM:** S-Adenosylmethionine; **SAH:** S-Adenosylhomocysteine

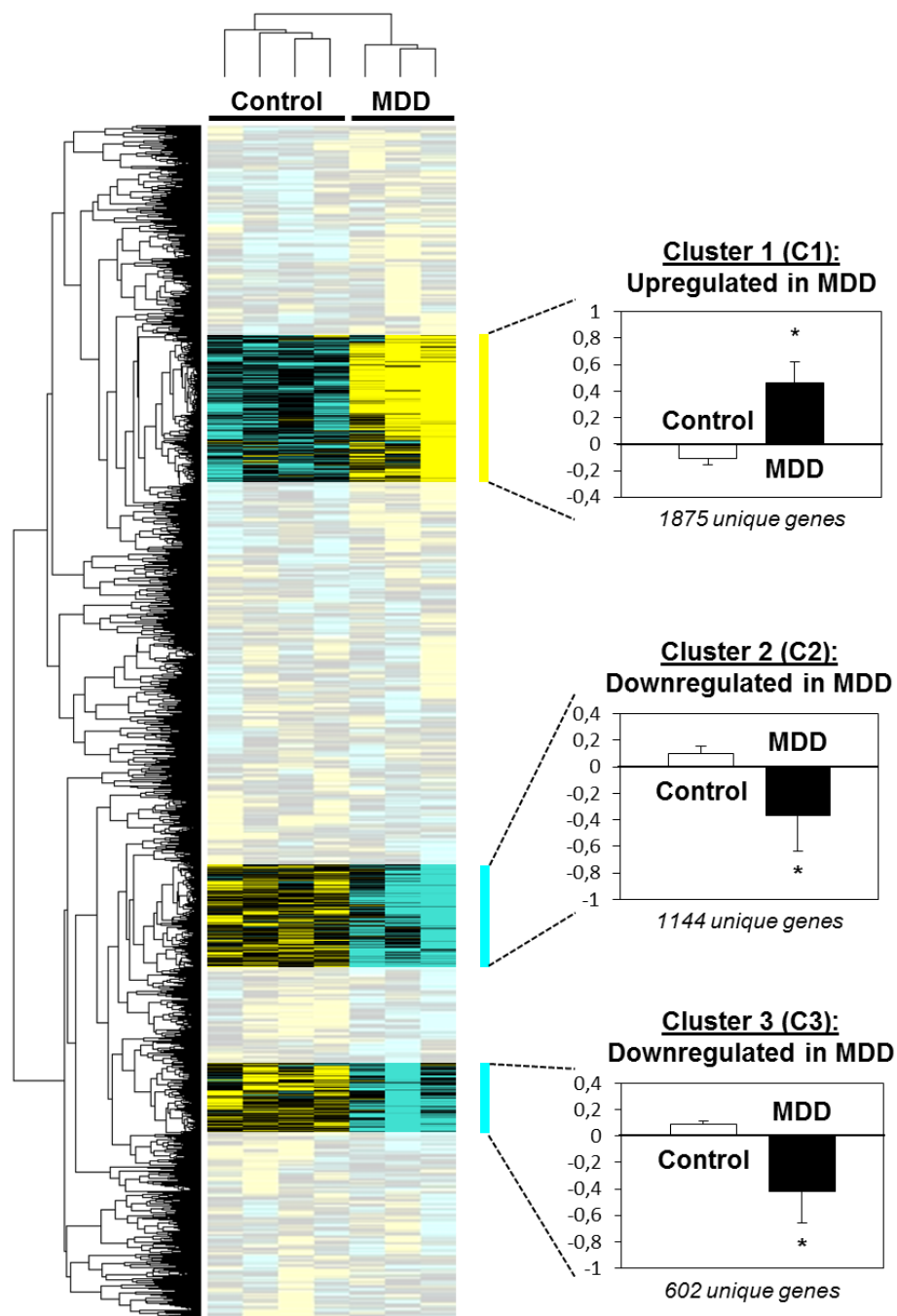


Figure 2: Consequences of MDD diet on the cerebellum transcriptome of 21-day-old female rats

Hierarchical clustering of the whole transcriptome uncovered three significant gene signatures. Left panel: Heatmap with gene and sample trees. Gene expression is presented as a colored matrix (blue: downregulated genes; yellow: upregulated genes; black: median genes). **Right panels:** Overall differential expression for each cluster of co-expressed genes. Expression values are log2-centered.

Table III: Most enriched functional terms for the upregulated gene signature C1 in the cerebellum of female rat progeny subjected to methyl donor deficiency (FDRs were obtained by bootstrapping 50 times).

GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
6558	12	8	5.952	0	0	L-phenylalanine metabolic process
70129	14	8	5.102	0	0.0011	regulation of mitochondrial translation
42776	14	8	5.102	0	0.0011	mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport
33617	14	8	5.102	0	0.0011	mitochondrial respiratory chain complex IV assembly
1901685	16	9	5.022	0	8.00E-04	glutathione derivative metabolic process
313	85	40	4.201	0	0	organellar ribosome
5761	78	36	4.121	0	0	mitochondrial ribosome
70124	64	28	3.906	0	0	mitochondrial translational initiation
70126	69	30	3.882	0	0	mitochondrial translational termination
17004	28	12	3.826	0	0.0012	cytochrome complex assembly
70125	73	30	3.669	0	0	mitochondrial translational elongation
6415	79	32	3.616	0	0	translational termination
44391	120	47	3.497	0	0	ribosomal subunit
2479	44	16	3.246	0	0	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent
6414	95	34	3.195	0	0	translational elongation
5840	160	57	3.181	0	0	ribosome
33108	62	21	3.024	0	0	mitochondrial respiratory chain complex assembly
6614	54	18	2.976	0	8.00E-04	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane
45047	59	19	2.875	0	8.00E-04	protein targeting to ER
51439	50	16	2.857	1.00E-04	0.0017	regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle
5746	50	16	2.857	1.00E-04	0.0017	mitochondrial respiratory chain
6119	81	22	2.425	1.00E-04	0.001	oxidative phosphorylation

Table IV: Most enriched functional terms for the downregulated gene signature C2 in the cerebellum of female rat progeny subjected to methyl donor deficiency (FDRs were obtained by bootstrapping 50 times).

GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
1904861	9	6	8.505	0	3.00E-04	excitatory synapse assembly
97470	9	6	8.505	0	3.00E-04	ribbon synapse
90129	8	5	7.974	1.00E-04	0.0019	positive regulation of synapse maturation
97119	10	6	7.655	0	9.00E-04	postsynaptic density protein 95 clustering
32239	11	6	6.959	1.00E-04	0.0011	regulation of nucleobase-containing compound transport
70571	12	6	6.379	1.00E-04	0.0019	negative regulation of neuron projection regeneration
21683	15	7	5.954	1.00E-04	0.0011	cerebellar granular layer morphogenesis
32452	18	8	5.670	0	7.00E-04	histone demethylase activity
21692	19	8	5.372	0	8.00E-04	cerebellar Purkinje cell layer morphogenesis
70076	17	7	5.253	2.00E-04	0.0019	histone lysine demethylation
21681	17	7	5.253	2.00E-04	0.0019	cerebellar granular layer development
21697	29	11	4.839	0	3.00E-04	cerebellar cortex formation
21533	30	11	4.678	0	3.00E-04	cell differentiation in hindbrain
1105	33	12	4.639	0	4.00E-04	RNA polymerase II transcription coactivator activity
35371	22	8	4.639	2.00E-04	0.002	microtubule plus-end
21587	46	16	4.438	0	0	cerebellum morphogenesis
98815	33	11	4.253	0	7.00E-04	modulation of excitatory postsynaptic potential
21575	54	16	3.780	0	0	hindbrain morphogenesis
35176	52	15	3.680	0	3.00E-04	social behavior
2000171	35	10	3.645	3.00E-04	0.0045	negative regulation of dendrite development
45773	46	12	3.328	2.00E-04	0.002	positive regulation of axon extension
60079	59	15	3.244	0	7.00E-04	excitatory postsynaptic potential
99565	69	16	2.958	1.00E-04	0.0011	chemical synaptic transmission, postsynaptic
60078	70	16	2.916	1.00E-04	0.0013	regulation of postsynaptic membrane potential
35249	68	15	2.814	2.00E-04	0.0031	synaptic transmission, glutamatergic
21549	126	27	2.734	0	0	cerebellum development
51899	75	16	2.722	2.00E-04	0.0029	membrane depolarization
7269	129	27	2.670	0	0	neurotransmitter secretion
99531	135	28	2.646	0	0	presynaptic process involved in chemical synaptic transmission

60076	193	40	2.644	0	0	excitatory synapse
14069	175	36	2.624	0	0	postsynaptic density
1505	171	35	2.611	0	0	regulation of neurotransmitter levels
99572	176	36	2.610	0	0	postsynaptic specialization
97060	147	30	2.604	0	0	synaptic membrane
50773	148	28	2.414	0	3.00E-04	regulation of dendrite development
7626	269	44	2.087	0	0	locomotory behavior
16358	273	44	2.056	0	4.00E-04	dendrite development
45666	350	56	2.041	0	0	positive regulation of neuron differentiation
43087	193	30	1.983	2.00E-04	0.0032	regulation of GTPase activity
16055	415	53	1.629	3.00E-04	0.0047	Wnt signaling pathway

Table V: Most enriched functional terms for the downregulated gene signature C3 in the cerebellum of female rat progeny subjected to methyl donor deficiency (FDRs were obtained by bootstrapping 50 times).

GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
7270	126	18	3.471	0	0.0031	neuron-neuron synaptic transmission
14069	175	22	3.055	0	0	postsynaptic density
99572	176	22	3.037	0	0.004	postsynaptic specialization
60076	193	24	3.022	0	0	excitatory synapse
44306	187	23	2.989	0	0	neuron projection terminus
44456	471	43	2.218	0	0	synapse part
45202	611	54	2.148	0	0	synapse
99537	524	45	2.087	0	0	trans-synaptic signaling
99536	524	45	2.087	0	0	synaptic signaling
98916	524	45	2.087	0	0	anterograde trans-synaptic signaling
7268	524	45	2.087	0	0	chemical synaptic transmission
44822	908	66	1.766	0	0.0036	poly(A) RNA binding
97458	1251	84	1.632	0	0.0033	neuron part

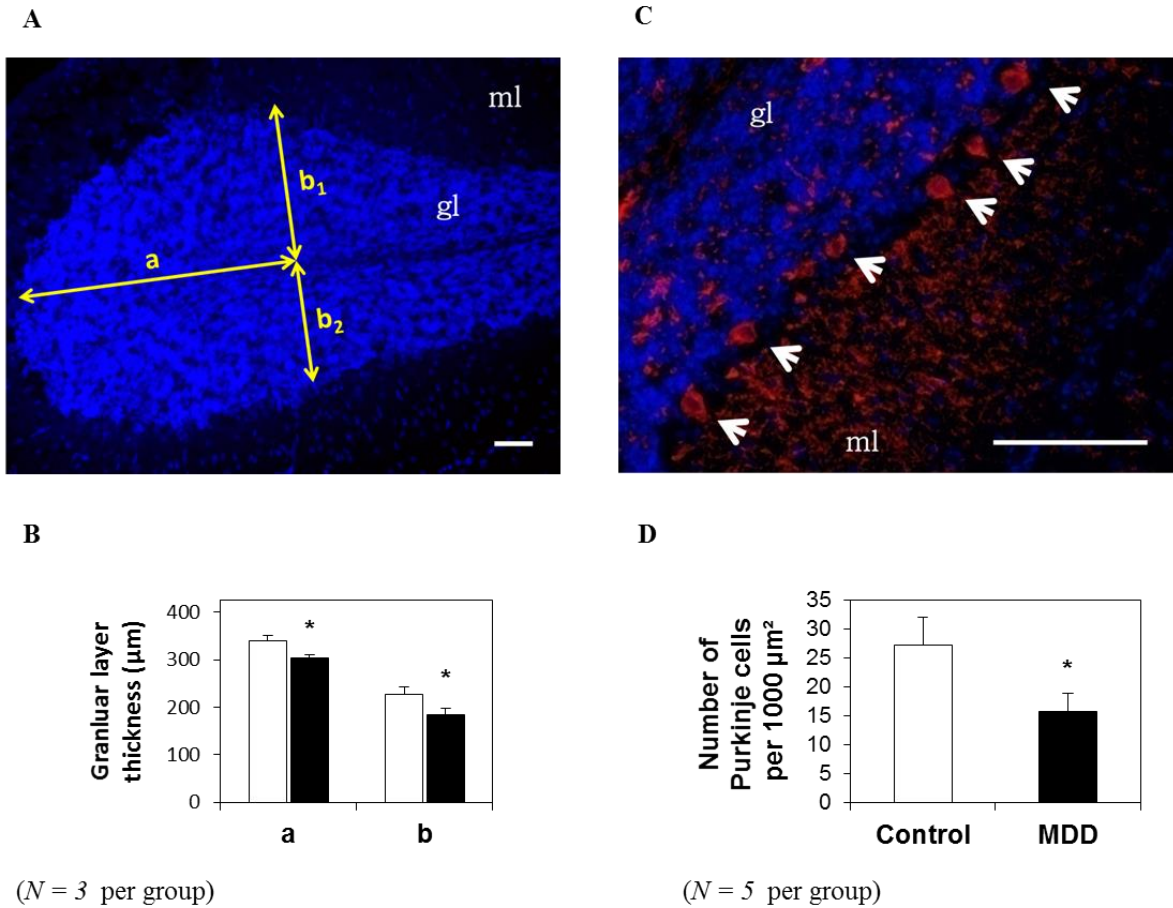


Figure 3: MDD affects cerebellum cytoarchitecture

Granular layer thickness measured as described in **(A)**: in control (white bars) and MDD (black bars) female's cerebellum at P21. **(B)** *b*₁ and *b*₂ measurements were averaged. *N* = 3 per group, * *p* ≤ 0.05.

Specific staining with Calbindin D28 **(C)** to count the number of Purkinje cells per 1000 μm² **(D)** in control and MDD females cerebellum at P21.

N = 5 per group, * *p* ≤ 0.05.

gl: granular layer; **ml**: molecular layer.

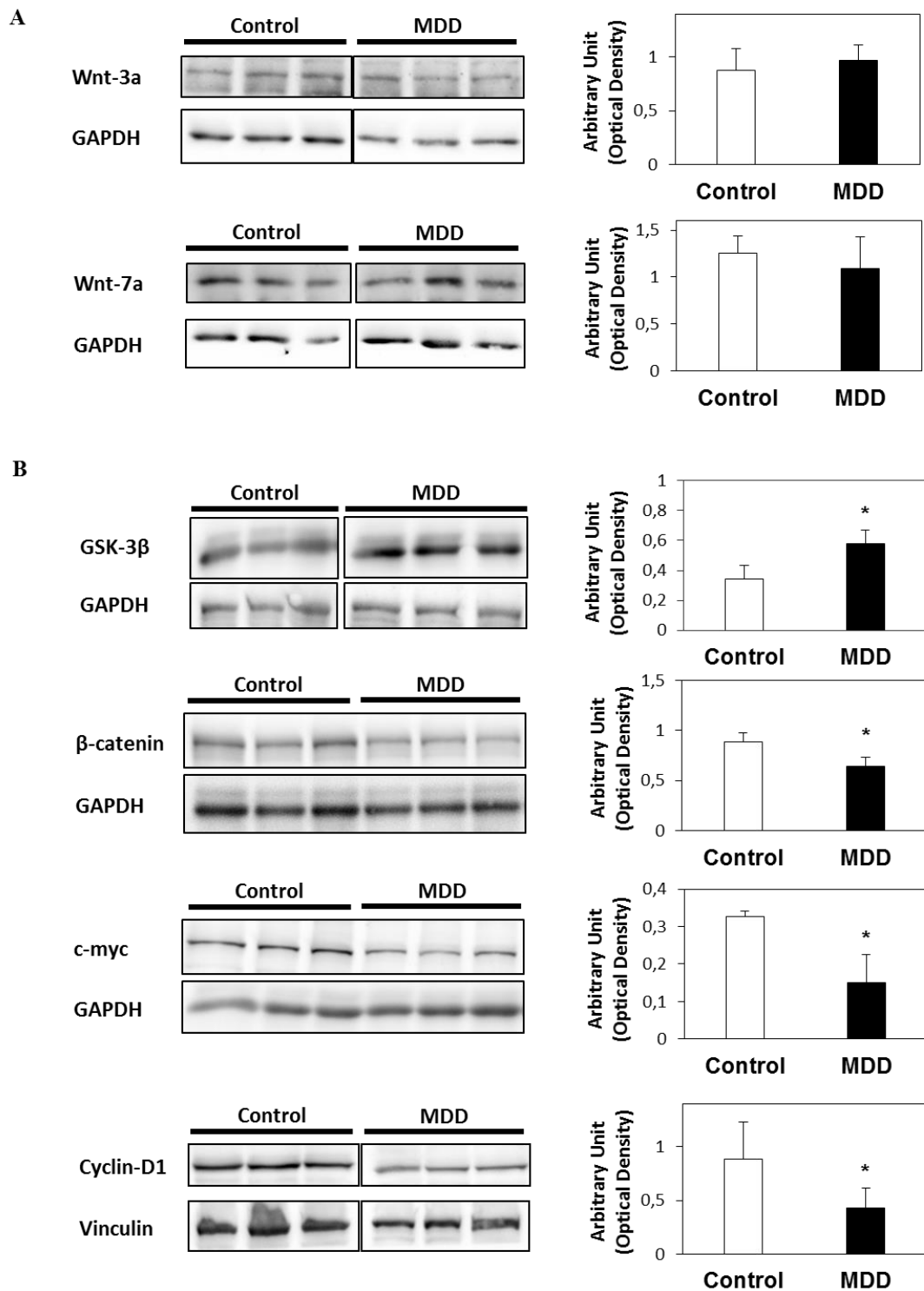


Figure 4: The canonical Wnt pathway is downregulated in response to MDD in female's cerebellum at postnatal day 21.

Western Blot analysis of the expression of (A) Wnt-3a, Wnt-7a, (B) GSK-3β (Glycogen synthase kinase 3 beta), β-catenin, c-myc, Cyclin-D1 and densitometric quantifications of relative expressions. Arbitrary units ± SD, $N = 3$ per group, run in duplicate, * $p \leq 0.05$

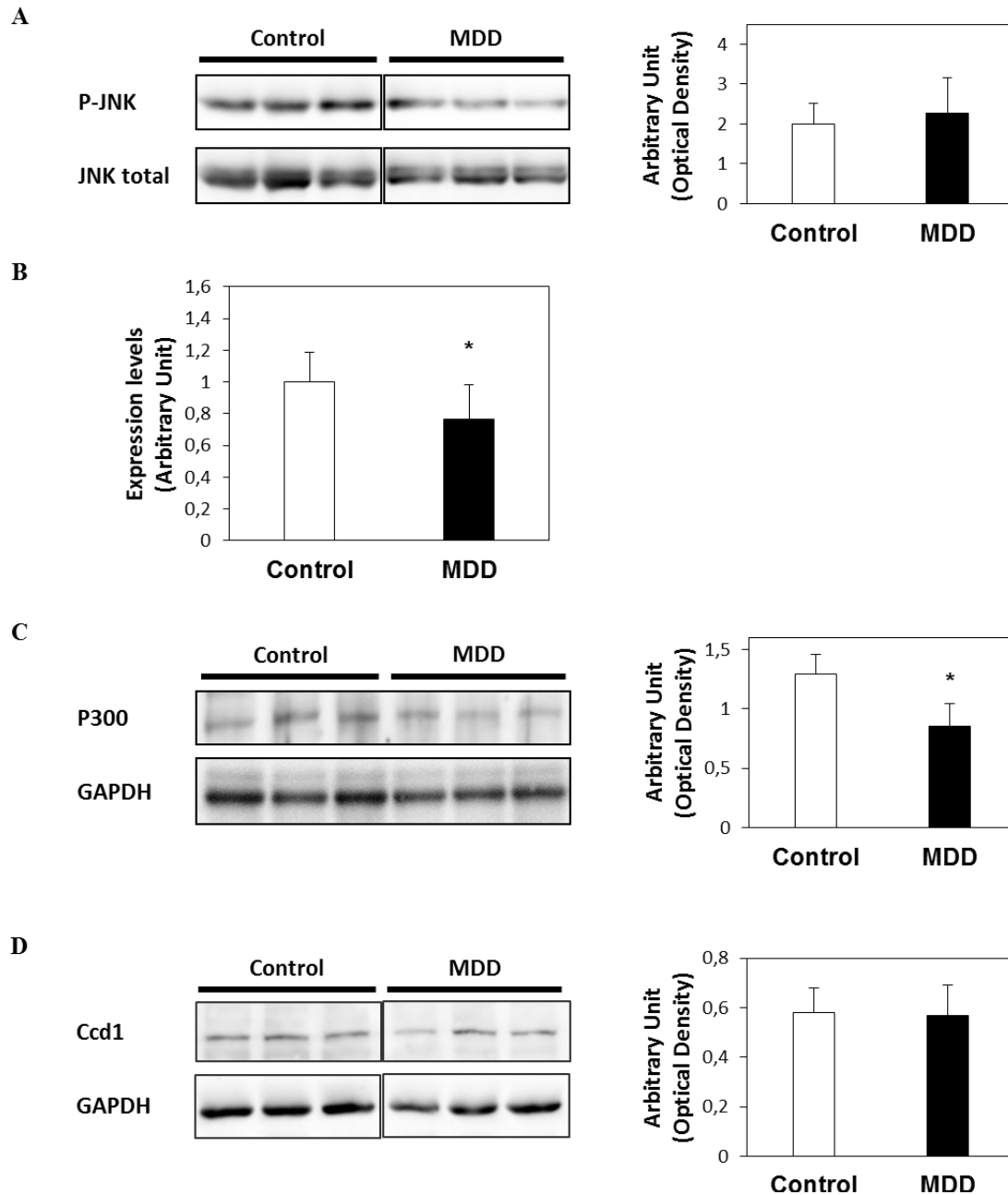


Figure 5: MDD effects on Wnt PCP pathway in female's cerebellum at postnatal day 21.

Western Blot analysis of the expression of **(A)** phosphorylated JNK (c-Jun N-terminal kinase), **(C)** P300 and **(D)** Ccd1 (Coiled-Coil Protein DIX1) and densitometric quantifications of relative expressions. **(B)** mRNA expression level of Ccd1, measured by qRT-PCR. Arbitrary units $\pm$ SD, $N = 3$ per group, run in duplicate, * $p \leq 0.05$.

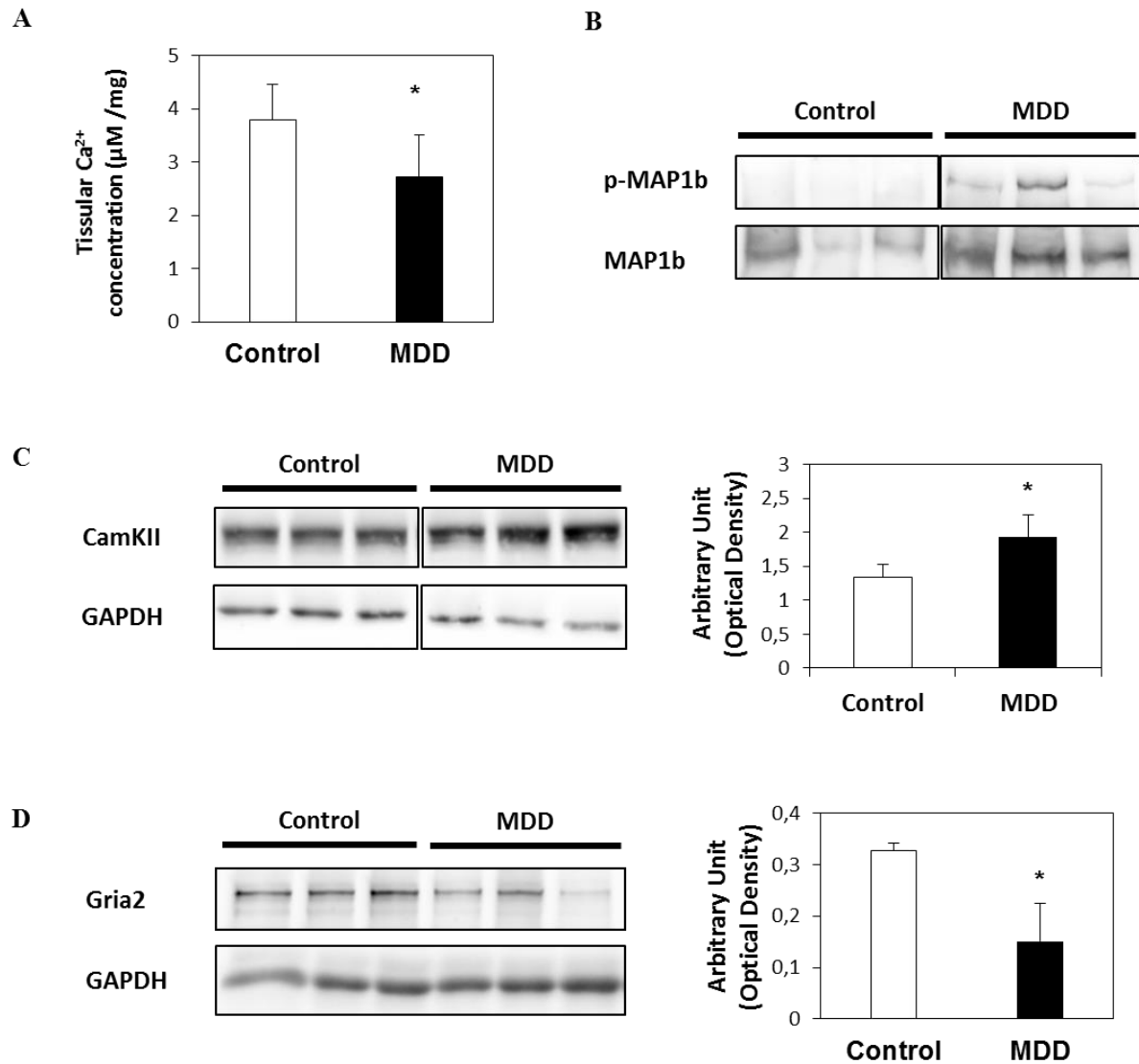


Figure 6: MDD effects on Wnt Ca^{2+} pathway in female's cerebellum at postnatal day 21.

(A) Free intra-tissular Ca^{2+} concentration in 21 day-old female's cerebellum in response to MDD in μM per mg of cerebellum tissue. $N = 6$ per group, * $p \leq 0,05$. Western Blot analysis of the expression of (B) phosphorylated and total MAP1b, (C) CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II), (D) Gria2 (Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2) and densitometric quantifications of relative expressions. Arbitrary units $\pm$ SD, $N = 3$ per group, run in duplicate, * $p \leq 0.05$.

References

- Adlakha, Y.K., and Saini, N. (2014). Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Mol. Cancer* 13, 33.
- Ahmad-Annuar, A., Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N.B., Rosso, S.B., Hall, A., Brickley, S., and Salinas, P.C. (2006). Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* 174, 127–139.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 786–794.
- Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., and Margalit, H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 2697–2706.
- Ami, N., Bernstein, M., Boucher, F., Rieder, M., Parker, L., and Canadian Paediatric Society, Drug Therapy and Hazardous Substances Committee (2016). Folate and neural tube defects: The role of supplements and food fortification. *Paediatr. Child Health* 21, 145–154.
- Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., and Tajima, S. (2001). Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 29, 3506–3512.
- Arnés, M., and Casas Tintó, S. (2017). Aberrant Wnt signaling: a special focus in CNS diseases. *J. Neurogenet.* 1–7.
- Bahous, R.H., Jadavji, N.M., Deng, L., Cosín-Tomás, M., Lu, J., Malysheva, O., Leung, K.-Y., Ho, M.-K., Pallàs, M., Kaliman, P., et al. (2017). High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism, with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring. *Hum. Mol. Genet.*
- Bamji, S.X., Shimazu, K., Kimes, N., Huelsken, J., Birchmeier, W., Lu, B., and Reichardt, L.F. (2003). Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* 40, 719–731.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Barua, S., Kuizon, S., Chadman, K.K., Flory, M.J., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2014). Single-base resolution of mouse offspring brain methylome reveals epigenome modifications caused by gestational folic acid. *Epigenetics Chromatin* 7, 3.
- Barua, S., Kuizon, S., Chadman, K.K., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2015). Microarray analysis reveals higher gestational folic Acid alters expression of genes in the cerebellum of mice offspring-a pilot study. *Brain Sci.* 5, 14–31.

Barua, S., Kuizon, S., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2016). High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a sex-Specific Manner in Mouse Offspring. *J. Mol. Neurosci.* **58**, 277–286.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* **33**, 1–13.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885–1898.

Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Mol. Cell* **28**, 328.

Berrocal-Zaragoza, M.I., Sequeira, J.M., Murphy, M.M., Fernandez-Ballart, J.D., Abdel Baki, S.G., Bergold, P.J., and Quadros, E.V. (2014). Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits. *Br. J. Nutr.* **112**, 1323–1332.

Bicker, S., Lackinger, M., Weiß, K., and Schratt, G. (2014). MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 3987–4005.

Bison, A., Marchal-Bressenot, A., Li, Z., Elamouri, I., Feigerlova, E., Peng, L., Houlgatte, R., Beck, B., Pourié, G., Alberto, J.-M., et al. (2016). Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet. *Sci. Rep.* **6**, 37207.

Blaise, S., Alberto, J.-M., Nédélec, E., Ayav, A., Pourié, G., Bronowicki, J.-P., Guéant, J.-L., and Daval, J.-L. (2005). Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr. Res.* **57**, 777–782.

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

Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **9**, 1225–1236.

Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39.

Blom, H.J., and Smulders, Y. (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 75–81.

Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101.

Brower-Toland, B., Wacker, D.A., Fulbright, R.M., Lis, J.T., Kraus, W.L., and Wang, M.D. (2005). Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J. Mol. Biol.* *346*, 135–146.

Bugalho, P., Correa, B., and Viana-Baptista, M. (2006). [Role of the cerebellum in cognitive and behavioural control: scientific basis and investigation models]. *Acta Med. Port.* *19*, 257–267.

Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 1957–1966.

Cao, D.-D., Li, L., and Chan, W.-Y. (2016). MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004). Spina bifida and anencephaly before and after folic acid mandate--United States, 1995-1996 and 1999-2000. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *53*, 362–365.

Cerpa, W., Godoy, J.A., Alfaro, I., Farías, G.G., Metcalfe, M.J., Fuentealba, R., Bonansco, C., and Inestrosa, N.C. (2008). Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* *283*, 5918–5927.

Chandrasekaran, S., and Bonchev, D. (2016). Network analysis of human post-mortem microarrays reveals novel genes, microRNAs, and mechanistic scenarios of potential importance in fighting huntington's disease. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* *14*, 117–130.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* *318*, 444–447.

Chédin, F. (2011). The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *101*, 255–285.

Chen, G., Broséus, J., Hergalant, S., Donnart, A., Chevalier, C., Bolaños-Jiménez, F., Guéant, J.-L., and Houlgatte, R. (2015). Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 293–302.

Chen, H., Wang, S., Chen, L., Chen, Y., Wu, M., Zhang, Y., Yu, K., Huang, Z., Qin, L., and Mo, D. (2014). MicroRNA-344 inhibits 3T3-L1 cell differentiation via targeting GSK3 β of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *FEBS Lett.* *588*, 429–435.

Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., and Martin, G.R. (2003). The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 2633–2644.

Choi, J.K. (2010). Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biol.* *11*, R70.

Ciani, L., and Salinas, P.C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 351–362.

Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M.J., Dale, T.C., and Salinas, P.C. (2004). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *J. Cell Biol.* *164*, 243–253.

Ciani, L., Boyle, K.A., Dickins, E., Sahores, M., Anane, D., Lopes, D.M., Gibb, A.J., and Salinas, P.C. (2011). Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10732–10737.

Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *33*, 18–41.

Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 319–332.

Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., and Baulieu, E.E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 4704–4707.

Crisucci, E.M., and Arndt, K.M. (2011). The Roles of the Paf1 Complex and Associated Histone Modifications in Regulating Gene Expression. *Genet. Res. Int.* *2011*.

Crott, J.W., Liu, Z., Keyes, M.K., Choi, S.-W., Jang, H., Moyer, M.P., and Mason, J.B. (2008). Moderate folate depletion modulates the expression of selected genes involved in cell cycle, intracellular signaling and folate uptake in human colonic epithelial cell lines. *J. Nutr. Biochem.* *19*, 328–335.

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

De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *43*, 745–756.

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

El Hajj Chehadeh, S., Pourié, G., Martin, N., Alberto, J.-M., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., and Leininger-Muller, B. (2014a). 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.* *111*, 1021–1031.

El Hajj Chehadeh, S., Dreumont, N., Willekens, J., Canabady-Rochelle, L., Jeannesson, E., Alberto, J.-M., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., and Leininger-Muller, B. (2014b). Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E1009-1019.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 9–22.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* *132*, 9–14.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.

Fanto, M., and McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Sci.* *117*, 527–533.

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

Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S., and Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA1. *J. Mol. Biol.* *309*, 1189–1199.

Feng, Y., Zhang, X., Graves, P., and Zeng, Y. (2012). A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA N. Y. N* *18*, 2083–2092.

Fiorenza, A., and Barco, A. (2016). Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol. Learn. Mem.* *135*, 3–12.

Fowler, B. (2001). The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int. Suppl.* *78*, S221-229.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.

Furukawa, A., Miyatake, A., Ohnishi, T., and Ichikawa, Y. (1998). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* *71*, 2231–2238.

Gao, B. (2012). Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr. Top. Dev. Biol.* *101*, 263–295.

Gao, Z., Ure, K., Ables, J.L., Lagace, D.C., Nave, K.-A., Goebbels, S., Eisch, A.J., and Hsieh, J. (2009). Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* *12*, 1090–1092.

Garcia-Segura, L.M., Arévalo, M.-A., and Azcoitia, I. (2010). Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog. Brain Res.* *181*, 251–272.

Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., et al. (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5078–5083.

Geoffroy, A., Kerek, R., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Daval, J.-L., and Bossenmeyer-Pourié, C. (2016). Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. *Mol. Neurobiol.*

Goldowitz, D., and Hamre, K. (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.* *21*, 375–382.

Goodall, E.F., Heath, P.R., Bandmann, O., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2013). Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 178.

Goyal, R., Reinhardt, R., and Jeltsch, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 1182–1188.

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

Guéant, J.-L., Elakoum, R., Ziegler, O., Coelho, D., Feigerlova, E., Daval, J.-L., and Guéant-Rodriguez, R.-M. (2014). Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Arch.* *466*, 833–850.

Hall, A.C., Lucas, F.R., and Salinas, P.C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* *100*, 525–535.

Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009a). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* *136*, 75–84.

Han, M., Serrano, M.C., Lastra-Vicente, R., Brinez, P., Acharya, G., Huhta, J.C., Chen, R., and Linask, K.K. (2009b). Folate rescues lithium-, homocysteine- and Wnt3A-induced vertebrate cardiac anomalies. *Dis. Model. Mech.* *2*, 467–478.

Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* *138*, 129–145.

Hatten, M.E., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* *18*, 385–408.

Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* 279, 48350–48359.

Hernández, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., and Lucas, J.J. (2002). Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* 83, 1529–1533.

Herrmann, W. (2001). The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39, 666–674.

Hibi, M., and Shimizu, T. (2012). Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev. Neurobiol.* 72, 282–301.

Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205–2232.

Hunt, C.A., Schenker, L.J., and Kennedy, M.B. (1996). PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 1380–1388.

Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P., and De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.* 96, 1374–1388.

Ikeuchi, Y., Stegmüller, J., Netherton, S., Huynh, M.A., Masu, M., Frank, D., Bonni, S., and Bonni, A. (2009). A SnoN-Ccd1 pathway promotes axonal morphogenesis in the mammalian brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4312–4321.

Inestrosa, N.C., and Arenas, E. (2010). Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 77–86.

Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline (1998). Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline (Washington (DC): National Academies Press (US)).

Iskandar, B.J., Rizk, E., Meier, B., Hariharan, N., Bottiglieri, T., Finnell, R.H., Jarrard, D.F., Banerjee, R.V., Skene, J.H.P., Nelson, A., et al. (2010). Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J. Clin. Invest.* 120, 1603–1616.

Itoh, K., Krupnik, V.E., and Sokol, S.Y. (1998). Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and β -catenin. *Curr. Biol.* 8, 591–594.

Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64.

Jevsinek Skok, D., Godnic, I., Zorc, M., Horvat, S., Dovc, P., Kovac, M., and Kunej, T. (2013). Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species. *Anim. Genet.* *44*, 669–677.

Jönsson, M.E., Nelander Wahlestedt, J., Åkerblom, M., Kirkeby, A., Malmevik, J., Brattaas, P.L., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2015). Comprehensive analysis of microRNA expression in regionalized human neural progenitor cells reveals microRNA-10 as a caudalizing factor. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 3166–3177.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *12*, 206–222.

Kaelin, W.G., and McKnight, S.L. (2013). Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* *153*, 56–69.

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

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *291*, 21–71.

Kishida, M., Koyama, S., Kishida, S., Matsubara, K., Nakashima, S., Higano, K., Takada, R., Takada, S., and Kikuchi, A. (1999). Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene* *18*, 979–985.

Krichevsky, A.M., Sonntag, K.-C., Isacson, O., and Kosik, K.S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 857–864.

Kumar, S., Vijayan, M., and Reddy, P.H. (2017). MicroRNA-455-3p as a potential peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 3808–3822.

Kung, J.T.Y., Colognori, D., and Lee, J.T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* *193*, 651–669.

Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D.C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M., and Gage, F.H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* *12*, 1097–1105.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.

Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* *13*, 1095–1107.

Lee, J.S., Ishimoto, A., and Yanagawa, S. (1999). Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 21464–21470.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.

Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865–873.

Leucht, C., Stigloher, C., Wizenmann, A., Klafke, R., Folchert, A., and Bally-Cuif, L. (2008). MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat. Neurosci.* 11, 641–648.

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322.

Liu, H., Tian, T., Qin, S., Li, W., Zhang, X., Wang, X., Gao, Y., and Huang, G. (2015). Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1502–1508.

Lucas, F.R., and Salinas, P.C. (1997). WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev. Biol.* 192, 31–44.

Lucas, F.R., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., and Salinas, P.C. (1998). Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 10), 1351–1361.

MacLennan, N.K., James, S.J., Melnyk, S., Pirooz, A., Jernigan, S., Hsu, J.L., Janke, S.M., Pham, T.D., and Lane, R.H. (2004). Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol. Genomics* 18, 43–50.

Marco, A., Macpherson, J.I., Ronshaugen, M., and Griffiths-Jones, S. (2012). MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence* 3, 8.

Marsit, C.J., Eddy, K., and Kelsey, K.T. (2006). MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res.* 66, 10843–10848.

Marzban, H., Del Bigio, M.R., Alizadeh, J., Ghavami, S., Zachariah, R.M., and Rastegar, M. (2014). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 450.

Mason, J.B., and Tang, S.Y. (2017). Folate status and colorectal cancer risk: A 2016 update. *Mol. Aspects Med.* 53, 73–79.

Mattson, M.P., and Shea, T.B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 26, 137–146.

McCully, K.S. (2009). Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 39, 219–232.

McMahon, A.P., and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073–1085.

Melse-Boonstra, A., Holm, P.I., Ueland, P.M., Olthof, M., Clarke, R., and Verhoef, P. (2005). Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 1378–1382.

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560.

Ming, G., and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250.

Molasy, M., Walczak, A., Szaflik, J., Szaflik, J.P., and Majsterek, I. (2017). MicroRNAs in glaucoma and neurodegenerative diseases. *J. Hum. Genet.* 62, 105–112.

Moore, L.D., Le, T., and Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38.

Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8905–8909.

Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 407–422.

Nowak, J.S., and Michlewski, G. (2013). miRNAs in development and pathogenesis of the nervous system. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 815–820.

Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* 18, 523–527.

Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.

Obeid, R. (2013). The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients* 5, 3481–3495.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Olde Loohuis, N.F.M., Kos, A., Martens, G.J.M., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., and Aschrafi, A. (2012). MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 89–102.

Oliva, C.A., Vargas, J.Y., and Inestrosa, N.C. (2013). Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 224.

Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., and Werge, T. (2009). MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PloS One* 4, e7225.

Orozco-Solís, R., Matos, R.J.B., Guzmán-Quevedo, O., Lopes de Souza, S., Bihouée, A., Houlgatte, R., Manhães de Castro, R., and Bolaños-Jiménez, F. (2010). Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PloS One* 5, e13537.

Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635–646.

Pellanda, H., Forges, T., Bressenot, A., Chango, A., Bronowicki, J.-P., Guéant, J.-L., and Namour, F. (2012). Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in fetuses. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 976–985.

Peschansky, V.J., and Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9, 3–12.

Peterson, C.L., and Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol. CB* 14, R546-551.

Pierson, J., Hostager, B., Fan, R., and Vibhakar, R. (2008). Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J. Neurooncol.* 90, 1–7.

Piyathilake, C.J., Macaluso, M., Celedonio, J.E., Badiga, S., Bell, W.C., and Grizzle, W.E. (2010). Mandatory fortification with folic acid in the United States appears to have adverse effects on histone methylation in women with pre-cancer but not in women free of pre-cancer. *Int. J. Womens Health* 1, 131–137.

Pogribny, I.P., Ross, S.A., Tryndyak, V.P., Pogribna, M., Poirier, L.A., and Karpinets, T.V. (2006). Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis* 27, 1180–1186.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Muskhelishvili, L., Rusyn, I., and Ross, S.A. (2007). Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J. Nutr.* 137, 216S–222S.

Pogribny, I.P., Karpf, A.R., James, S.R., Melnyk, S., Han, T., and Tryndyak, V.P. (2008). Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet. *Brain Res.* 1237, 25–34.

Pourié, G., Martin, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Akchiche, N., Guéant-Rodriguez, R.M., Geoffroy, A., Jeannesson, E., El Hajj Chehadeh, S., Mimoun, K., Brachet, P., et al. (2015). Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 3713–3725.

Quadros, E.V. (2010). Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br. J. Haematol.* 148, 195–204.

Ramaekers, V.T., Sequeira, J.M., and Quadros, E.V. (2016). The basis for folinic acid treatment in neuro-psychiatric disorders. *Biochimie* 126, 79–90.

Ramakrishnan, A.-B., and Cadigan, K.M. (2017). Wnt target genes and where to find them. *F1000Research* 6.

Ranade, S.C., Sarfaraz Nawaz, M., Kumar Rambtla, P., Rose, A.J., Gressens, P., and Mani, S. (2012). Early protein malnutrition disrupts cerebellar development and impairs motor coordination. *Br. J. Nutr.* 107, 1167–1175.

Rando, O.J., and Simmons, R.A. (2015). I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell* 161, 93–105.

Raux, E., Schubert, H.L., and Warren, M.J. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1880–1893.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.

Riikonen, R. (2017). Insulin-Like Growth Factors in the Pathogenesis of Neurological Diseases in Children. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Roussel, M.F., and Hatten, M.E. (2011). Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr. Top. Dev. Biol.* 94, 235–282.

Sable, P., Kale, A., Joshi, A., and Joshi, S. (2014). Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, TrkB and CREB in the offspring brain at an adult age. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 34, 24–32.

Sakai, C., Tomitsuka, E., Miyagishi, M., Harada, S., and Kita, K. (2013). Type II Fp of human mitochondrial respiratory complex II and its role in adaptation to hypoxia and nutrition-deprived conditions. *Mitochondrion* 13, 602–609.

Salinas, P.C., and Zou, Y. (2008). Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 339–358.

Salinas, P.C., Fletcher, C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nusse, R. (1994). Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 1277–1286.

Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. (2004). *Sall1*, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *319*, 103–113.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1412–1417.

Schmahmann, J.D., Weilburg, J.B., and Sherman, J.C. (2007). The neuropsychiatry of the cerebellum - insights from the clinic. *Cerebellum Lond. Engl.* *6*, 254–267.

Schonrock, N., Harvey, R.P., and Mattick, J.S. (2012). Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology. *Circ. Res.* *111*, 1349–1362.

Sherbet, G.V. (1974). Epigenetic mechanisms and paraneoplastic phenomena. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *230*, 516–532.

Sherwood, V. (2015). WNT signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism? *Mol. Cell. Biol.* *35*, 2–10.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941–953.

Shiomi, K., Uchida, H., Keino-Masu, K., and Masu, M. (2003). *Ccd1*, a novel protein with a DIX domain, is a positive regulator in the Wnt signaling during zebrafish neural patterning. *Curr. Biol. CB* *13*, 73–77.

Shookhoff, J.M., and Gallicano, G.I. (2010). A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. *Genes. N. Y. N* *2000* *48*, 282–294.

Sillitoe, R.V., and Joyner, A.L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 549–577.

Simons, K., and Fuller, S.D. (1985). Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* *1*, 243–288.

Smalley, M.J., Sara, E., Paterson, H., Naylor, S., Cook, D., Jayatilake, H., Fryer, L.G., Hutchinson, L., Fry, M.J., and Dale, T.C. (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J.* *18*, 2823–2835.

Smith, A.D., and Refsum, H. (2016). Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment. *Annu. Rev. Nutr.* 36, 211–239.

Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026–1032.

Stone, N., Pangilinan, F., Molloy, A.M., Shane, B., Scott, J.M., Ueland, P.M., Mills, J.L., Kirke, P.N., Sethupathy, P., and Brody, L.C. (2011). Bioinformatic and genetic association analysis of microRNA target sites in one-carbon metabolism genes. *PloS One* 6, e21851.

Strata, P. (2015). The emotional cerebellum. *Cerebellum Lond. Engl.* 14, 570–577.

van Straten, E.M.E., Bloks, V.W., van Dijk, T.H., Baller, J.F.W., Huijkman, N.C.A., Kuipers, I., Verkade, H.J., and Plösch, T. (2012). Sex-dependent programming of glucose and fatty acid metabolism in mouse offspring by maternal protein restriction. *Gend. Med.* 9, 166–179.e13.

Sunden, S.L., Renduchintala, M.S., Park, E.I., Miklasz, S.D., and Garrow, T.A. (1997). Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 345, 171–174.

Swanson, D.A., Liu, M.-L., Baker, P.J., Garrett, L., Stitzel, M., Wu, J., Harris, M., Banerjee, R., Shane, B., and Brody, L.C. (2001). Targeted Disruption of the Methionine Synthase Gene in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1058–1065.

Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., and Mattick, J.S. (2010). Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* 220, 126–139.

Tai, D., Wells, K., Arcaroli, J., Vanderbilt, C., Aisner, D.L., Messersmith, W.A., and Lieu, C.H. (2015). Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *The Oncologist* 20, 1189–1198.

Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791–801.

Takai, D., and Jones, P.A. (2004). Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol. Biol. Evol.* 21, 463–467.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X., and Selker, E.U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* 34, 75–79.

Tan, L., Yu, J.-T., Hu, N., and Tan, L. (2013). Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 47, 382–393.

Tryndyak, V.P., Latendresse, J.R., Montgomery, B., Ross, S.A., Beland, F.A., Rusyn, I., and Pogribny, I.P. (2012). Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 52–59.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., and Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 355–367.

Tserga, A., Binder, A.M., and Michels, K.B. (2017). Impact of folic acid intake during pregnancy on genomic imprinting of IGF2/H19 and 1-carbon metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*

Tsutsui, K. (2006). Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the developing Purkinje cell. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 187–194.

Tsutsui, K., Ukena, K., Sakamoto, H., Okuyama, S.-I., and Haraguchi, S. (2011). Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the purkinje cell. *Front. Endocrinol.* 2, 61.

van Uiter, E.M., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2013). Influence of maternal folate status on human fetal growth parameters. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 582–595.

Uziel, T., Karginov, F.V., Xie, S., Parker, J.S., Wang, Y.-D., Gajjar, A., He, L., Ellison, D., Gilbertson, R.J., Hannon, G., et al. (2009). The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2812–2817.

Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5, 367–377.

Vidal, D.O., Marques, M.M.C., Lopes, L.F., and Reis, R.M. (2013). The role of microRNAs in medulloblastoma. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 30, 367–378.

Visentin, M., Diop-Bove, N., Zhao, R., and Goldman, I.D. (2014). The intestinal absorption of folates. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 251–274.

van Vliet, E., Eixarch, E., Illa, M., Arbat-Plana, A., González-Tendero, A., Hogberg, H.T., Zhao, L., Hartung, T., and Gratacos, E. (2013). Metabolomics reveals metabolic alterations by intrauterine growth restriction in the fetal rabbit brain. *PloS One* 8, e64545.

Wadiche, J.I., and Jahr, C.E. (2001). Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32, 301–313.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., and Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 457–466.

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* *193*, 296–307.

Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a007864.

Wolf, S.S. (2009). The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 2109–2121.

Wyatt, G.R. (1950). Occurrence of 5-Methyl-Cytosine in Nucleic Acids. *Nature* *166*, 237–238.

Xiao, B., Jing, C., Wilson, J.R., Walker, P.A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I.A., Blackburn, G.M., and Gamblin, S.J. (2003). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* *421*, 652–656.

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K., and Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* *236*, 87–95.

Xu, W., and Kimelman, D. (2007). Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J. Cell Sci.* *120*, 3337–3344.

Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* *26*, 5310–5318.

Yokochi, T., and Robertson, K.D. (2002). Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J. Biol. Chem.* *277*, 11735–11745.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA N. Y. N* *9*, 112–123.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* *15*, 2343–2360.

Zhang, Z., Hou, C., Meng, F., Zhao, X., Zhang, Z., Huang, G., Chen, W., Fu, M., and Liao, W. (2015). MiR-455-3p regulates early chondrogenic differentiation via inhibiting Runx2. *FEBS Lett.* *589*, 3671–3678.

Zwain, I.H., and Yen, S.S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* *140*, 3843–3852.

B. Résultats complémentaires à l'analyse transcriptomique

1. Etude de la structure du cervelet en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles

Nous avons montré une altération de la cytoarchitecture du cervelet des femelles carencées par rapport aux contrôles à J₂₁ en mesurant l'épaisseur de la couche granulaire et le nombre de cellules de *Purkinje* (**Figure article 3**). Afin d'avoir un aperçu global de la structure du cervelet, nous avons regardé l'expression de différents marqueurs du cytosquelette par immunohistofluorescence (α -tubuline, β -tubuline, actine, résultats non présentés ; neurofilament-L, **Figure 24**). Notre hypothèse était que la carence entraînait une diminution du nombre ou de la taille des fibres parallèles au sein de la couche moléculaire. Nous n'avons cependant observé qu'une diminution du nombre de cellules de *Purkinje* chez les MDD, comme décrit précédemment.

Nous n'avons pas noté de changements dans le cervelet des femelles carencées par rapport aux contrôles. L'aspect de la couche granulaire et de la couche moléculaires semblent identiques dans les différents lobules.

2. Expression de *Ccd1* en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles

Des études précédentes ont montré l'implication de *Ccd1* dans la régulation de la morphogenèse axonale *via* une voie de signalisation dépendante du co-activateur transcriptionnel P300 (Ikeuchi et al., 2009). Nous avons montré que les femelles MDD présentaient une diminution d'expression de P300 ($p \leq 0.05$, **Figure 5-C article**). Par ailleurs, *Ccd1* est aussi un régulateur positif de la voie wnt de la PCP (Shiomi et al., 2003) et l'expression du gène *Ccd1* est diminuée chez les femelles carencées par rapport aux contrôles (fold change 0,73, $p \leq 0.0005$, **Figure 25-b**), conformément aux résultats obtenus par analyse transcriptomique. Il est intéressant de noter que l'expression de *Ccd1* diminue aussi chez les mâles MDD par rapport aux contrôles (fold change 0,68, $p \leq 0.005$, **Figure 25-b**).

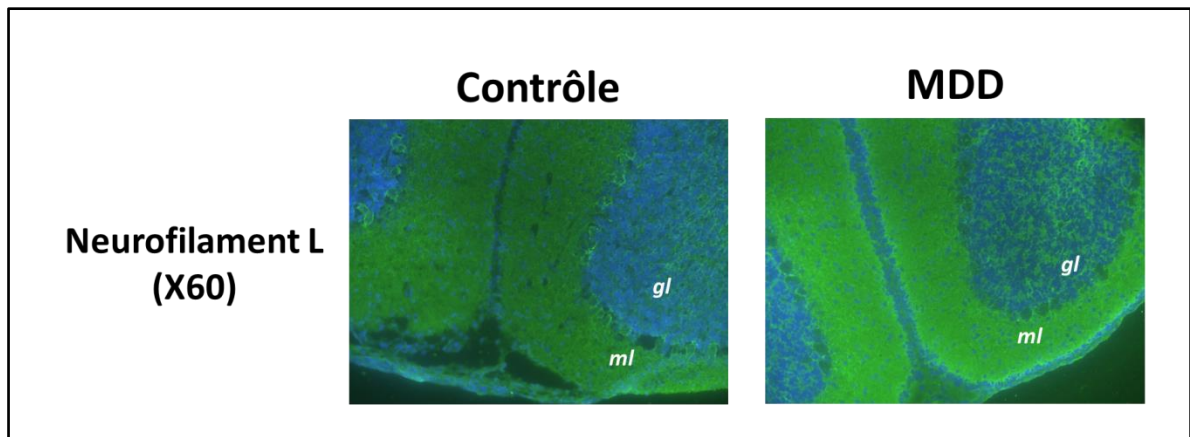


Figure 24 : Expression de NeuroL dans le cervelet des femelles à J₂₁.

Expression du marqueur neuronal Neurofilament-L dans le cervelet des femelles contrôles et carencées à J₂₁ au grossissement $\times 60$.

Les marquages ont été réalisés sur des coupes sagittales de cerveau et les noyaux ont été marqués au DAPI et apparaissent en bleu.

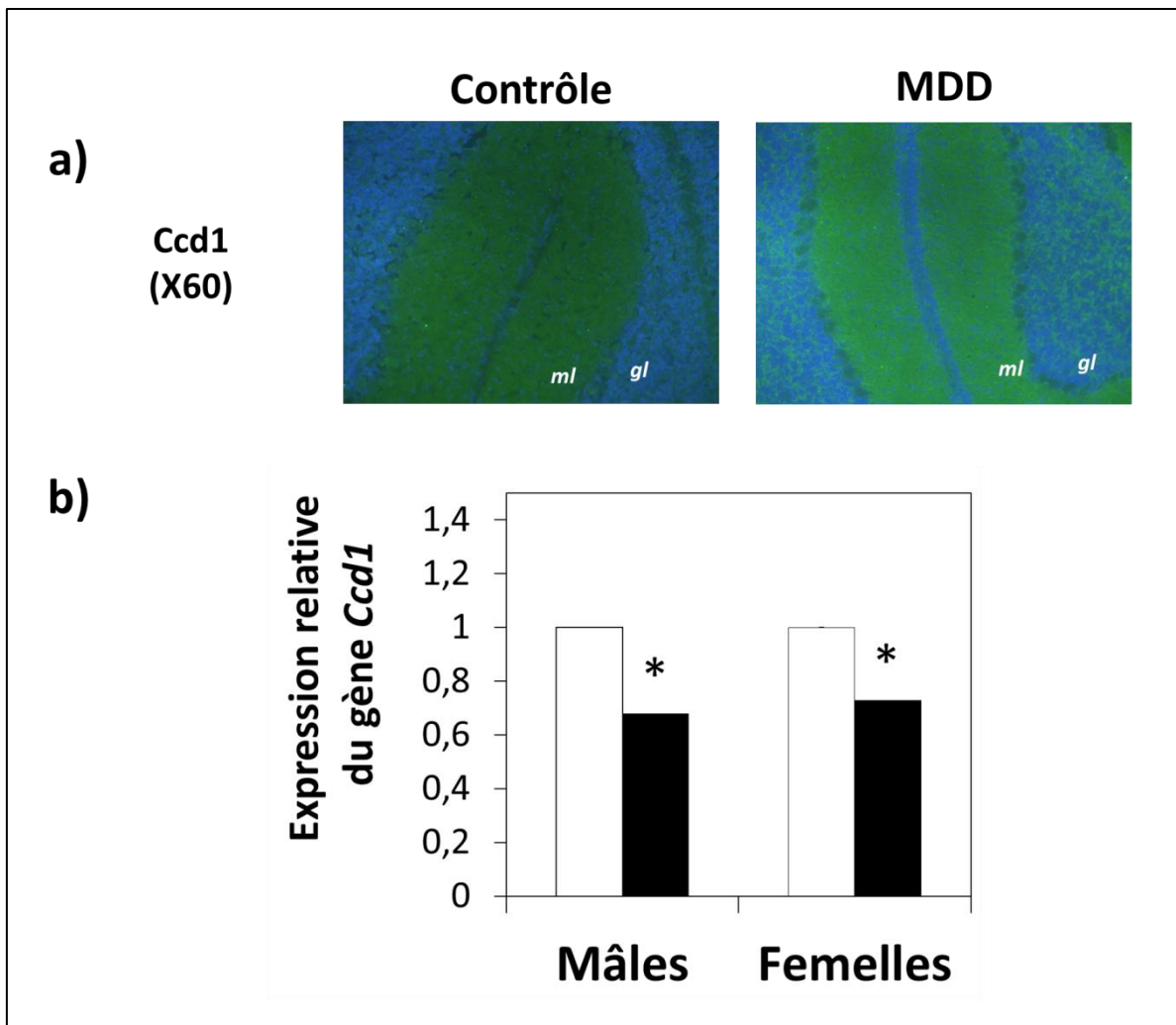


Figure 25: Expression de *Ccd1* dans le cervelet à J₂₁.

a) Expression de *Ccd1* dans le cervelet des femelles contrôles et carencées à J₂₁ au grossissement ×60.

Les marquages ont été réalisés sur des coupes sagittales de cerveau et les noyaux ont été marqués au DAPI et apparaissent en bleu.

b) Niveau d'expression de *Ccd1* dans le cervelet des rats carencés par rapport aux contrôles.

Le niveau d'expression des transcrits est mesuré en fonction des gènes de référence *gapdh*, *kansl2* et *sdha*. Les barres noires représentent l'expression des transcrits chez les MDD exprimés par rapport aux contrôles (barres blanches). N = 5 par groupe, * $p \leq 0.05$.

En revanche, le niveau protéique de CCD1 ne varie pas en réponse à la carence dans le cervelet des femelles (**Figure 5-D article**). Nous avons obtenu les mêmes résultats par immunofluorescence, avec un marquage identique entre femelles contrôles et MDD (**Figure 25-a**).

3. Voie wnt canonique dans le cervelet des mâles carencés

Nous avons vu précédemment que la voie wnt canonique était dérégulée dans le cervelet des femelles carencées à J₂₁. Afin de voir s'il s'agissait d'un mécanisme de réponse à la MDD propre aux femelles, nous avons analysé l'expression de GSK-3 β , de β -caténine et d'une cible de la voie wnt canonique, c-myc, dans le cervelet des rats à J₂₁ (**Figure 26-a**). Nous n'avons observé de variation d'expression d'aucune de ces protéines chez les mâles MDD.

Nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression de *Ctnnb1*, le gène codant la β -caténine, dans le cervelet des rats J₂₁. Nous n'observons pas de variation de son expression chez les mâles MDD par rapport aux contrôles (**Figure 26--b**). De la même manière, aucune variation n'a été observée chez les femelles en réponse à la carence (**Figure 26--b**), bien que l'on sache que le niveau protéique diminue.

4. Expression de P300 en réponse à la carence dans le cervelet des mâles

Nous avons vu précédemment que le co-activateur transcriptionnel P300 présentait une baisse d'expression à J₂₁ dans le cervelet des femelles MDD. Nous nous sommes aussi intéressés à son expression chez les mâles, et nous n'avons pas observé de variation en réponse à la carence (**Figure 27-a**).

Chez les mâles carencés, nous avons mesuré une diminution d'expression d'*EP300* (*fold change* 0,76 ; $p \leq 0,01$, **Figure 27-b**), le gène codant pour le co-activateur transcriptionnel P300 dont on sait que le niveau protéique diminue chez les femelles (**Figure 5-C article**). Nous ne retrouvons cependant pas ces variations dans le cervelet des femelles MDD (**Figure 27-b**).

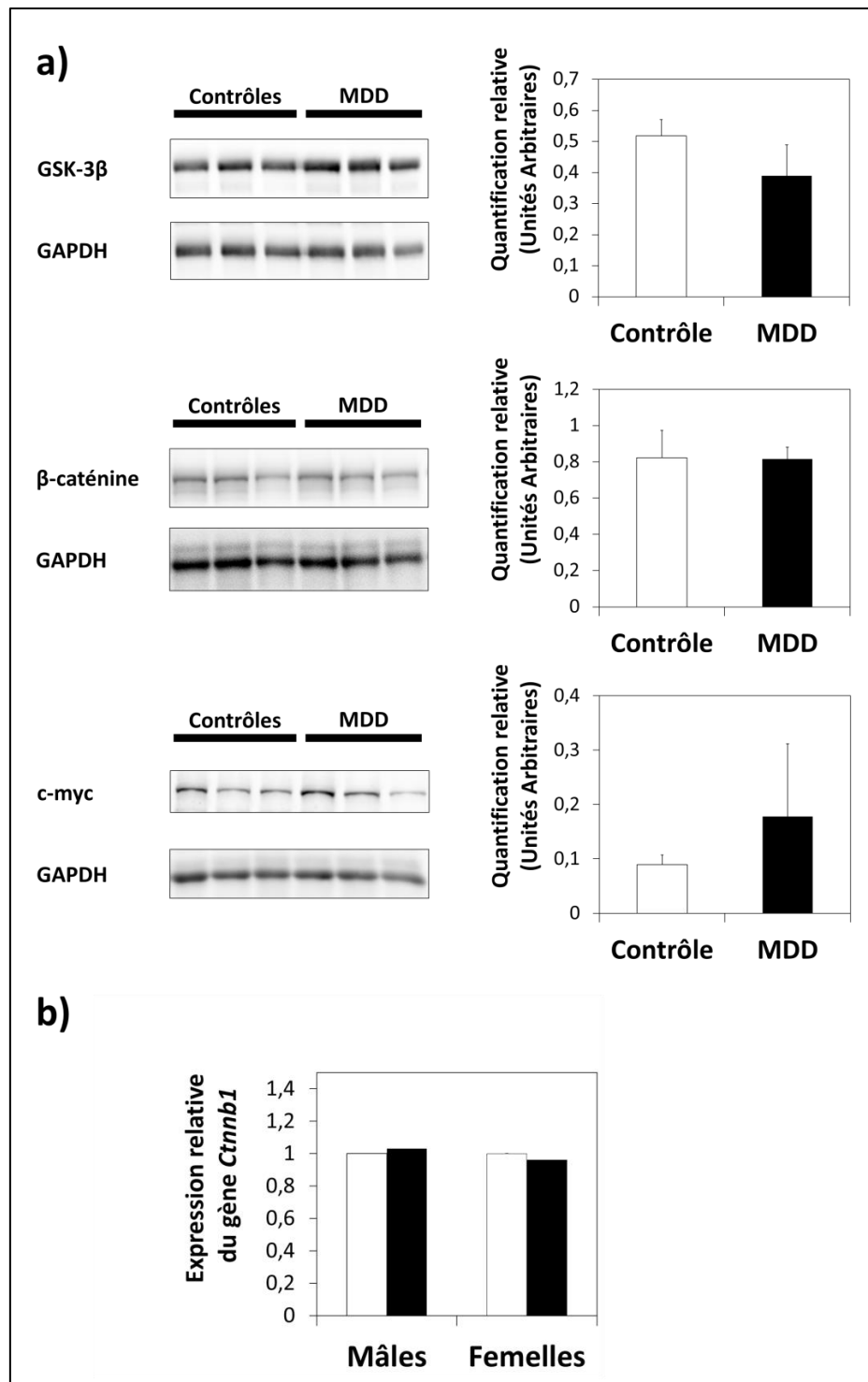


Figure 26 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur la voie wnt canonique dans le cervelet mâle à J₂₁.

a) Expression protéique de GSK-3β, β-caténine et c-myc dans le cervelet de mâles contrôles et MDD à J₂₁. L'expression des protéines est mesurée par rapport à la protéine de référence GAPDH. Les histogrammes représentent le résultat de l'analyse densitométrique ; N = 3 par groupe.

b) Niveau d'expression de *Ctnnb1* dans le cervelet des rats carencés par rapport aux contrôles.

Le niveau d'expression des transcrits est mesuré en fonction des gènes de référence *gapdh*, *kansl2* et *sdha* ; N = 5 par groupe

Les barres noires représentent les MDD exprimés par rapport aux contrôles (barres blanches)

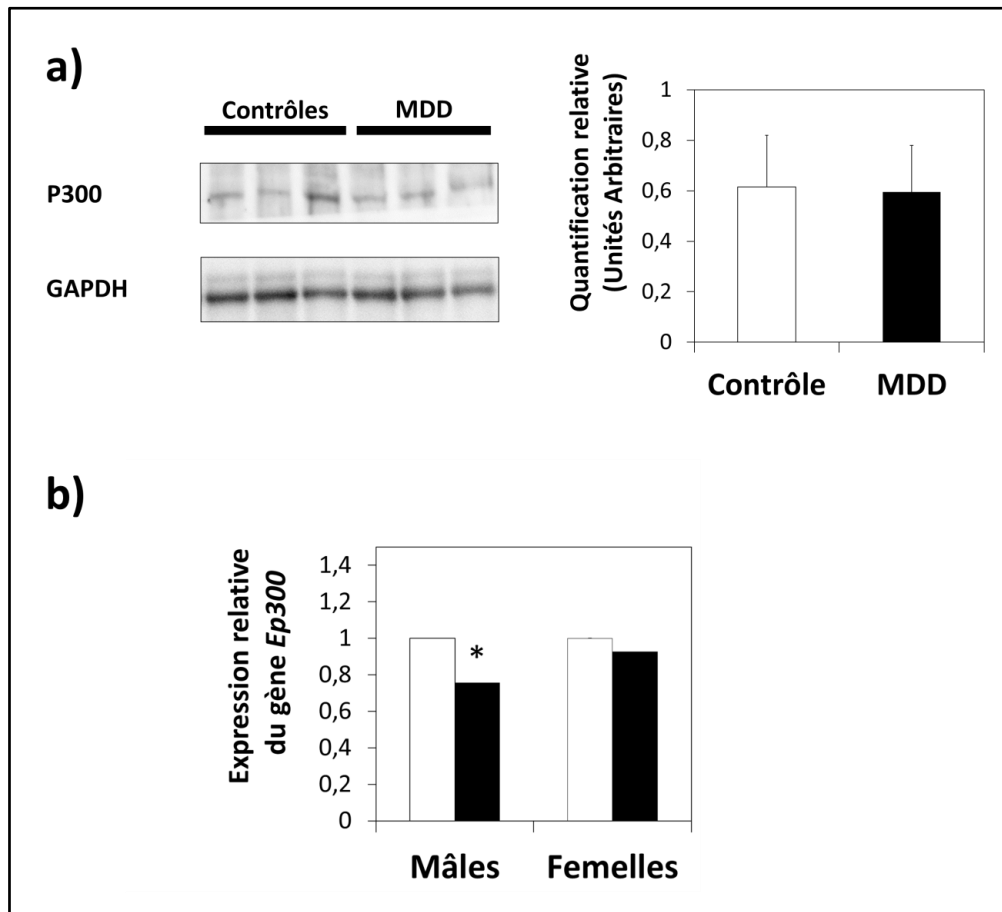


Figure 27 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur l'expression de P300 dans le cervelet mâle à J₂₁.

a) Expression protéique de P300 dans le cervelet de mâles contrôles et MDD à J₂₁. L'expression de la protéine d'intérêt est mesurée par rapport à la protéine de référence GAPDH. Les histogrammes représentent le résultat de l'analyse densitométrique.

N = 3 par groupe ; les barres blanches représentent les contrôles et les noires les carencés.

b) Niveau d'expression de *Ep300* dans le cervelet des rats carencés par rapport aux contrôles.

Le niveau d'expression des transcrits est mesuré en fonction des gènes de référence *gapdh*, *kansl2* et *sdha* ; N = 5 par groupe.

Les barres noires représentent les MDD exprimés par rapport aux contrôles (barres blanches).

C. Autres gènes étudiés par RT-qPCR

Nous avons mesuré par RT-qPCR l'expression d'autres gènes d'intérêt dans l'étude de la réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet à J₂₁. Notre but était de valider notre hypothèse selon laquelle le développement post-natal du cervelet est altéré chez les femelles nées de mères carencées.

1. Autres gènes impliqués dans les voies wnt

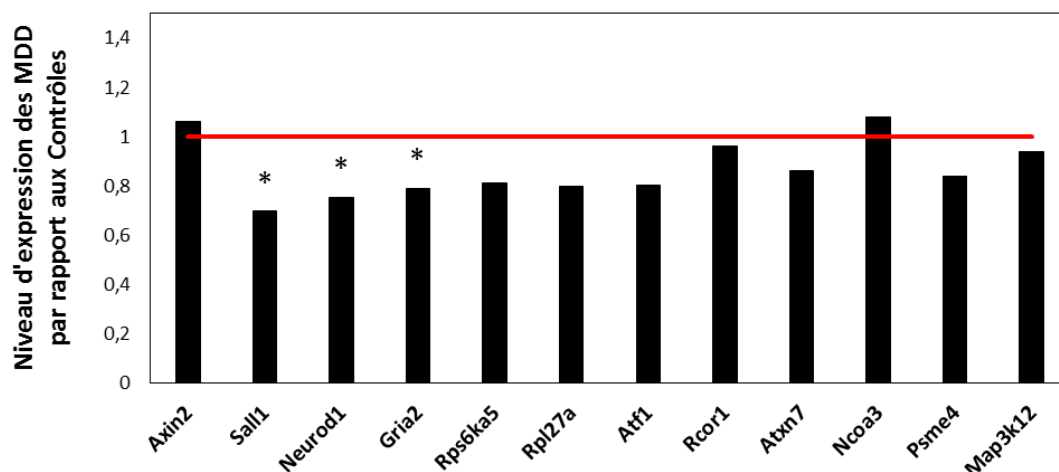
Afin de mieux décrire les dérégulations de la voie wnt dans le cervelet des femelles, nous nous sommes aussi intéressés à l'expression d'*Axin2*, qui code une protéine de stabilisation de la β -caténine que l'on retrouve impliquée dans la voie wnt canonique et canonique divergente (**Figure 7**). Nous n'avons pas observé de changements de son expression chez les femelles (**Figure 28-a**), ni chez les mâles (**Figure 28-b**) en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles.

En revanche, nous avons observé une diminution du niveau de transcrits de *Sall1* (*fold change* 0,70 ; $p \leq 0,005$, **Figure 28-a**), qui est un *enhancer* de la voie wnt canonique (Sato et al., 2004) uniquement chez les femelles carencées. *Neurod1*, un gène-cible de la voie wnt canonique dans le cerveau est aussi diminué dans le cervelet des femelles (*fold change* 0,75 ; $p \leq 0,05$, **Figure 28-a**) et des mâles carencés (*fold change* 0,61 ; $p \leq 0,01$, **Figure 28-b**)

2. Expression de *Gria2* dans le cervelet en réponse à la carence

Nous avons vu que l'expression de *Gria2*, une sous-unité des récepteurs glutamatérgiques AMPA exprimés au niveau des membranes post-synaptiques, était diminuée dans le cervelet des femelles carencées par rapport aux contrôles. Afin de comprendre si cette variation était due à des modifications de transcription du gène *Gria2*, nous avons mesuré son expression dans le cervelet des ratons femelles mais aussi des mâles à J₂₁.

a) Femelles



b) Mâles

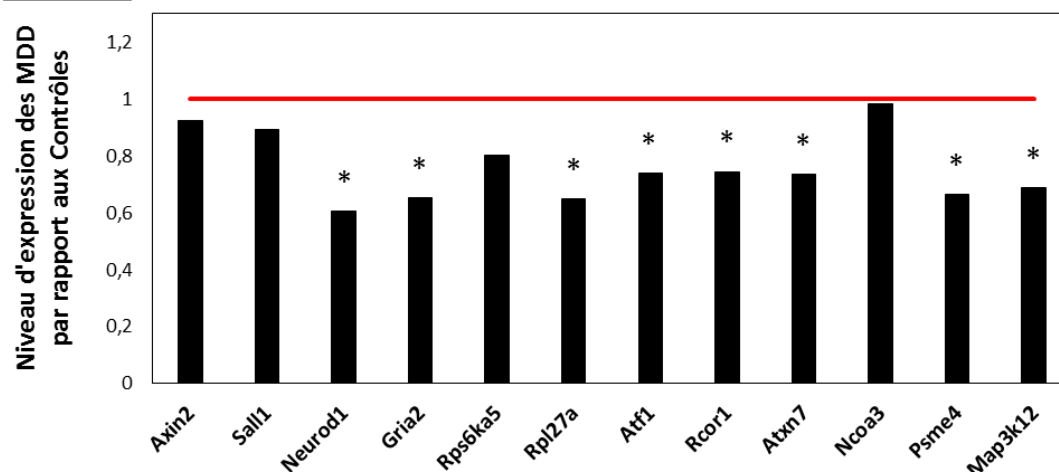


Figure 28 : Expression de 12 gènes d'intérêt en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet à J₂₁.

a) Niveau d'expression de 12 gènes d'intérêt dans le cervelet des femelles carencées par rapport aux femelles contrôles.

b) Niveau d'expression de 12 gènes d'intérêt dans le cervelet des mâles carencés par rapport aux mâles contrôles.

Le niveau d'expression des transcrits est mesuré en fonction des gènes de référence *gapdh*, *kansl2* et *sdha*. Les barres noires représentent l'expression des transcrits chez les MDD exprimés par rapport aux contrôles (ligne rouge). N = 5 par groupe, * $p \leq 0.05$.

Nous avons mesuré une diminution du niveau de transcrits *Gria2* (*fold change* 0,79 ; $p \leq 0.005$, **Figure 28-a**) chez les femelles en adéquation avec ce que nous avons montré au niveau protéique. Cette variation est aussi retrouvée dans le cervelet des mâles carencés (*fold change* 0,65 ; $p \leq 0.0005$, **(Figure 28-b)**).

3. Expression de *Rps6ka5* et *Rpl27a* dans le cervelet en réponse à la carence

D'après les résultats présentés dans le *cluster* 1 (**Tableau III article**), la traduction est modifiée en réponse à la MDD. Nous avons donc étudié l'expression de 2 gènes codant des protéines impliquées dans la structure des ribosomes. Nous n'avons cependant pas observé de variations d'expression de *Rps6ka5* ni de *Rpl27a* chez les femelles MDD (**Figure 28-a**). Ce dernier code une protéine de la sous-unité 60S du ribosome, et son expression est en revanche diminuée chez les mâles carencés par rapport aux contrôles (*fold change* 0,65, $p \leq 0,0005$, **Figure 28-b**).

4. Expression d'activateurs et de répresseurs transcriptionnels en réponse à la carence

Nous avons analysé l'expression de plusieurs activateurs et répresseurs de la transcription que l'on retrouve impliqués dans différentes voies de signalisation et métabolismes au sein de la cellule. Nous avons choisi ces candidats d'après les résultats de l'analyse du transcriptome présentés précédemment et notamment d'après les termes GO présentant des variations en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles.

Atf1 code pour un facteur de transcription dont l'activation est dépendante de l'AMPc. Son expression ne varie pas dans le cervelet des femelles MDD (**Figure 28-a**) mais chez elle diminue significativement dans celui des mâles (*fold change* 0,74, $p \leq 0,05$, **Figure 28-b**).

Il en est de même pour le gène codant *Rcor1*, une protéine impliquée dans la détermination des progéniteurs neuronaux. Son expression est normalement diminuée à la naissance mais nous n'observons pas de variation chez les femelles carencées (**Figure 28-a**) à l'inverse des mâles (*fold change* 0,75, $p \leq 0,005$; **Figure 28**).

L'ataxine 7 quant à elle, appartient à un complexe co-activateur de la transcription à activité HAT dont l'expression est impliquée dans la stabilité des microtubules et la mise en place des neurones photorécepteurs. On la retrouve impliquée dans certaines formes d'ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes, des pathologies neurodégénératives qui peuvent s'étendre jusqu'à la rétine, lorsque le gène *Atxn7* est impliqué. Nous avons mesuré une baisse de son expression dans le cervelet des mâles MDD (*fold change* 0,74, $p \leq 0,01$, **Figure 28-b**) et aucune variation significative dans celui des femelles (**Figure 28 -a**).

Nous nous sommes aussi intéressés à *Ncoa3* code un co-activateur transcriptionnel agissant avec CBP/P300 et CREB et possédant une activité HAT. Nous n'avons observé de variation de son expression en réponse à la carence ni dans le cervelet des femelles, ni dans celui des mâles (**Figure 28**).

Enfin, PSME4 est un activateur du protéasome et son expression transcriptionnelle est diminuée dans le cervelet des mâles MDD (*fold change* 0,66, $p \leq 0,0005$; **Figure 28-b**) tout comme celle de MAP3K12, qui est une kinase exprimée dans les terminaisons synaptiques et qui est impliquée dans la régulation de la différenciation neuronale en agissant avec CREB et MYC (*fold change* 0,69, $p \leq 0,005$; **Figure 28-b**). Nous n'avons en revanche pas observé de variations d'expression de ces deux gènes dans le cervelet des femelles.

II. Conclusions et discussion

Notre but était de déterminer quels sont les voies de signalisation et les gènes dérégulés en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet. Des résultats précédents ont clairement montré une réaction différente à la MDD en fonction du sexe (El Hajj Chehadeh et al., 2014b **annexe 2**; Pourié et al., 2015). Que ce soit au niveau fonctionnel, avec par exemple des altérations de la coordination locomotrice et de la mémoire (Blaise et al., 2007; Pourié et al., 2015), tissulaire avec une accumulation d'Hcy plus marquée dans les bulbes olfactifs (El Hajj Chehadeh et al., 2014a) ou encore moléculaires (défauts de NSG) les femelles sont plus sensibles à la MDD que les mâles.

La première étape de notre projet a donc consisté en l'étude du transcriptome du cervelet de femelles MDD à J₂₁ (**Figure 2 article**). Les résultats de cette analyse nous ont permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans la fonction mitochondriale (**Tableau III article**) mais aussi de manière plus attendue dans le développement et la structure du cervelet incluant la régulation et le transport du calcium intracellulaire, la neurogenèse, et la fonction synaptique (**Tableau IV et V article**). Ils nous permettent de faire le lien avec les descriptions phénotypiques qui avaient été faites antérieurement sur le modèle MDD (Blaise et al., 2005, 2007).

Afin d'aller plus loin dans la description des défauts de structure du cervelet, nous avons montré une diminution de l'épaisseur de la couche granulaire, ainsi qu'une baisse du nombre de cellules de *Purkinje* chez les femelles carencées. Les cellules de *Purkinje* sont considérées comme la population neuronale la plus importante du cervelet –bien que minoritaire- de par le nombre de synapses qu'elles établissent. Une cellule de *Purkinje* unique reçoit en effet les afférences de plus de 500 fibres grimpantes (Wadiche and Jahr, 2001). Une diminution de leur nombre, couplé à des défauts de la fonction synaptique pourrait donc être à l'origine des altérations de la motricité mesurées précédemment (Blaise et al., 2007; Pourié et al., 2015).

L'analyse *microarray* nous a aussi permis de mettre en évidence une moindre activation de la signalisation wnt (**Tableau IV article**), essentielle au développement du cervelet mais aussi de l'organisme tout entier (Lucas and Salinas, 1997; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980; Wieschaus et al., 1984). Nous avons validé ces résultats sur d'autres animaux en approfondissant la description de ces voies. La voie wnt canonique est moins activée chez les femelles carencées que chez les contrôles (**Figure 4-B article**) et elle aboutit de plus à l'expression de gènes-cibles impliqués dans la prolifération cellulaire (Ramakrishnan and Cadigan, 2017). La diminution de l'épaisseur de la couche granulaire et du nombre de cellules de *Purkinje* pourrait donc être la conséquence de défauts de prolifération des progéniteurs neuronaux donc le pic se fait de manière post-natale entre P5 et P8 (Roussel and Hatten, 2011).

Nous avons aussi montré que la diminution d'activation de la voie wnt canonique ne se faisait pas par diminution de la sécrétion des ligands wnt (**Figure 4-A article**) mais bien par une augmentation d'expression de la kinase GSK-3 β (**Figure 4-B article**). Nous avons formulé comme première hypothèse que son expression était régulée par miR-344-5p, qui est prédit comme pouvant cibler GSK-3 β , mais nous n'avons pas pu la valider expérimentalement (ces expériences sont développées dans la seconde partie des résultats). Il sera par la suite intéressant de déterminer les processus mis en jeu dans cette surexpression de GSK-3 β . Il pourrait s'agir d'une hausse de la transcription ou de la stabilité des transcrits par exemple, ou des mécanismes post-traductionnels pourraient être en jeu tels qu'une meilleure stabilité de la protéine.

La voie wnt canonique divergente est elle aussi dérégulée (**Figure 6 article**), ce qui est à l'origine de défauts dans la dynamique des microtubules synaptiques impliquée dans le contrôle de la motilité ou de la formation des synapses (**Figure 9**). Ces résultats rejoignent là aussi ceux de l'étude transcriptomique (**Tableau IV et V article**) et montrent une fois de plus que la MDD a des effets délétères qui vont bien au-delà de l'accumulation d'homocystéine tissulaire. Le fonctionnement cellulaire est impacté dans sa globalité, et notre étude de la voie wnt Ca²⁺-dépendante va une fois encore dans ce sens.

Nous n'avons en revanche pas retrouvé ces variations dans le cervelet des mâles (**Figure 26**) où la voie wnt canonique ne semble pas être dérégulée. Ces résultats mettent encore une fois en avant le dimorphisme sexuel que l'on retrouve dans la réponse à la MDD. Les dérégulations de la voie wnt pourraient permettre d'expliquer que les femelles sont plus touchées que les mâles. En revanche, ces derniers présentent tout de même des défauts et les dérégulations de la voie wnt canonique ne sont pas donc les seules altérations en jeu dans la réponse à la carence.

Si les résultats du transcriptome indiquaient des diminutions d'expression de gènes impliqués dans le transport et la régulation du calcium dans le cervelet des femelles carencées, nous avons montré que le taux de calcium libre intratissulaire est lui aussi diminué en réponse à la MDD (**Figure 6-A article**). Les ions calciques sont impliqués dans la plupart des processus-cellulaires et d'autant plus au niveau central. Ainsi, ils permettent d'activer la PKC, dont on sait que l'expression et la voie de signalisation sont dérégulées chez les femelles carencées (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Ils jouent aussi un rôle primordial dans la plasticité synaptique (Citri and Malenka, 2008) et la potentialisation à long terme (Bliss and Collingridge, 1993) d'une part, mais aussi dans la voie wnt Ca^{2+} -dépendante impliquée entre autres dans le développement et la maintenance neuronale (De, 2011). Enfin, il est intéressant de noter que le niveau de calcium libre intratissulaire n'est pas diminué dans le cervelet des mâles en réponse à la carence (résultats non-présentés), ce qui va encore ici dans le sens d'un effet dépendant du sexe dans la réponse à la MDD. La transmission synaptique est dépendante du calcium qui est impliqué dans la transmission de l'influx nerveux mais aussi dans la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique. Ainsi, une diminution de la quantité de calcium libre intracellulaire chez les femelles pourrait donc être associée à des défauts de la fonction synaptique chez l'adulte au-delà des altérations des voies de signalisations précédemment citées.

Un autre point intéressant dans la compréhension des mécanismes différenciels entre mâles et femelles est l'expression du co-activateur transcriptionnel P300 que l'on retrouve impliqué dans l'ensemble des mécanismes auxquels nous nous sommes intéressés. D'une part, P300 agit de concert avec le facteur de transcription CREB dans la voie de la PKC – dont on sait qu'ils sont tous les deux dérégulés chez le cervelet des femelles carencées (El

Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Ensuite, P300 est aussi retrouvé dans la signalisation wnt par le biais de la voie Ca_2^+ -dépendante (Cadigan and Waterman, 2012). Enfin, de par son activité HAT, l'expression de P300 a aussi un impact sur la structure de la chromatine et les marques histones que nous avons étudié dans la seconde partie de ce travail. Il est aussi important de remarquer que P300, dont l'expression est diminuée chez les femelles MDD ne varie pas au niveau protéique chez les mâles (**Figure 27**). Il est difficile d'établir s'il s'agit là d'une cause ou d'une conséquence, mais le dimorphisme phénotypique observé en fonction du sexe pourrait être expliqué par le niveau d'expression de P300, dont on sait qu'il est impliqué dans la plupart des processus cellulaires.

Il a été montré précédemment qu'une carence tardive en vitamine B12 avait un effet délétère sur l'expression du facteur de transcription CREB et des voies de signalisation associées (Sable et al., 2014). Dans notre modèle MDD, il est difficile de séparer les effets qui sont la conséquence d'une carence en vitamine B9 de ceux dépendants d'une carence en vitamine B12. Nous avons cependant retrouvé ces variations du facteur de transcription CREB (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**) mais aussi de son co-activateur P300. La carence en donneur de méthyles touche donc les mêmes voies de signalisation si elle est précoce ou tardive. A cours de la synaptogenèse, le SNC cependant est particulièrement sensible et c'est la raison pour laquelle la supplémentation en acide folique est conseillée en période périconceptionnelle.

L'analyse transcriptomique nous a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui sont mis en jeu dans le cerveau en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles. Nous avons montré que les différences qui existent entre mâles et femelles sont aussi retrouvées au niveau cellulaire. Les défauts de signalisation wnt chez les femelles, tout comme le transport et la régulation du calcium sont à l'origine d'anomalies développementales et structurales du cervelet, comme en témoignent les ensembles de gènes dérégulés chez les femelles MDD à J₂₁. La compréhension de ces mécanismes pourrait permettre aussi de mieux appréhender le concept de programmation fœtale.

Résultats 2^{ème} partie

Effets de la carence précoce
en donneurs de méthyles
sur l'épigénome du cervelet
à J₂₁

I. Résultats

A. Généralités

Nous avons décrit précédemment les altérations phénotypiques dues à la carence précoce en donneurs de méthyles mises en évidence grâce au modèle MDD (Blaise et al., 2007; Pourié et al., 2015). La première partie de nos travaux, nous a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires en jeu en réponse à cette carence. Nous avons vu que les voies de signalisation dépendantes de wnt étaient dérégulées dans le cervelet des femelles à 21 jours, et nous nous sommes aussi penchés sur un certain nombre de gènes d'intérêt. De précédentes études démontrent cependant la dérégulation de mécanismes épigénétiques chez les MDD et ce, dans différents organes (Chen et al., 2015; Pellanda et al., 2012) et aussi au niveau central (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**; Geoffroy et al., 2016a; Kerek et al., 2013) avec des modifications des marques histones, de la méthylation globale de l'ADN ou encore de l'expression des miARNs.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux modifications des marques histones en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles à J₂₁. Concernant l'analyse du miRnome en revanche, nous avons travaillé aussi sur les mâles, tant la nécessité de caractériser au mieux ces mécanismes encore trop peu décrits est importante. Enfin, nous avons sélectionné un miARN spécifique, miR-344, qui est un candidat pour la régulation de la voie wnt canonique et à l'expression du récepteur au facteur de croissance IGF-1 (Insulin-like growth factor). Nous avons tenté de décrire son implication dans ces voies de signalisation mais aussi dans la prolifération et la mort cellulaire.

B. Modification des marques histones en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles à J₂₁

Les premiers résultats de l'analyse transcriptomique ont permis de mettre en évidence des groupes de gènes impliqués dans la structure de la chromatine et notamment la régulation des protéines histones comme étant dérégulés. On retrouve par exemple le terme GO *Histone Lysine Demethylation* (GO ID 70076, FDR $\leq 0,005$, **Tableau IV article**). Nous avons analysé de plusieurs manières les résultats du transcriptome et si nous avons présenté l'ensemble sous forme de « classification hiérarchique » comme expliqué précédemment, nous avons aussi analysé les gènes dérégulés selon la méthode des *K-means* qui est cependant moins reproductible (résultats non présentés). Lors de cette seconde analyse, de nombreux gènes étant impliqués dans les modifications de la structure de la chromatine étaient mis en évidence. Nous nous sommes donc dans un premier temps intéressés à certains d'entre eux et avons mesuré leur expression par RT-qPCR. Par la suite, et afin de mettre en évidence les modifications épigénomiques mises en place en réponse à la MDD, nous nous sommes intéressés à la modification de 10 marques histones (acétylations, méthylations et phosphorylations) sur H₃ et sur H₄. Certaines d'entre elles avaient déjà été étudiées dans le foie des animaux MDD (H₄K₂₀me₃, H₃K₉me₃, H₄K₂₀me₃, H₃R₂me₂ and H₄K₁₆Ac, Pellanda et al., 2012) et les autres semblaient pertinentes au vu de la littérature.

1. Changements d'expression de gènes impliqués dans la structure de la chromatine

Les modifications des histones sur des résidus spécifiques sont très complexes et loin d'être totalement comprises. Une marque histone est le résultat de modifications par plusieurs enzymes possédant le même effet ou des effets opposés. On parle de « code histones » (**tableau code histones annexe 1**). Une même modification peut par exemple favoriser la transcription ou au contraire l'inhiber. Nous nous sommes intéressés ici à 8 gènes impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine. L'objectif était d'avoir

une première vue d'ensemble des mécanismes épigénétiques mis en place en réponse à la MDD dans le cervelet.

Nous avons mesuré l'expression de 8 gènes par RT-qPCR dans le cervelet des femelles et des mâles à J₂₁ (**Figure 29**). ARID4B (AT-rich interaction domain 4B) est une sous-unité du complexe protéique à activité histone déacétylase SIN3A, et possède une fonction de corépresseur transcriptionnel. Nous avons mesuré une baisse significative de son expression transcriptionnelle dans le cervelet des femelles (*fold change* 0,78 ; $p \leq 0,05$; **Figure 29-a**) et des mâles (*fold change* 0,67 ; $p \leq 0,05$ **Figure 29-b**).

Nous nous sommes ensuite intéressés au gène codant KMT5B, une lysine méthyltransférase, et nous avons vu que son expression était diminuée chez les mâles MDD par rapport aux contrôles (*fold change* 0,62 ; $p \leq 0,05$; **Figure 29-b**) mais nous n'avons pas observé de variation dans le cervelet des femelles.

MECP2 (methyl-CpG binding protein 2) est une protéine d'interaction avec l'ADN méthylé qui possède de plus un rôle de répresseur transcriptionnel. Nous n'avons pas quantifié de variation de son niveau de transcrits chez les femelles, mais son expression est ici aussi diminuée dans le cervelet des mâles carencés par rapport aux contrôles (*fold change* 0,82 ; $p \leq 0,05$; **Figure 29-b**).

Ehmt1 code quant à lui une lysine méthyltransférase possédant une activité de répression de la transcription et nous n'avons pas mesuré de changement de son expression chez les femelles, en réponse à la carence, à l'inverse des mâles (*fold change* 0,82 ; $p \leq 0,05$; **Figure 29-b**).

Concernant KDM5B et KMT5A, une lysine déméthylase permettant la mono-, di- et triméthylation de H₃K₄ et une lysine méthyltransférase qui monométhyle H₄K₂₀; nous n'avons observé de variations de leur expression transcriptionnelle en réponse à la carence que chez les mâles (*fold change* 0,76 et 0,75 respectivement ; $p \leq 0,05$; **Figure 29-b**).

Brcc3 code une débubiquitinyase de H₂ et nous n'avons observé de changement de son expression que dans le cervelet des mâles MDD par rapport aux contrôles (*fold change* 0,75, $p \leq 0,0005$; **Figure 29-b**) mais pas chez les femelles.

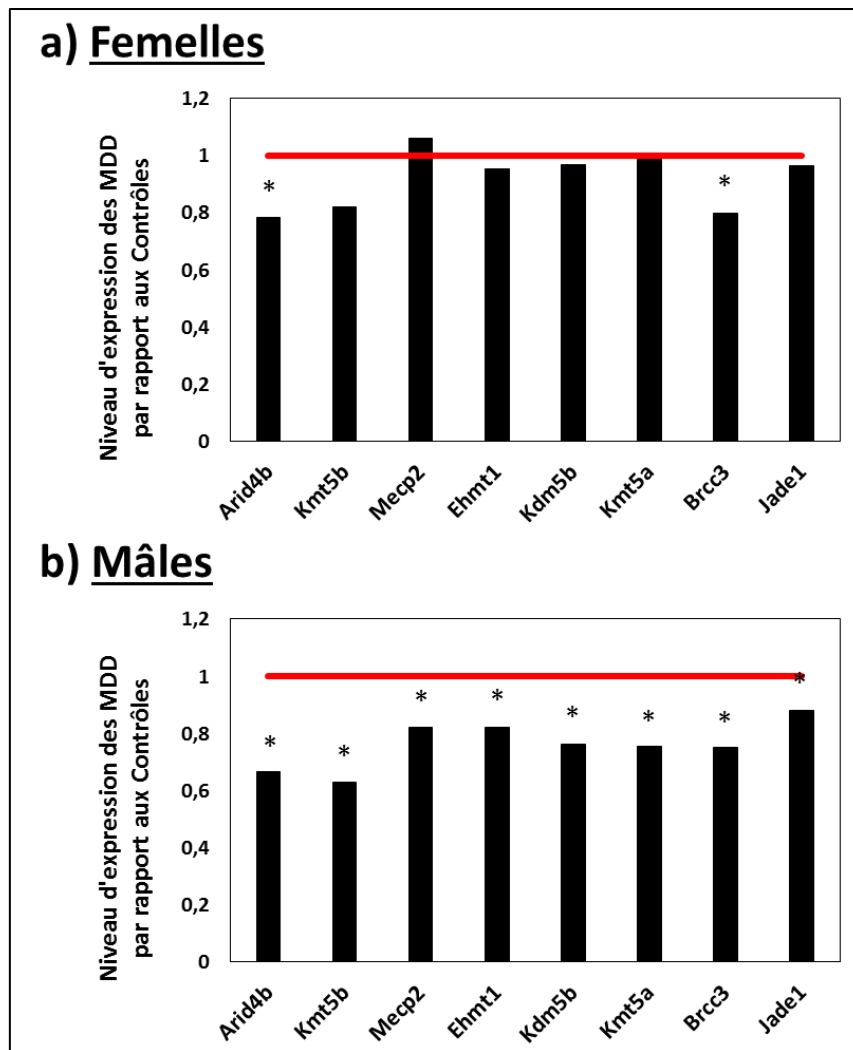


Figure 29 : Expression de 8 gènes d'intérêt impliqués dans la structure de la chromatine en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet à J₂₁.

a) Niveau d'expression de 8 gènes d'intérêt dans le cervelet des femelles carencées par rapport aux femelles contrôles.

b) Niveau d'expression de 8 gènes d'intérêt dans le cervelet des mâles carencés par rapport aux mâles contrôles.

Le niveau d'expression des transcrits est mesuré en fonction des gènes de référence *gapdh*, *kansl2* et *sdha*. Les barres noires représentent l'expression des transcrits chez les MDD exprimés par rapport aux contrôles (ligne rouge). N = 5 par groupe, * $p \leq 0.05$.

Abréviations : Arid4b : AT-rich interaction domain 4B ; Kmt5b : lysine méthyltransférase 5B ; Mecp2 : methyl-CpG binding protein 2 ; Ehmt1 : euchromatic histone lysine methyltransferase 1 ; Kdm5b : lysine déméthylase 5B ; Kmt5a : lysine méthyltransférase 5A ; Brcc3 : BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3 ; Jade 1 : Jade Family PHD Finger 1.

Enfin, *Jade1* code une sous-unité du complexe HBO1 possédant une activité HAT sur H₄+. Son expression est diminuée chez les mâles MDD (*fold change* 0,88, $p \leq 0,01$; **Figure 29-b**) mais nous n'avons pas observé de variation de son expression en réponse à la carence dans le cervelet des femelles.

Nous avons vu que plusieurs gènes codants des protéines impliquées dans la structure de la chromatine étaient dérégulés dans le cervelet des femelles et des mâles J₂₁ en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles. Nous n'avons pas regardé leur expression protéique mais afin de mieux comprendre les modifications de l'épigénome en réponse à la MDD nous nous sommes intéressés à plusieurs modifications des marques histones parmi les plus étudiées et les plus représentées.

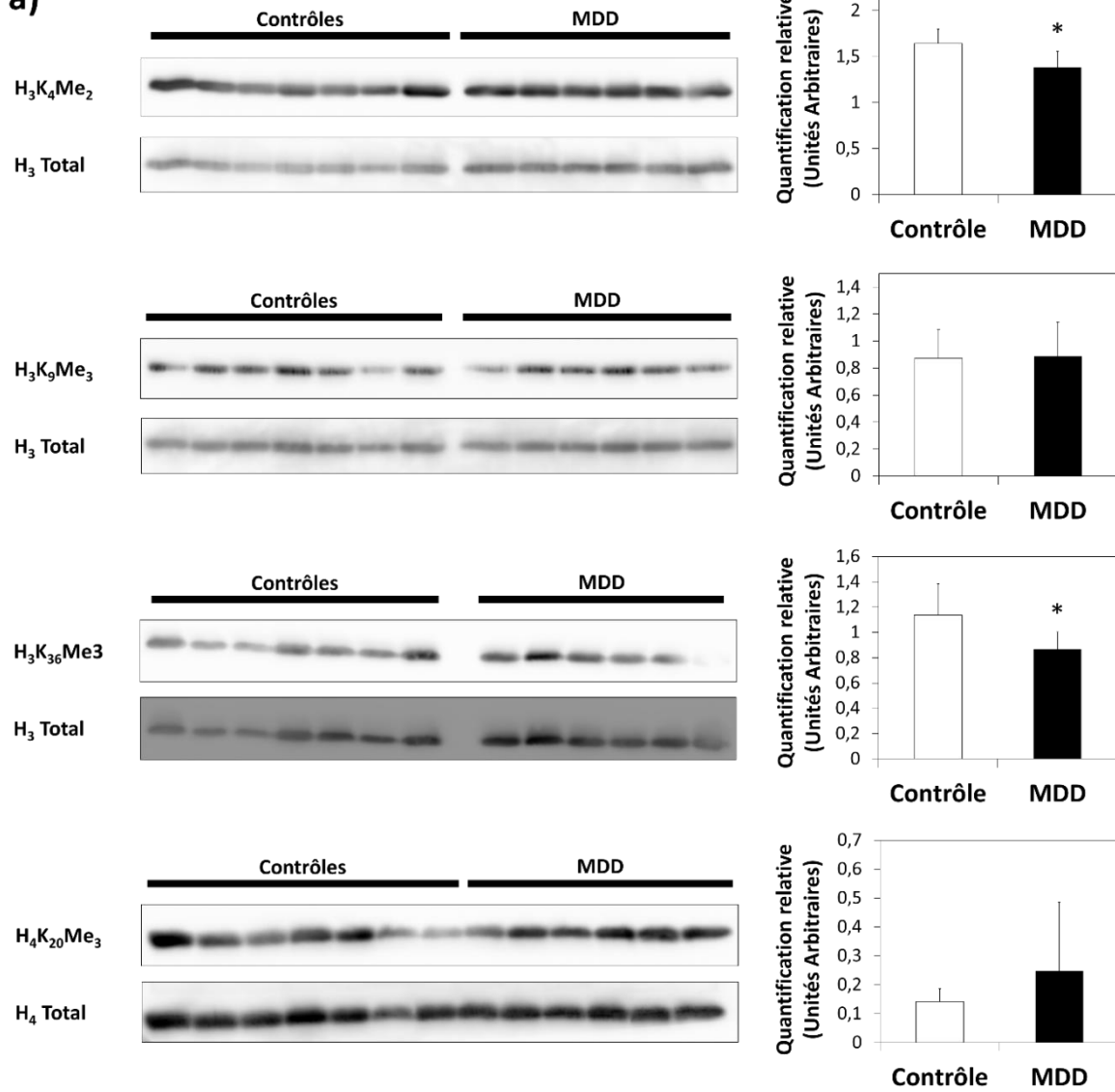
2. Effets de la carence sur la méthylation des histones

Comme expliqué précédemment, les histones peuvent être modifiées sur de nombreux résidus au niveau de leur *histone tail*. Le premier type de modification que nous avons analysé en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles à J₂₁ est la méthylation des lysines (**Figure 30-a**).

Parmi les 4 méthylations de lysines (K) auxquelles nous nous sommes intéressés, nous avons quantifié une diminution significative de H₃K₄Me₂ (*fold change* 0,84 ; $p \leq 0,05$) et de H₃K₃₆Me₃ (*fold change* 0,76 ; $p \leq 0,05$). Nous n'avons en revanche pas observé de variation significative de H₃K₉Me₃ chez les MDD, ni de H₄K₂₀Me₃, même si dans ce dernier cas, on note tout de même une tendance à l'augmentation en réponse à la carence.

Nous avons aussi analysé deux types méthylations concernant les arginines (R) : H₃R₂Me₂ et H₄R₃Me_{2a} (**Figure 30-b**). Nous n'avons mesuré de variation significative que pour cette dernière qui augmente chez les femelles carencées par rapport aux contrôles (*fold change* 1,64 ; $p \leq 0,05$).

a)



b)

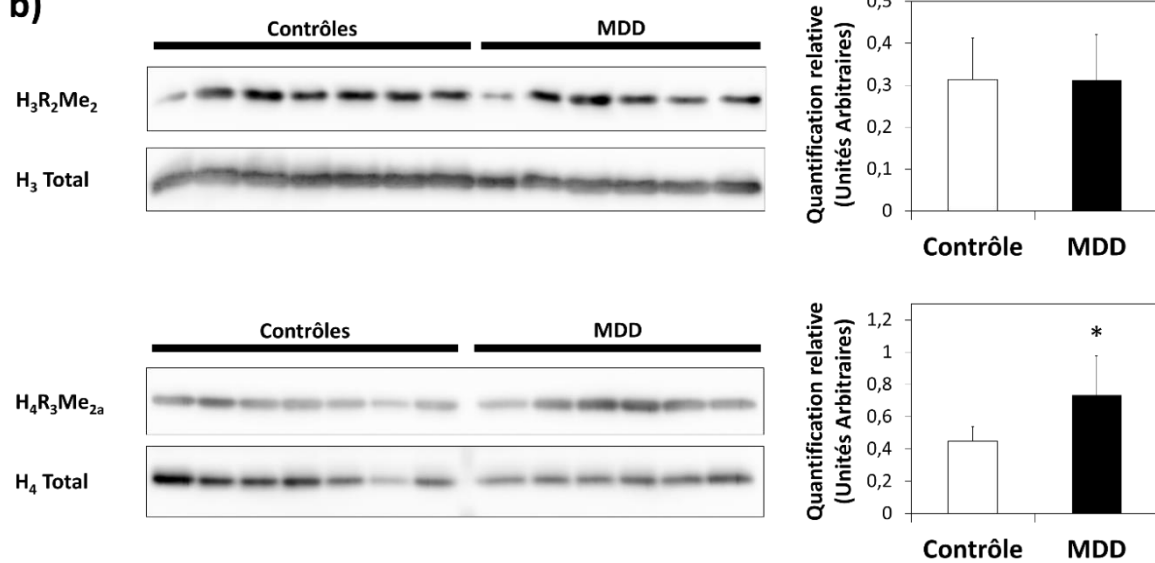


Figure 30 : Effets de la carence précoce en donneurs de méthyles sur la méthylation des histones dans le cervelet des femelles à J₂₁.

a) Western blot des modifications par méthylation des lysines (K) sur l'histone H₃ (H₃K₄Me₂, H₃K₉Me₃, H₃K₃₆Me₃) et H₄ (H₄K₂₀Me₃) dans le cervelet des femelles contrôles et MDD à J₂₁.

b) Western blot des modifications par méthylation des résidus arginine (R) sur l'histone H₃ (H₃R₂Me₂) et H₄ (H₄R₃Me_{2a}) dans le cervelet des femelles contrôles et MDD à J₂₁.

La modification du résidu est quantifiée par rapport au niveau total de H₃ ou de H₄. Les histogrammes à droite représentent les résultats de l'analyse densitométrique.

N = 7 pour le groupe contrôle et N = 6 pour le groupe MDD ; * $p \leq 0,05$; les barres blanches représentent les contrôles et les noires les carencées.

3. Effets de la carence sur l'acétylation des histones.

Un autre type de modification des histones extrêmement répandu est l'acétylation des lysines (K). Nous avons étudié 2 d'entre elles concernant l'histone H₃ : H₃K₁₄Ac et H₃K₂₇Ac (**Figure 31-a**) ; et deux touchant des lysines appartenant à l'histone H₄ : H₄K₈Ac et H₄K₁₆Ac (**Figure 31-b**).

Nous avons mesuré une augmentation significative de H₃K₁₄Ac (fold change 1,78 ; $p \leq 0,05$) dans le cervelet des femelles MDD par rapport aux contrôles, mais pas de variation concernant H₃K₂₇Ac (**Figure 31-a**). De même, H₄K₁₆Ac augmente significativement chez les femelles carencées par rapport aux contrôles (fold change 3,14 ; $p \leq 0,05$), mais nous n'avons pas mesuré de variation de H₄K₈Ac (**Figure 31-b**).

4. Effets de la carence précoce sur la phosphorylation des histones

Nous nous sommes finalement intéressés à la phosphorylation des histones, qui est cependant moins répandue que la méthylation et l'acétylation. Nous n'avons étudié qu'une seule marque portant sur H₃, H₃S₁₀P et nous n'avons pas mesuré de variation en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles à J₂₁ (**Figure 32**).

C. Impacts de la carence précoce en donneurs de méthyles sur l'expression des miARNs dans le cervelet à J₂₁

1. Etude du miRnome

L'analyse a porté sur l'étude de 728 miARNs matures, 490 pré-miARNs et 1996 snoARNs (*small nucleolar ARN*) et scaARNs (*small cajal-body specific ARN*). Seuls les résultats miARNs seront présentés ici.

Il ressort que de manière globale les miARNs sont faiblement exprimés dans le cervelet (résultats non présentés). Cela est généralement le cas dans les tissus dits extrêmement spécialisés tels que certains tissus cérébraux. De ce fait, très peu de miARNs ont été détectés comme étant différentiellement exprimés (DEmiRs). Au total, 18 miARNs

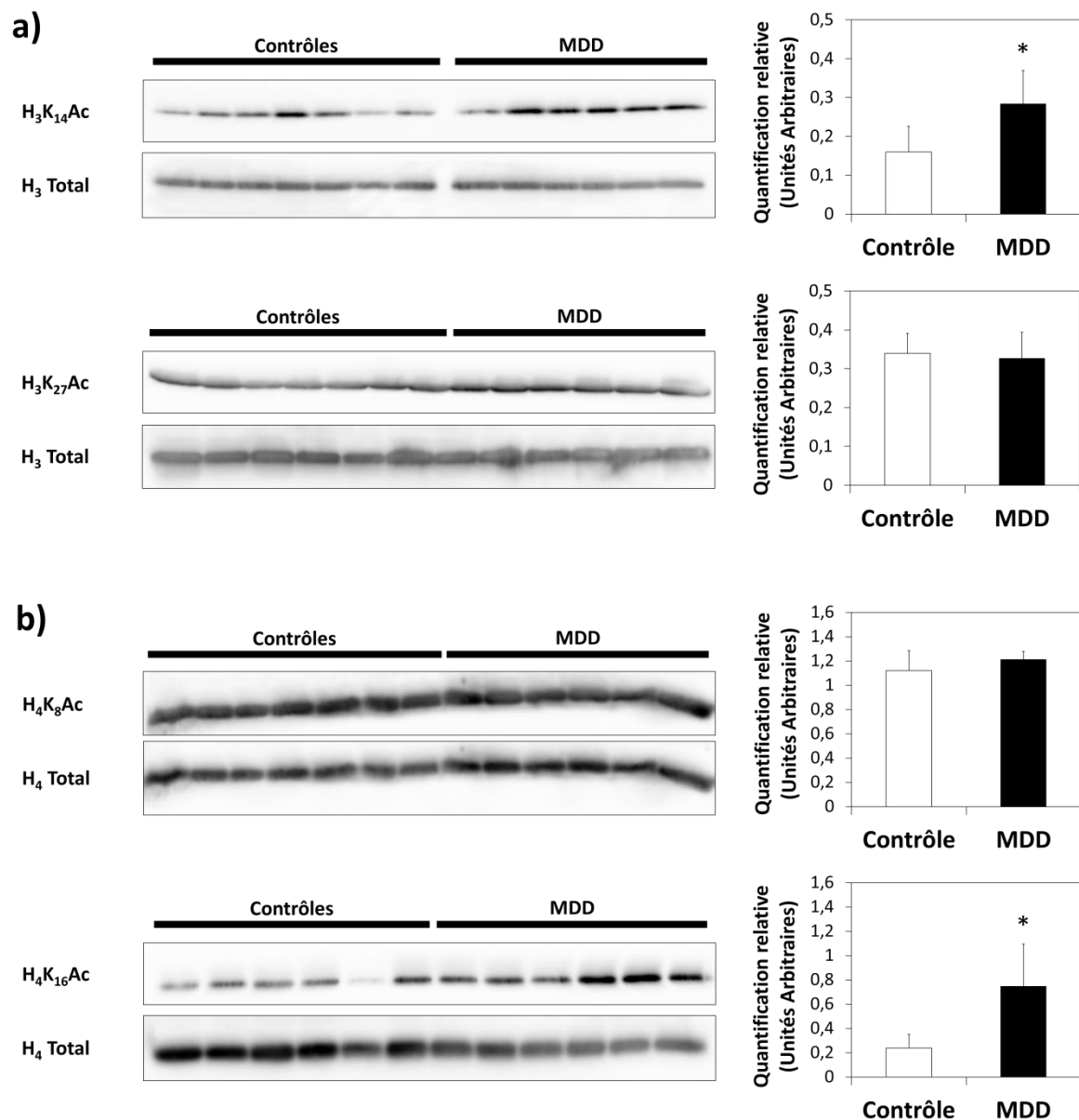


Figure 31 : Effets de la carence précoce en donneurs de méthyles sur l'acétylation des histones dans le cervelet des femelles à J₂₁.

a) Western blot des modifications par acétylation des lysines (K) sur l'histone H₃ (H₃K₁₄Ac et H₃K₂₇Ac) dans le cervelet des femelles contrôles et MDD à J₂₁.

b) Western blot des modifications par acétylation des lysines (K) sur l'histone H₄ (H₄K₈Ac et H₄K₁₆Ac) dans le cervelet des femelles contrôles et MDD à J₂₁.

La modification du résidu est quantifiée par rapport au niveau total de H₃ ou de H₄. Les histogrammes à droite représentent les résultats de l'analyse densitométrique.

N = 7 pour le groupe contrôle et N = 6 pour le groupe MDD ; * $p \leq 0,05$; les barres blanches représentent les contrôles et les noires les carencées.

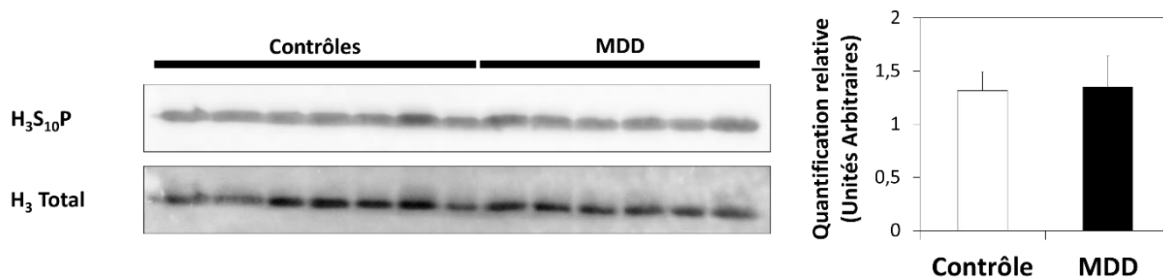


Figure 32 : Effets de la carence précoce en donneurs de méthyles sur la phosphorylation de l'histone H₃ (H₃S₁₀P) dans le cervelet des femelles à J₂₁.

Western blot de la modification par phosphorylation de la sérine en position 10 sur l'histone H₃ (H₃S₁₀P) dans le cervelet des femelles contrôles et MDD à J₂₁.

La modification du résidu est quantifiée par rapport au niveau total de H₃. L'histogramme à droite représente les résultats de l'analyse densitométrique.

N = 7 pour le groupe contrôle et N = 6 pour le groupe MDD ; * $p \leq 0,05$; la barre blanche représente les contrôles et la noire les carencées.

présentent des variations d'expression significatives (**Figure 33**) en fonction d'au moins une condition (sexe ou carence) dans le cervelet à J₂₁.

Nous avons sélectionné les 10 miARNs les plus exprimés afin de valider l'étude du miRnome sur d'autres animaux. Ces résultats sont présentés dans la **Figure 34** et ne correspondent que peu à ceux du microarray. Un seul DEmiR a été retrouvé chez les femelles, il s'agit de miR-344 (fold change 0,42 ; $p \leq 0,05$; **Figure 34**). Nous avons en revanche mesuré des variations d'expression de 5 miARNs chez les mâles carencés par rapport aux contrôles : miR-344 (fold change 0,48 ; $p \leq 0,05$), miR-194 (fold change 0,62 ; $p \leq 0,05$), miR-219 (fold change 0,76 ; $p \leq 0,05$), miR-134 (fold change 1,4 ; $p \leq 0,05$), et miR-369 (fold change 1,57 ; $p \leq 0,05$),

Il est important de noter que nous avons seulement analysé par RT-qPCR les DEmiR en réponse à la carence et non en fonction du sexe.

D. Etude des cibles et des fonctions cellulaires de miR-344

Dans le but de mieux comprendre la réponse à la MDD dans sa globalité et non pas uniquement chez les femelles, nous nous sommes intéressés à miR-344 dont nous avons montré précédemment que l'expression était diminuée drastiquement en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet des femelles et des mâles à J₂₁ (**Figure 34**). Nous avons tenté de déterminer les cibles potentielles de miR-344 ainsi que ses fonctions au sein de la cellule. Pour cela, nous avons tout d'abord voulu savoir si son expression était restreinte au cervelet.

1. Expression dans le cerveau de miR-344.

Nous avons mesuré l'expression de miR-344 dans l'hippocampe (**Figure 35-a**) et dans le cortex (**Figure 35-b**) de rats femelles et mâles, contrôles et MDD à J₂₁. Le premier résultat qui est notable est que nous avons réussi à amplifier miR-344 dans ces deux structures

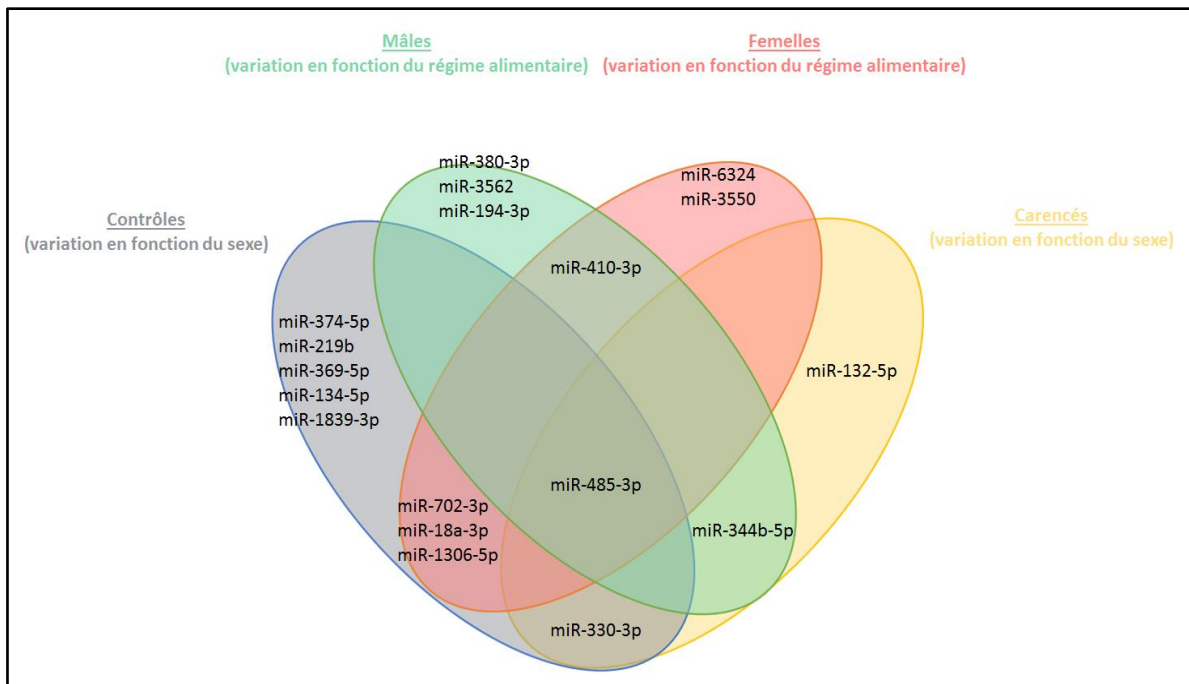


Figure 33 : Résultats de l'analyse du miRnome du cervelet en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles à J₂₁.

Les miARNs différentiellement exprimés (DEmiRs) en fonction du sexe ou du régime dans le cervelet à J₂₁ sont représentés au sein du diagramme.

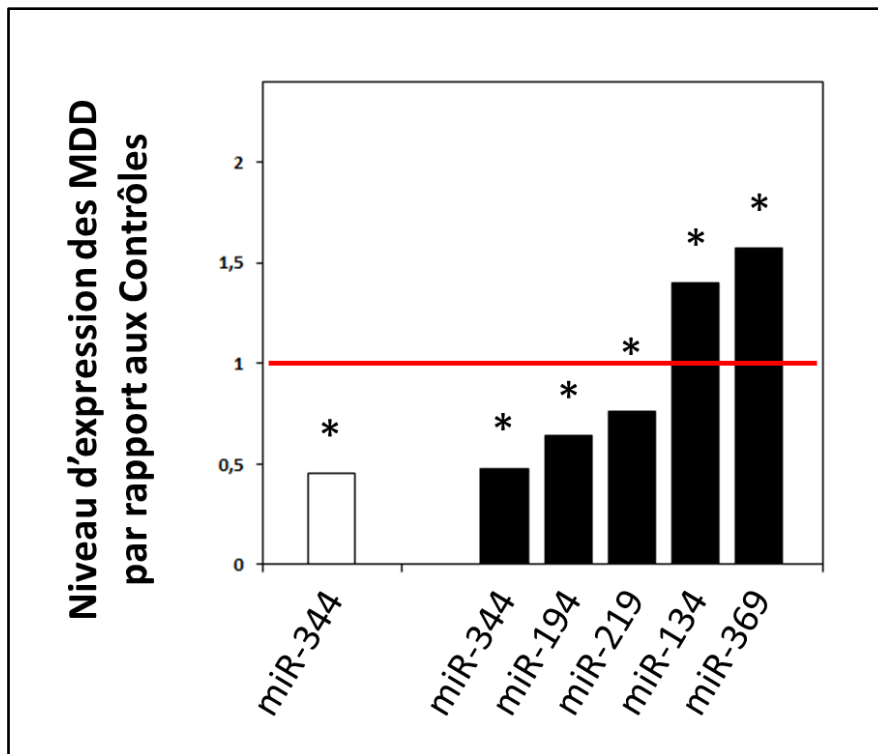


Figure 34 : miARNs différentiellement exprimés dans le cervelet des mâles et des femelles en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles à J₂₁.

L'expression de 10 miARNs a été analysée par RT-qPCR dans le cervelet des femelles et des mâles contrôles et carencés à J₂₁. Seuls les miARNs présentant une variation significative d'expression en réponse à la carence ont été représentés ici.

Le niveau de d'expression des miARNs est mesuré en fonction de miR-487, de miR-181 et du snARN-U6. Les barres blanches représentent l'expression des transcrits chez les femelles et les barres noires chez les mâles exprimés par rapport aux contrôles (ligne rouge). N = 5 par groupe, * $p \leq 0.05$.

miARNs testés : miR-344-5p ; miR-194-3p ; miR-410-3p ; miR-134-5p ; miR-374-5p ; miR-330-3p ; miR-319b ; miR-485-3p ; miR-380-3p ; miR-369-5p.

cérébrales, preuve que son expression n'est pas uniquement localisée dans le cervelet. En revanche, nous n'avons mesuré de variation d'expression statistiquement significative en réponse à la carence chez les mâles ou chez les femelles dans aucune de ces deux structures, même si nous notons tout de même une tendance à l'augmentation dans le cortex des mâles et des femelles carencés (**Figure 35-b**). Il est cependant important de nuancer nos propos ici, car en réalité les gènes de référence utilisés pour le cortex sont les mêmes que ceux utilisés pour le cervelet, et ils ne sont pas parfaitement adaptés à cette structure. Il est nécessaire de refaire cette analyse en utilisant des contrôles différents.

2. IGF-1R : une cible potentielle de miR-344

IGF-1R est le récepteur à activité tyrosine kinase du facteur de croissance IGF-1 (insulin-like growth factor 1) essentiel au cours du développement et impliqué dans la survie cellulaire et la neuroplasticité *via* les fonctions anti-apoptotiques des voies de signalisation qu'il déclenche (Garcia-Segura et al., 2010). On le trouve de ce fait fréquemment surexprimé dans les tissus cancéreux mais aussi dans de nombreuses pathologies neurologiques (Riikonen, 2017).

Le transcrit IGF-1R est prédit (par miRDB et TargetScan) comme étant une cible potentielle de miR-344, dont l'expression est diminuée en réponse à la MDD (**Figure 34**). Nous avons donc dans un premier temps quantifié l'expression du gène *IGF1R* par RT-qPCR dans le cervelet des femelles et des mâles, contrôles et carencés à J₂₁ (**Figure 36-a**). Nous avons mesuré une augmentation significative de son expression chez les femelles carencées par rapport aux contrôles (fold change 1,14 ; $p \leq 0,05$), mais aucune variation dans le cervelet des mâles.

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'expression protéique d'IGF-1R dans le cervelet des mâles et des femelles à J₂₁ en réponse à la MDD. (**Figure 36-b**). De manière surprenante, nous avons mesuré une baisse de son expression chez les femelles MDD par rapport aux contrôles (fold change 0,72 ; $p \leq 0,05$), mais aucun changement chez les mâles.

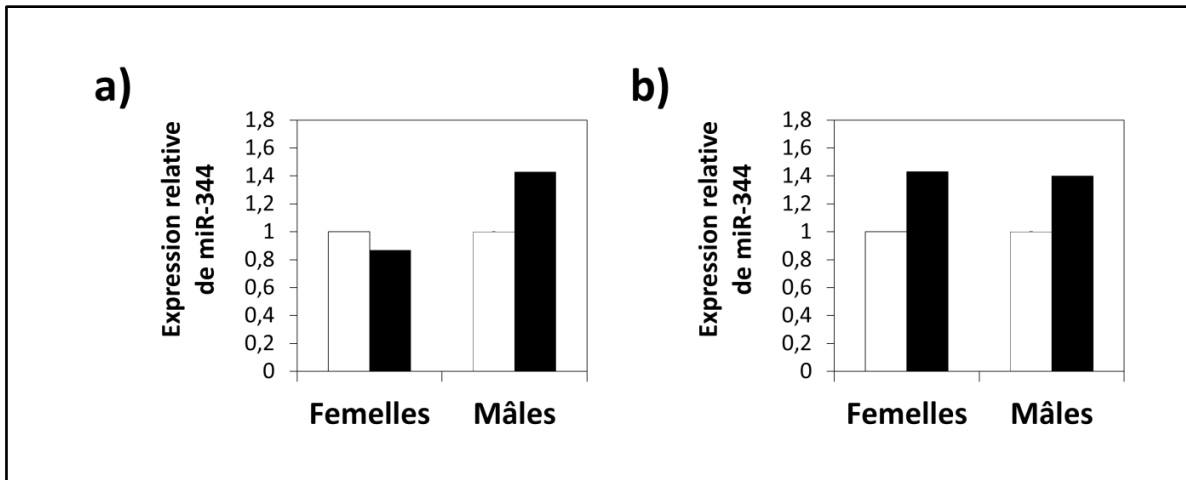


Figure 35 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur l'expression de miR-344 dans le cerveau à J₂₁.

a) Expression relative de miR-344 dans l'hippocampe des femelles et des mâles, contrôles ou MDD à J₂₁. Le niveau de miR-344 est exprimé en fonction de miR-487 et du snARN-U6.

b) Expression relative de miR-344 dans le cortex des femelles et des mâles, contrôles ou MDD à J₂₁. Le niveau de miR-344 est exprimé en fonction de miR-487 et du snARN-U6.

N = 5 par groupe ; les barres blanches représentent les contrôles et les noires les carencés.

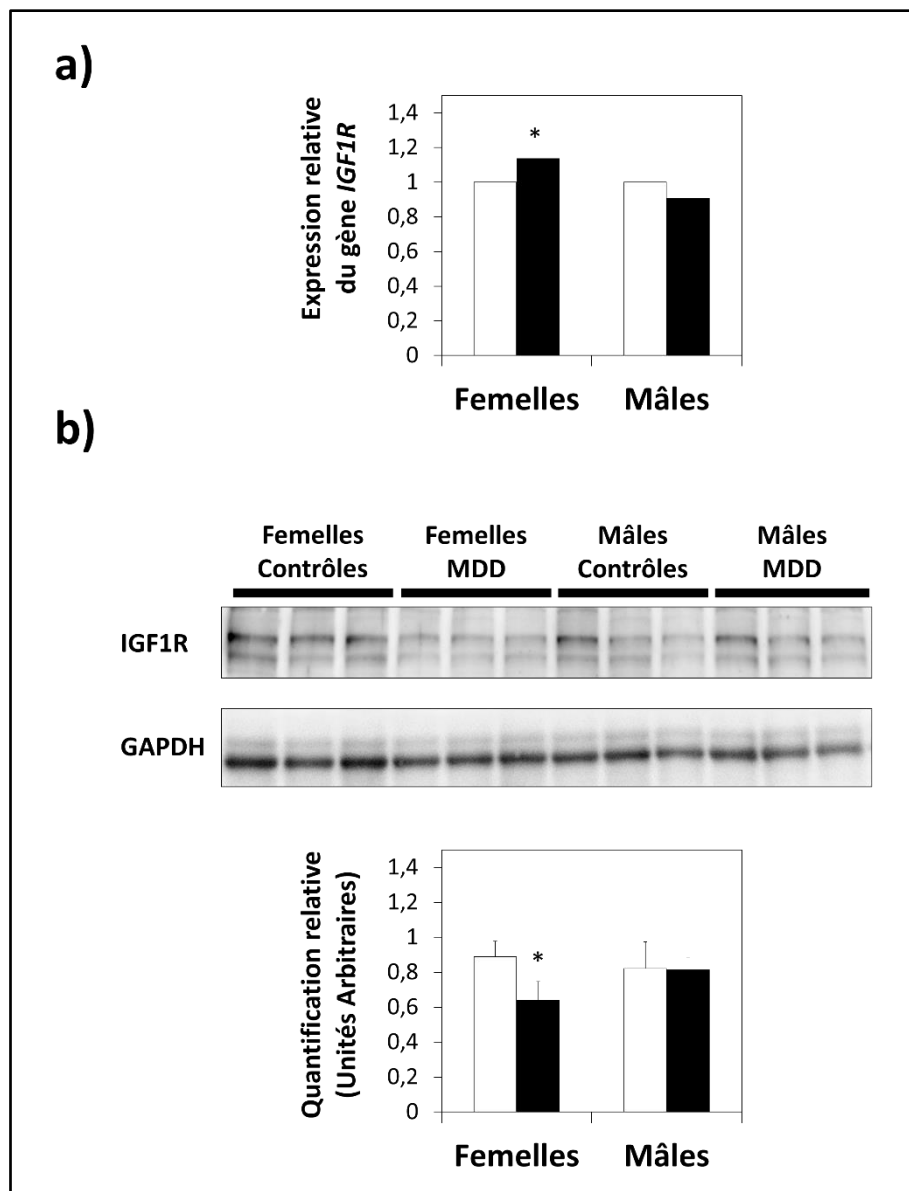


Figure 36 : Effet de la carence précoce en donneur de méthyles sur l'expression du récepteur à l'IGF-1 dans le cervelet à J₂₁.

a) Expression relative du gène codant pour le récepteur à l'IGF-1 (*IGF-1R*) dans le cervelet des femelles et des mâles, contrôles et MDD à J₂₁. Le niveau d'*IGF1R* est exprimé par rapport au gène de référence *gapdh*.

b) Expression protéique de IGF-1R dans le cervelet des femelles et des mâles, contrôles et MDD à J₂₁. Le niveau d'IGF-1R est exprimé en fonction de la protéine de référence GAPDH. L'histogramme représente le résultat de l'analyse densitométrique.

N = 3 par groupe ; * $p \leq 0,05$; les barres blanches représentent les contrôles et les noires les carencés.

3. Hypothèse : miR-344 régule la voie wnt canonique en ciblant GSK-3 β .

a. Description

Nous avons vu précédemment que la voie wnt était dérégulée dans le cervelet des femelles en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles. Si nous nous sommes initialement intéressés à cette voie de signalisation, c'est parce que miR-344 est prédit comme pouvant cibler GSK-3 β . De plus, une étude menée dans une lignée d'adipocytes de souris a montré qu'une surexpression de miR-344 —à l'aide de miR-mimics— entraînait une diminution d'expression de GSK-3 β , et une augmentation du niveau de β -caténine et des gènes-cibles de la voie wnt canonique (Chen et al., 2014).

Nous avons donc formulé l'hypothèse qu'une diminution d'expression de miR-344 en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet pourrait être à l'origine d'altérations de la voie wnt canonique (**Figure 37**), ce qui aurait pour conséquence les défauts structuraux et moléculaires observés dans le cervelet (Blaise et al., 2007; El Hajj Chehadeh et al., 2014b **annexe 2**; Pourié et al., 2015).

b. Choix de la lignée cellulaire

Nous avons en effet mesuré et décrits ces défauts moléculaires de la voie wnt canonique. Afin de valider l'interaction réelle entre miR-344 et GSK-3 β , nous avons surexprimé ce miARN dans un modèle cellulaire à l'aide de miR-mimics.

Nous avons tout d'abord testé le niveau basal d'expression de miR-344 au sein de 5 lignées cellulaires : les C6, une lignée de gliome de rat ; les HEK-293, une lignée de cellules embryonnaires de rein humain ; les NIE-115, une lignée de neuroblastome de souris ; les PC-12, une lignée de phéochromocytome humain présenté précédemment ; et les P-19 qui sont une lignée de carcinome murin embryonnaire.

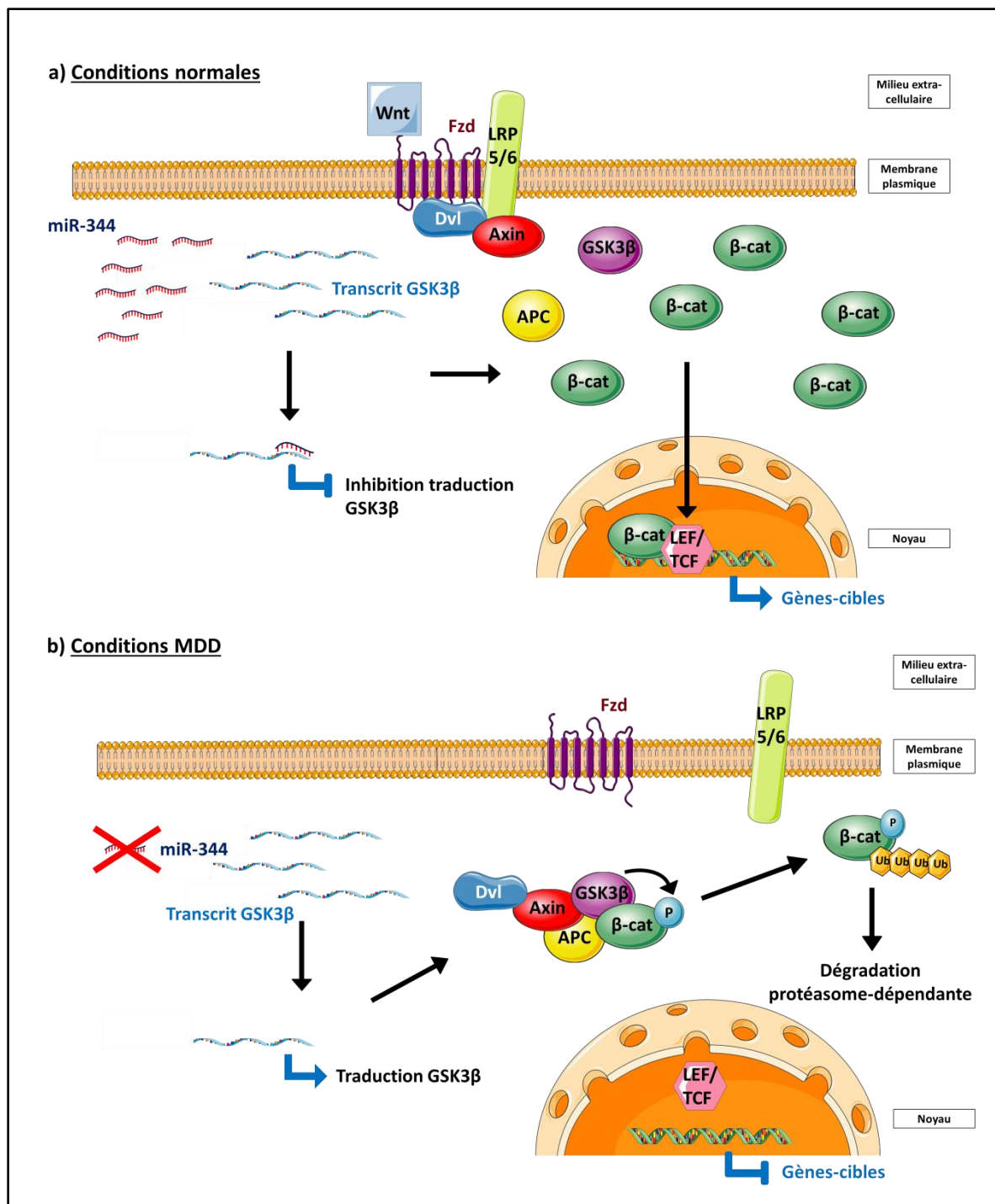


Figure 37 : Hypothèse de régulation de la voie wnt canonique par miR-344.

miR-344 est prédit pour cibler GSK-3β. En condition normales **a)** (forte quantité de miR-344), GSK-3β est donc inhibée, ce qui conduit à la dislocation du complexe cytoplasmique constitué de GSK-3β, β-caténine, APC, Axine et Dvl1. β-caténine n'est plus dégradée par le protéasome et peut aller exercer son rôle de co-activateur transcriptionnel dans le noyau avec le facteur de transcription LEF/TCF. Les gènes-cibles de la voie wnt canonique impliqués notamment dans la prolifération des

progéniteurs neuronaux sont donc exprimés, ce qui permettrait le développement normal du cervelet.

En condition MDD **b)** (faible quantité de miR-344), GSK-3 β est fortement exprimée, ce qui conduit à la dégradation de β -caténine et donc à une faible expression des gènes-cibles de la voie wnt canonique. Cela aurait pour conséquence des défauts de la balance prolifération / différenciation au cours du développement cérébelleux et serait à l'origine des défauts fonctionnels précédemment décrits dans le cadre de la carence précoce en donneurs de méthyles.

Nous n'avons pas détecté d'expression de miR-344 dans les C6, Les P19 et les HEK-293 et de très faibles quantités dans les NIE-115 et les PC-12 (résultats non présentés). Quelle que soit la lignée, les niveaux de miR-344 endogènes sont trop faibles pour perturber les expérimentations de surexpression. Nous avons décidé d'utiliser les PC-12, pour leur phénotype neuroblastique et leur origine murine.

c. Effet de la surexpression de miR-344 sur la voie wnt canonique

Nous avons surexprimé miR-344 dans les PC-12 pendant 48 et 72 h et nous avons ensuite mesuré le niveau protéique de GSK-3 β et de β -caténine par western blot (**Figure 38**). De manière surprenante, nous avons observé une augmentation d'expression de GSK-3 β à 72 h de culture que nous n'avons pas retrouvée à 48 h (**Figure 38-b**). En revanche, nous avons une augmentation du niveau de β -caténine à 72 h, alors que nous aurions pu attendre une diminution. Quoi qu'il en soit, il semblerait que miR-344 ne permette pas de réguler la voie wnt canonique, même si l'expérience n'a été répétée que deux fois et qu'aucune analyse statistique n'a de ce fait été réalisée.

4. Effets de la surexpression de miR-344 sur la prolifération et la mort cellulaire

a. Prolifération

Nous n'avons pas réussi à mettre évidence de cible directe de miR-344. Nous avons donc voulu décrire de manière plus large son rôle au sein de la cellule. Nous l'avons donc surexprimé pendant 48 h et 72 h dans des PC-12 et avons réalisé des observations macroscopiques de l'effet de cette surexpression sur le tapis cellulaire (**Figure 39 et Figure 40**).

Nous voyons qu'après 48 h et après 72 h, la surexpression de miR-344 (**Figure 39-b et Figure 40-b**) entraîne un décollement et une mortalité cellulaires très élevés, c'est-à-dire dans les mêmes proportions qu'avec la transfection du contrôle de mort cellulaire (**Figure 39-a et Figure 40-a**). Cet effet n'est pas retrouvé dans les puits transfectés avec miR-1

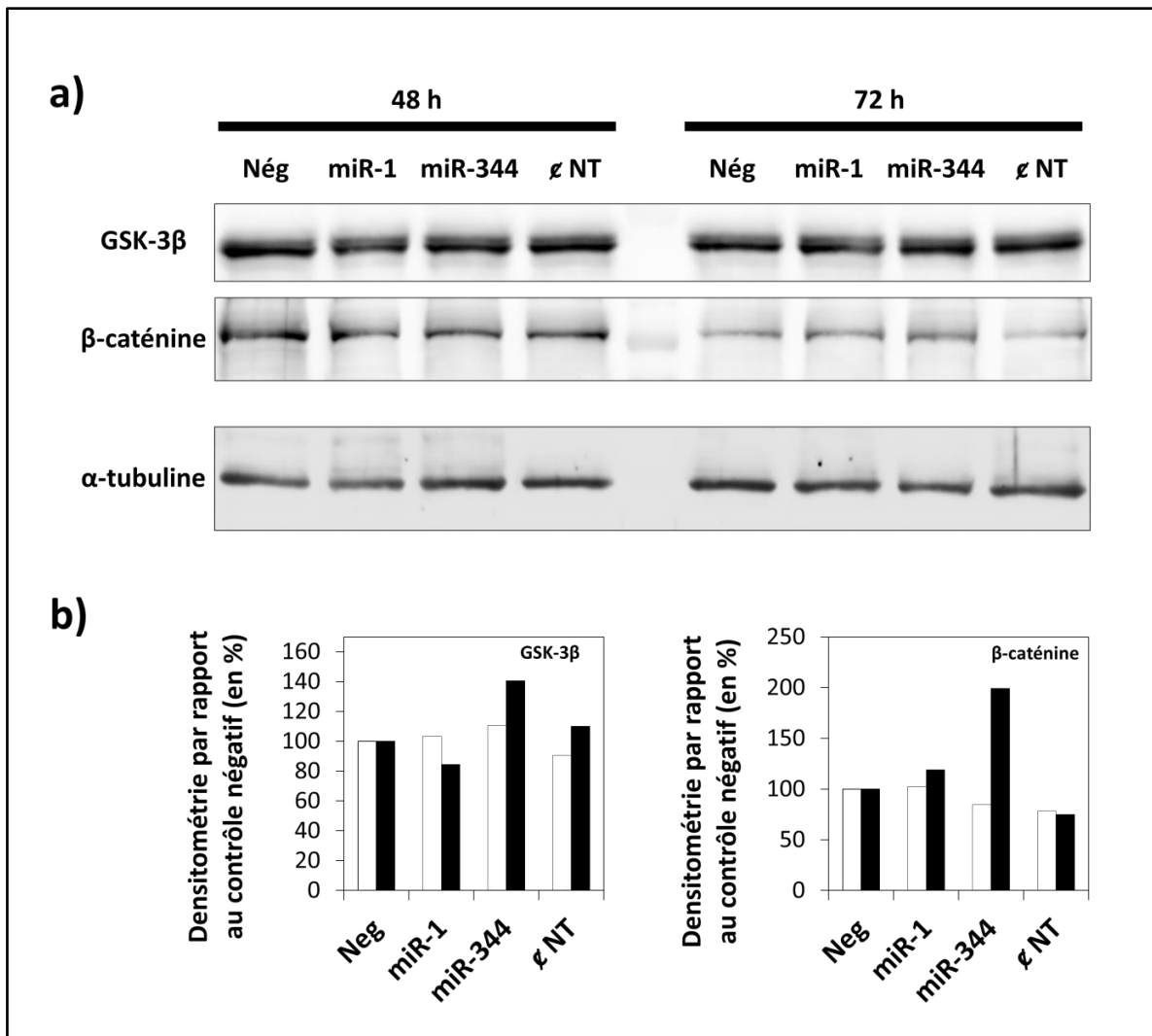


Figure 38 : Effet de la surexpression de miR-344 sur l'expression des protéines impliquées dans la voie wnt canonique.

a) Expression protéique de GSK-3β et β-caténine après transfection d'un miARN synthétique n'étant pas exprimé chez les eucaryotes (**Nég**), de **miR-1**, de **miR-344** ou sans transfection (**∅ NT**) pendant 48 h ou 72 h par rapport à la protéine de référence α-tubuline dans les PC-12.

b) Analyse densitométrique des western blots présentés en a). Le niveau de GSK-3β et de β-caténine est exprimé par rapport au contrôle négatif (**Nég**).

L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. Les barres blanches des histogrammes représentent une culture de 48 h et les barres noires de 72 h.

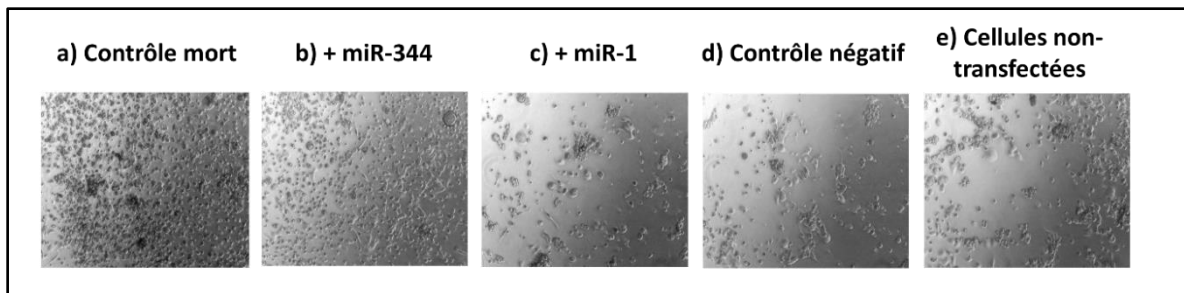


Figure 39 : Observations microscopiques de l'effet de la surexpression de miR-344 pendant 48 h dans des PC-12.

Chaque puits a étéensemencé avec 250 000 cellules puis transfecté ou non avec **a)** 300 ng d'un mélange de siARNs ciblant des gènes de la survie cellulaire et entraînant donc la mort cellulaire ; **b)** 300 ng de mimic miR-344 ; **c)** 300 ng de miR-1 ; **d)** 300 ng d'un miARN synthétique n'étant pas exprimé chez les eucaryotes ; **e)** cellules non transfectées pendant 48 h. Des photographies sont ensuite prises en microscopie optique au grossissement x 40.

L'expérience a été réalisée 3 fois, ce qui a permis la mise au point des conditions optimales de transfection.

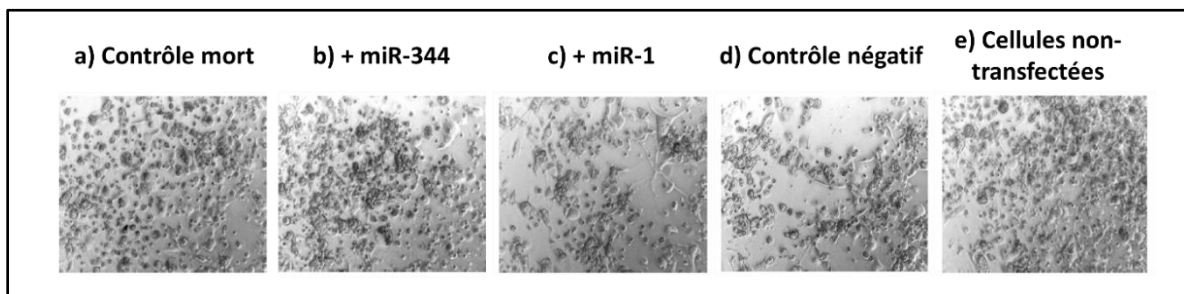


Figure 40 : Observations microscopiques de l'effet de la surexpression de miR-344 pendant 72 h dans des PC-12.

Chaque puits a étéensemencé avec 250 000 cellules puis transfecté ou non avec **a)** 300 ng d'un mélange de siARNs ciblant des gènes de la survie cellulaire et entraînant donc la mort cellulaire ; **b)** 300 ng de mimic miR-344 ; **c)** 300 ng de miR-1 ; **d)** 300 ng d'un miARN synthétique n'étant pas exprimé chez les eucaryotes ; **e)** cellules non transfectées pendant 48 h. Des photographies sont ensuite prises en microscopie optique au grossissement x 40.

L'expérience a été réalisée 3 fois, ce qui a permis la mise au point des conditions optimales de transfection.

(Figure 39-c et Figure 40-c) ou avec un miARN synthétique n'ayant pas de cible chez les eucaryotes (Figure 39-d et Figure 40-d).

Il semblerait donc que miR-344 possède un rôle important dans le contrôle de la balance prolifération / mort cellulaire.

b. Mort cellulaire

Nous avons vu que la surexpression de miR-344 induisait une mort cellulaire *in vitro*, et nous avons donc tenté de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus. Il existe différents types de morts cellulaires : la nécrose, l'autophagie et l'apoptose. Cette dernière étant la mieux décrite, nous nous sommes intéressés à deux marqueurs de l'apoptose : PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) qui est un marqueur d'apoptose précoce, et caspase 9 un marqueur plus tardif impliqué dans l'apoptose par voie mitochondriale. Nous avons mesuré par western blot la forme clivée de ces deux protéines, qui correspondent aux fragments que l'on retrouve en situation d'apoptose.

Nous avons donc mesuré l'expression de PARP clivée et de caspase 9 clivée dans des PC-12 dans lesquelles nous avons surexprimé miR-344 par miR-mimics pendant 48 et 72 h (Figure 41-a et b). De manière surprenante, que ce soit à 48 h ou à 72 h, nous observons une diminution du niveau de ces deux marqueurs de l'apoptose par rapport aux différents contrôles (cellules non transfectées, transfectées avec miR-1 ou avec un miARN synthétique ne possédant pas de cible chez les eucaryotes).

Cette expérience n'a cependant été réalisée qu'une seule fois et de ce fait aucune étude statistique n'a été menée. Si ces résultats sont confirmés, cela signifierait que la mort cellulaire constatée au niveau macroscopique ne met pas en jeu l'apoptose.

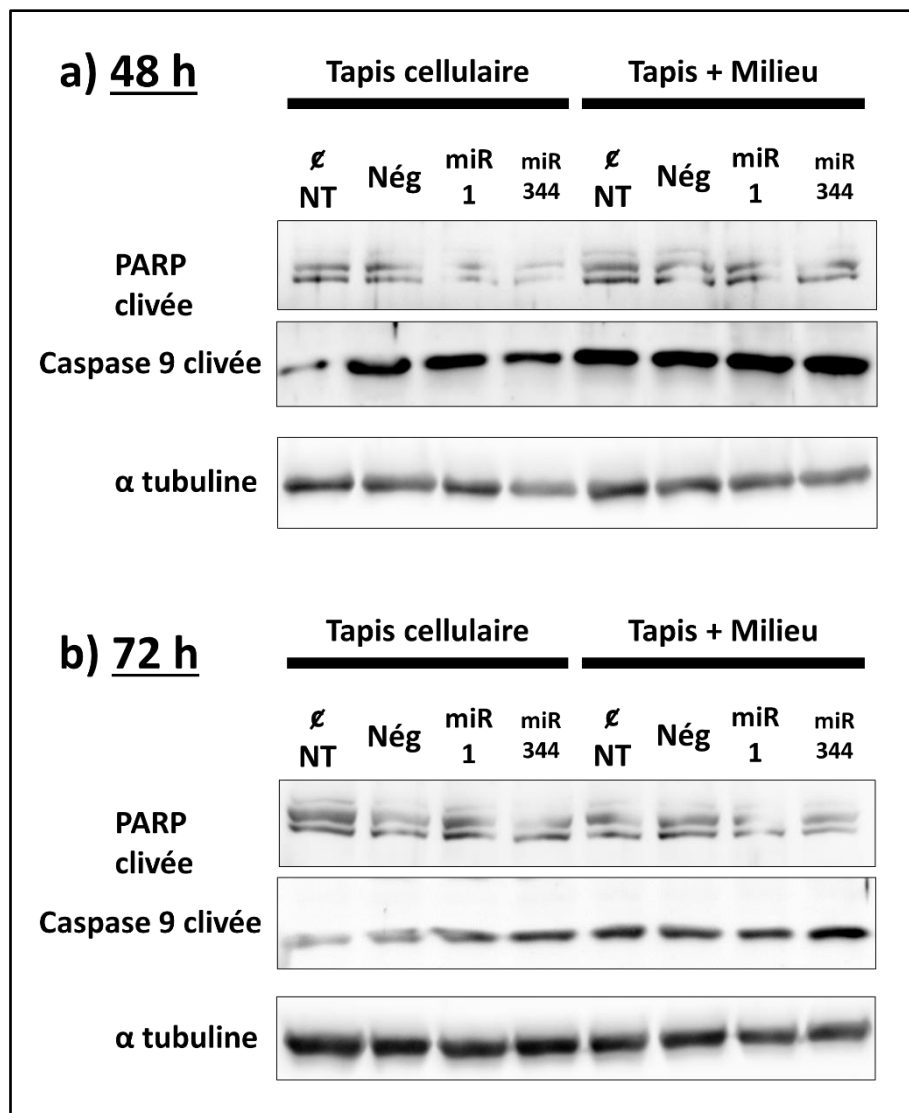


Figure 41 : Effets de la surexpression de miR-344 sur l'apoptose.

a) Expression protéique de deux marqueurs de l'apoptose, PARP clivée et Caspase 9 clivée dans des PC-12 non-transfectées (∅ NT) ou après transfection d'un miARN synthétique n'étant pas exprimé chez les eucaryotes (Nég), de miR-1 ou de miR-344 pendant 48 h par rapport à la protéine de référence α-tubuline.

b) Expression protéique de deux marqueurs de l'apoptose, PARP clivée et Caspase 9 clivée dans des PC-12 non-transfectées (∅ NT) ou après transfection d'un miARN synthétique n'étant pas exprimé chez les eucaryotes (Nég), de miR-1 ou de miR-344 pendant 72 h par rapport à la protéine de référence α-tubuline.

II. Conclusion et discussion

Dans la seconde partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux modifications de l'épigénome en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles. De précédentes études menées au laboratoire sur le modèle MDD ont montré l'existence de dérégulations épigénétiques ciblées, causées par cette déprivation (Geoffroy et al., 2016; Kerek et al., 2013). D'autres, ont permis de souligner des variations plus globales, telles que des défauts de méthylation de l'ADN (Chen et al., 2015; El Hajj Chehadeh et al., 2014a). Dans ce travail, nous avons voulu aller plus loin dans la compréhension des mécanismes épigénomiques mis en jeu dans la réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles au niveau central.

Nous avons donc étudié les modifications de 10 marques histones sur l'ensemble de l'épigénome dans le cervelet des femelles carencées à J₂₁. Une déprivation en folates et en cobalamine est à l'origine d'une baisse du ratio SAM/SAH (Blaise et al., 2007), et donc potentiellement d'une diminution globale de méthylation au sein de la cellule. Si cela a été mis en évidence au niveau de l'ADN comme expliqué précédemment, nous avons montré ici que seules certaines méthylations étaient altérées concernant les histones : H₃K₄Me₂, H₃K₃₆Me₃ et H₄R₃Me_{2a} (**Figure 30**). Cette dernière modification est d'ailleurs plus présente chez les MDD que chez les contrôles, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse selon laquelle toutes les méthylations seraient diminuées en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles.

Ces résultats permettent de souligner certes, des dérégulations épigénomiques en réponse à la carence, mais aussi de poser la question sur l'importance et la hiérarchisation de ces altérations. Si la disponibilité en donneurs de méthyles baisse au sein de la cellule, on pourrait supposer qu'à la manière de l'ADN, la méthylation des histones soit globalement diminuée chez les MDD. Nous montrons ici en revanche, que cette hypothèse est incorrecte et que la réalité biologique est bien plus complexe.

Concernant l'acétylation des histones, nous avons montré une tendance à l'augmentation dans le cervelet des femelles MDD (**Figure 31**). Une fois encore cependant, toutes les marques que nous avons testé ne sont pas altérées, et les conclusions quant à la complexité, à la fois du code histone, mais aussi de l'impact de la MDD sur l'épigénome sont

les mêmes que précédemment. Par exemple, nous observons une augmentation de l'acétylation de H₃K₁₄ (**Figure 31**) en condition MDD, alors qu'une des HAT impliquée dans cette modification est P300, dont l'expression diminue en réponse à la carence chez les femelles (**Figure 5-C article**). H₃K₁₄ peut en revanche être modifiée par pas moins d'une douzaine d'enzymes différentes auxquelles nous ne nous sommes pas intéressés (**tableau code histones annexe 1**). Ainsi les marques histones sont très finement régulées et sont le résultat d'un équilibre entre les nombreuses enzymes de modification qui leurs sont associées. De la même manière, la multiplicité des modifications des *histone tails* (**tableau code histones annexe 1**) ajoute un degré de difficulté supplémentaire à la compréhension de ces processus. Nous n'avons par exemple regardé qu'un type de phosphorylation, alors que plusieurs dizaines sont recensées. Enfin, nous avons aussi délaissé l'ubiquitinylation, la sumoylation ou la biotinylation des histones qui sont bien moins comprises et étudiées.

Bien que nous ayons montré des variations de plusieurs gènes impliqués dans la structure de la chromatine (**Figure 29**), nous n'avons pas étudié leur niveau d'expression protéique. D'autre part, ces quelques gènes ne suffisent pas à expliquer l'ensemble des modifications épigénomiques décrites précédemment. Ainsi, nos travaux ont permis d'effectuer une première vue d'ensemble de l'implication du code histone dans la réponse à la MDD, mais ils méritent d'être approfondis.

Nous ne retrouvons pas ici les mêmes variations que celles montrées précédemment au laboratoire dans le modèle MDD (Pellanda et al., 2012). Cette étude portait cependant sur le foie et les modifications des marques histones peuvent être différentes d'un type cellulaire ou d'un organe à un autre malgré le même contexte nutritionnel ou pathologique. Il est nécessaire d'aller approfondir l'étude de l'expression des protéines impliquées dans la modification de la chromatine pour mieux comprendre les changements de l'épigénome en réponse à la MDD.

Dans un second temps, et toujours dans le cadre d'une approche globale, nous avons étudié l'ensemble des miARNs du cervelet à J₂₁ et leurs variations d'expression en réponse à une carence précoce en donneurs de méthyles. Le cheminement de l'analyse

bioinformatique que nous avons réalisée n'a pas été présentée ici mais cette dernière a permis de mettre en évidence deux résultats extrêmement intéressants au-delà des miARNs différentiellement exprimés. Le premier élément est le faible niveau d'expression global des miARNs dans le cervelet. C'est par ailleurs le cas dans certains tissus extrêmement spécialisés. L'hypothèse est qu'un faible niveau de miARNs permettrait une forte expression des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Cela est notamment montré par des analyses de profils miARNs au cours des différentes étapes de l'hématopoïèse (Garzon et al., 2006). D'un point de vue purement technique, cette faible expression globale des miARNs dans le cervelet nécessite une sélection extrêmement stringente des DEmiRs afin d'éviter tout faux-positif. Ce phénomène explique que seul un faible nombre de DEmiRs ait été retrouvé dans nos animaux. Le second point important a été révélé par l'analyse en composante principale qui a permis de mettre en évidence trois facteurs entraînant des variations d'expression des miARNs dans nos échantillons (résultats non présentés). Si le sexe et le régime alimentaire (contrôle ou MDD) sont deux d'entre eux, le troisième n'est en revanche pas identifiable.

Dans un protocole d'expérimentation animale et d'autant plus dans le cadre du modèle MDD, tout est mis en place afin de contrôler un maximum de facteur environnementaux pour éviter qu'ils ne deviennent des variables, d'un protocole à un autre. Aussi, nous pensons que ce troisième facteur n'est autre que la variation inter-individu qui est inhérente à tout modèle animal, mais qui ne permet de tirer des conclusions quant aux résultats de l'analyse *microarray* uniquement sur les animaux utilisés pour cette étude. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser d'autres rats afin de valider expérimentalement ces résultats. De ce fait, le nombre de DEmiRs obtenus par qPCR (**Figure 34**) est inférieur à celui de l'étude globale du miRnome, mais ils représentent une réalité biologique plus forte.

Nous avons ainsi dégagé un miARN candidat dont l'expression est diminuée chez les mâles et chez les femelles carencés : miR-344-5p (**Figure 34**). Nous avons montré que son expression n'est pas restreinte au cervelet, mais que la baisse observée chez les MDD n'est en revanche pas retrouvée dans les autres structures cérébrales (**Figure 35**). Nous avons aussi tenté de le détecter dans le cortex de souris *CD320*, un modèle de souris *knock-down*

pour le récepteur de la transcobalamine, qui est responsable de l'internalisation de la vitamine B12. Nous n'avons néanmoins pas réussi à l'amplifier par qPCR (résultats non présentés). Enfin, nous avons planifié de nous intéresser à son expression dans d'autres organes particulièrement sensibles à la MDD, tels que le foie et le cœur (Bison et al., 2016; Guéant et al., 2014).

MiR-344 semble particulièrement prometteur dans la mesure où il est prédit comme étant un co-régulateur majeur du métabolisme des monocarbones (Stone et al., 2011). Par ailleurs, il est aussi prédit par les bases de données comme pouvant réguler l'expression de GSK-3 β , la kinase impliquée dans la voie wnt canonique dont nous avons parlé précédemment (**Figure 7**). Une étude menée sur une lignée adipocytaire murine, abonde en ce sens en démontrant une moindre activation de la voie wnt canonique lors de la surexpression de miR-344 (Chen et al., 2014). Nous n'avons cependant pas réussi à valider cette interaction malgré les expériences de surexpression que nous avons menées (**Figure 38**).

Bien que nous n'ayons à l'heure actuelle, pas déterminé de cible de miR-344, nous avons tout de même montré son implication dans la mort cellulaire, par des expériences de surexpression dans la lignée PC-12 (**Figure 39 et Figure 40**). En revanche, cette mort cellulaire ne semble pas être apoptotique, étant donné que les marqueurs classiques, PARP clivée et Caspase-9 clivée ne sont pas plus représentés après surexpression de miR-344 (**Figure 41**). Ces expériences sont actuellement réitérées afin de s'assurer de la validité de nos résultats. Nous sommes aussi en train de mettre au point des protocoles d'inhibition d'expression de miR-344 dans le même modèle cellulaire toujours dans le but de déterminer ses fonctions biologiques. Enfin, lorsque nous y serons parvenus, nous observerons son rôle dans le développement en mesurant son expression dans le cervelet au cours de l'embryogenèse, notamment à E20, J₀, J₅ et J₁₀ chez les MDD. Cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles au cours du développement.

Si nous avons montré que la MDD possédait un effet global sur l'épigénome concernant la modification des marques histones dans le cervelet, il semblerait les variations d'expression des miARNs soient beaucoup plus ciblées. En effet, seul un faible nombre d'entre eux est dérégulé en condition de carence. Ces résultats nécessitent cependant d'être approfondis et ne constituent à l'heure actuelle qu'un état des lieux et un point de départ dans la compréhension des modifications épigénomiques dans le cadre de notre modèle. Enfin, dans la première partie de nos travaux nous avons illustré les différences entre mâles et femelles dans la réponse à la MDD, avec par exemple une signalisation wnt canonique uniquement modifiée dans le cervelet des femelles (**Figure 27**). Concernant la validation des résultats du miRnome en revanche, nous ne nous sommes intéressés qu'aux DE miRS en fonction du régime. Ainsi, l'analyse des miARNs dont l'expression varie en fonction du sexe nous permettra de mieux comprendre les réponses différentes à la carence précoce en donneur de méthyles qui sont observées entre femelles et mâles.

Perspectives

Nous avons vu que la carence précoce en donneurs de méthyles entraînait des variations de nombreux gènes impliqués dans le développement, la structure et le fonctionnement du cervelet (**tableau IV et Tableau V article**). Une étude portant sur une carence prolongée en vitamine B12 montre une dérégulation du facteur de transcription CREB et de la voie de signalisation dépendant du facteur de croissance BDNF (Sable et al., 2014). Nous avons observé des résultats similaires avec une diminution de CREB dans le cervelet des femelles MDD, et de la voie de la PKC (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Les carences alimentaires —de manière générale— ont des effets délétères sur le développement cérébral et les effets de la MDD peuvent être comparés à ceux obtenus dans le cadre d'une carence en protéines par exemple où il a été montré dans l'hypothalamus des variations d'expression de groupes de gènes impliqués dans la transmission synaptique (GO ID 0007268), la neurogenèse (GO ID 0022008) ou encore des termes GO liés au transport et à la régulation des ions et l'activité des kinases qui en dépendent (GO ID 0043167, 0016301), (Orozco-Solís et al., 2010).

D'après l'hypothèse de la programmation fœtale, des événements délétères au cours du développement pourraient avoir des conséquences sur la survenue de pathologies à l'âge adulte. La compréhension de la programmation fœtale pourrait passer par l'étude des modifications épigénomiques qui constituent la mémoire cellulaire. Ainsi, des carences nutritionnelles au cours du développement entraînent des défauts de transport des nutriments et de l'oxygène vers le fœtus (Sakai et al., 2013) lors du développement, ce qui favorise des défauts de la fonction mitochondriale, ces dernières devant alors s'adapter afin de pallier à ce déficit énergétique (Rando and Simmons, 2015). Nous avons retrouvé une modification d'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mitochondrial dans le cervelet des femelles MDD (**Tableau III article**). Cette dérégulation pourrait être à l'origine de la survenue d'événements de stress oxydatif cellulaire chez les MDD. Il a par exemple été montré une augmentation du stress oxydatif dans un contexte de restriction au cours du développement dans le cerveau de lapin où la prolifération neuronale est ici aussi altérée (van Vliet et al., 2013). De surcroît dans le modèle MDD, l'accumulation d'Hcy tissulaire précédemment mise en évidence dans le cerveau pourrait favoriser la survenue de ces événements (Blaise et al., 2007).

Ainsi, la diminution du *ratio* SAM/SAH, qui est à l'origine d'altérations épigénétiques (Kaelin and McKnight, 2013) et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en conditions MDD pourraient être une des causes des modifications épigénétiques décrites en condition de restrictions de croissance foétale telles que des défauts de méthylation de l'ADN, des marques histones et des ARNs non-codants (MacLennan et al., 2004). A cela s'ajoutent les modifications d'expression de gènes impliqués dans la structure de la chromatine, dont nous avons montré que plusieurs étaient dérégulés dans le cervelet en réponse à la MDD. Il sera cependant nécessaire d'aller analyser leur niveau protéique afin de faire le lien avec les modifications des histones que nous avons mis en évidence. Il s'agit cependant régulations complexes où une même modification peut être causée par les activités de nombreuses enzymes aux effets parfois opposés (**tableau code histones annexe 1**).

En étudiant l'épigénome du cervelet en réponse à la carence précoce en donneurs de méthyles, nous avons montré des altérations de l'épigénome. Nous avons mis en évidence des modifications des marques histones (**Figure 30 et Figure 31**) dans le cervelet des femelles à J₂₁. Nous avons montré une diminution de la marque H₃K₃₆Me₃ dans le cervelet des femelles carencées. Set2 est la méthylase responsable de cette triméthylation, ce qui est à l'origine du recrutement de HAT qui vont induire des modifications globales de l'acétylation des histones (Crisucci and Arndt, 2011). Les phénomènes d'interactions existant entre les différentes marques des histones compliquent leur étude, mais nous avons cependant commencé à nous intéresser à Set2, afin de mieux comprendre les régulations épigénomiques mises en place dans la réponse à la carence.

Nous avons parlé de changements globaux au niveau de l'épigénome, mais nous avons aussi mis en évidence des modifications plus ciblées. C'est par exemple le cas avec miR-344, dont l'expression diminue chez les MDD (**Figure 34**). Nous avons montré que son expression n'était altérée que dans le cervelet (**Figure 35**). Les premiers résultats semblent indiquer que miR-344 est impliqué dans la balance prolifération / mort cellulaire (**Figure 39, Figure 40 et Figure 41**). Ces résultats vont dans le même sens que ceux de l'analyse

transcriptomique où nous avons montré des dérégulations des voies wnt et notamment une activation moindre de la voie wnt canonique qui est essentielle à la prolifération des progéniteurs neuronaux (Lucas and Salinas, 1997; Salinas et al., 1994). Les résultats faisant état d'une mort cellulaire qui ne dépendrait pas de l'apoptose (**Figure 41**) n'ont cependant été obtenus qu'une seule fois, et nous avons prévu de réaliser ces expériences à nouveau.

Les cibles de miR-344 ne sont pas décrites à l'heure actuelle. Nous avons mis en place un modèle de surexpression et d'inhibition (résultats non présentés) *in vitro* de miR-344 afin d'étudier ses fonctions. Nous avons émis l'hypothèse que la voie wnt canonique était régulée par miR-344 *via* des changements d'expression de GSK-3 β . Nous n'avons cependant pas mis en évidence de variations d'expression de cette dernière en conditions de surexpressions de miR-344 *in vitro* (**Figure 38**).

Le récepteur au facteur de croissance IGF-1 est une autre cible potentielle de miR-344. Il est impliqué dans le développement cérébral (Garcia-Segura et al., 2010) et la neurogenèse et des défauts dans cette voie de signalisation permettraient d'établir un premier lien entre les résultats obtenus en transcriptomique avec ceux du miRnome. Nous nous intéresserons donc à l'expression du gène *Igf1r* et sa protéine associée en conditions de surexpression et d'inhibition *in vitro* de miR-344 dans la lignée cellulaire PC-12.

Nous avons prévu de nous intéresser à l'expression de miR-344 au cours du développement et notamment à E20, J₅ et J₁₀. Nous regarderons à partir de quel moment son expression est dérégulée et si un *switch* d'expression peut être mis en évidence, afin de mieux comprendre son implication au cours du développement. De la même manière, nous étudierons ses cibles potentielles ou les fonctions dans lesquelles il est impliqué aux mêmes stades du développement du cerveau.

Si les modifications des histones sont des variations globales de l'épigénome, elles entraînent cependant des changements localisés de l'expression génique. Nous avons commencé à mettre au point des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP)

en ciblant des marques histones dérégulées afin d'étudier un potentiel enrichissement en promoteurs de gènes d'intérêt tels que ceux de *gria2* ou *ccd1*, dont on sait que l'expression est dérégulée chez les MDD. Cette approche est certes plus ciblée, mais elle permettra d'améliorer notre compréhension des mécanismes épigénétiques mis en place en réponse MDD et de faire le lien avec les dérégulations à l'origine du phénotype MDD dans le système nerveux central.

Nous avons par ailleurs commencé la mise au point d'un modèle cellulaire de déprivation totale en acide folique, afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse spécifique à une carence en folates. Nous avons montré une mort cellulaire importante en cas de carence prolongée au-delà de 48 h (résultats non présentés). Nous nous sommes aussi intéressés à la voie wnt canonique dans ce modèle *in vitro* de carence en folates, mais nous n'avons pas observé de changements d'expression des protéines-clés de cette voie de signalisation. Ces résultats restent cependant à confirmer.

Au-delà des aspects développementaux causés par la MDD, le cumul de ces altérations épigénétiques et épigénomiques pourraient donc être à l'origine des effets délétères retrouvés à l'âge adulte avec une augmentation de l'incidence de pathologies touchant le cerveau, ou d'autres organes eux aussi sensibles à la carence. En effet, les défauts de méthylation de l'ADN, des marques histones ou de l'expression des miARNs étant héréditaires, elles pourront se maintenir au cours des divisions cellulaires de la vie de l'individu ce qui entretiendra les événements délétères.

Enfin, nous avons observé un dimorphisme sexuel important dans la réponse à la MDD, qui corrobore les résultats précédemment obtenus sur le modèle MDD et qui indiquent que les femelles y sont plus sensibles que les mâles (El Hajj Chehadeh et al., 2014b, **annexe 2**). Que ce soit concernant la voie wnt canonique —dont nous n'avons pas mesuré de diminution d'activation chez les mâles—, l'expression de gènes impliqués dans la structure de la chromatine ou les variations d'expression des miARNs, ce dimorphisme sexuel est retrouvé à tous les niveaux. Celui-ci n'est cependant pas propre à notre étude, et les modèles animaux, notamment portant sur des études de métabolismes, présentent fréquemment de telles variations. Des résultats similaires ont par exemple été retrouvés

dans un modèle murin de restriction en protéine, glucose et lipides où à l'âge adulte, le métabolisme des femelles est plus affecté que celui des mâles (van Straten et al., 2012). De la même manière, une étude portant sur les effets d'une supplémentation excessive en acide folique a montré des différences d'expression et de méthylation en fonction du sexe, de gènes impliqués dans la physiopathologie de l'autisme (Barua et al., 2016).

Ces variations dépendantes du sexe sont cependant très difficiles à expliquer et leurs causes peuvent être multiples. Concernant le cervelet, nous pensons que les altérations de NSG retrouvées uniquement chez les femelles permettraient d'expliquer en partie ces différences, de par le rôle neuroprotecteur des neurostéroïdes.

Références bibliographiques

Adlakha, Y.K., and Saini, N. (2014). Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Mol. Cancer* 13, 33.

Ahmad-Annuar, A., Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N.B., Rosso, S.B., Hall, A., Brickley, S., and Salinas, P.C. (2006). Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* 174, 127–139.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 786–794.

Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., and Margalit, H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 2697–2706.

Ami, N., Bernstein, M., Boucher, F., Rieder, M., Parker, L., and Canadian Paediatric Society, Drug Therapy and Hazardous Substances Committee (2016). Folate and neural tube defects: The role of supplements and food fortification. *Paediatr. Child Health* 21, 145–154.

Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., and Tajima, S. (2001). Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 29, 3506–3512.

Arnés, M., and Casas Tintó, S. (2017). Aberrant Wnt signaling: a special focus in CNS diseases. *J. Neurogenet.* 1–7.

Bahous, R.H., Jadavji, N.M., Deng, L., Cosín-Tomás, M., Lu, J., Malysheva, O., Leung, K.-Y., Ho, M.-K., Pallàs, M., Kaliman, P., et al. (2017). High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism, with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring. *Hum. Mol. Genet.*

Bamji, S.X., Shimazu, K., Kimes, N., Huelsken, J., Birchmeier, W., Lu, B., and Reichardt, L.F. (2003). Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* 40, 719–731.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.

Barua, S., Kuizon, S., Chadman, K.K., Flory, M.J., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2014). Single-base resolution of mouse offspring brain methylome reveals epigenome modifications caused by gestational folic acid. *Epigenetics Chromatin* 7, 3.

Barua, S., Kuizon, S., Chadman, K.K., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2015). Microarray analysis reveals higher gestational folic Acid alters expression of genes in the cerebellum of mice offspring-a pilot study. *Brain Sci.* 5, 14–31.

Barua, S., Kuizon, S., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2016). High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a sex-Specific Manner in Mouse Offspring. *J. Mol. Neurosci.* **58**, 277–286.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* **33**, 1–13.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885–1898.

Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Mol. Cell* **28**, 328.

Berrocal-Zaragoza, M.I., Sequeira, J.M., Murphy, M.M., Fernandez-Ballart, J.D., Abdel Baki, S.G., Bergold, P.J., and Quadros, E.V. (2014). Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits. *Br. J. Nutr.* **112**, 1323–1332.

Bicker, S., Lackinger, M., Weiß, K., and Schratt, G. (2014). MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 3987–4005.

Bison, A., Marchal-Bressenot, A., Li, Z., Elamouri, I., Feigerlova, E., Peng, L., Houlgatte, R., Beck, B., Pourié, G., Alberto, J.-M., et al. (2016). Foetal programming by methyl donor deficiency produces steato-hepatitis in rats exposed to high fat diet. *Sci. Rep.* **6**, 37207.

Blaise, S., Alberto, J.-M., Nédélec, E., Ayav, A., Pourié, G., Bronowicki, J.-P., Guéant, J.-L., and Daval, J.-L. (2005). Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr. Res.* **57**, 777–782.

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

Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **9**, 1225–1236.

Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39.

Blom, H.J., and Smulders, Y. (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 75–81.

Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101.

Brower-Toland, B., Wacker, D.A., Fulbright, R.M., Lis, J.T., Kraus, W.L., and Wang, M.D. (2005). Specific contributions of histone tails and their acetylation to the mechanical stability of nucleosomes. *J. Mol. Biol.* *346*, 135–146.

Bugalho, P., Correa, B., and Viana-Baptista, M. (2006). [Role of the cerebellum in cognitive and behavioural control: scientific basis and investigation models]. *Acta Med. Port.* *19*, 257–267.

Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 1957–1966.

Cao, D.-D., Li, L., and Chan, W.-Y. (2016). MicroRNAs: Key Regulators in the Central Nervous System and Their Implication in Neurological Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004). Spina bifida and anencephaly before and after folic acid mandate--United States, 1995-1996 and 1999-2000. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* *53*, 362–365.

Cerpa, W., Godoy, J.A., Alfaro, I., Farías, G.G., Metcalfe, M.J., Fuentealba, R., Bonansco, C., and Inestrosa, N.C. (2008). Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* *283*, 5918–5927.

Chandrasekaran, S., and Bonchev, D. (2016). Network analysis of human post-mortem microarrays reveals novel genes, microRNAs, and mechanistic scenarios of potential importance in fighting huntington's disease. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* *14*, 117–130.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* *318*, 444–447.

Chédin, F. (2011). The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *101*, 255–285.

Chen, G., Broséus, J., Hergalant, S., Donnart, A., Chevalier, C., Bolaños-Jiménez, F., Guéant, J.-L., and Houlgatte, R. (2015). Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol. Nutr. Food Res.* *59*, 293–302.

Chen, H., Wang, S., Chen, L., Chen, Y., Wu, M., Zhang, Y., Yu, K., Huang, Z., Qin, L., and Mo, D. (2014). MicroRNA-344 inhibits 3T3-L1 cell differentiation via targeting GSK3 β of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *FEBS Lett.* *588*, 429–435.

Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., and Martin, G.R. (2003). The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Dev. Camb. Engl.* *130*, 2633–2644.

Choi, J.K. (2010). Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biol.* *11*, R70.

Ciani, L., and Salinas, P.C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 351–362.

Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M.J., Dale, T.C., and Salinas, P.C. (2004). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *J. Cell Biol.* *164*, 243–253.

Ciani, L., Boyle, K.A., Dickins, E., Sahores, M., Anane, D., Lopes, D.M., Gibb, A.J., and Salinas, P.C. (2011). Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10732–10737.

Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *33*, 18–41.

Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 319–332.

Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., and Baulieu, E.E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 4704–4707.

Crisucci, E.M., and Arndt, K.M. (2011). The Roles of the Paf1 Complex and Associated Histone Modifications in Regulating Gene Expression. *Genet. Res. Int.* *2011*.

Crott, J.W., Liu, Z., Keyes, M.K., Choi, S.-W., Jang, H., Moyer, M.P., and Mason, J.B. (2008). Moderate folate depletion modulates the expression of selected genes involved in cell cycle, intracellular signaling and folate uptake in human colonic epithelial cell lines. *J. Nutr. Biochem.* *19*, 328–335.

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

De, A. (2011). Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *43*, 745–756.

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

El Hajj Chehadeh, S., Pourié, G., Martin, N., Alberto, J.-M., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., and Leininger-Muller, B. (2014a). 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.* *111*, 1021–1031.

El Hajj Chehadeh, S., Dreumont, N., Willekens, J., Canabady-Rochelle, L., Jeannesson, E., Alberto, J.-M., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., and Leininger-Muller, B. (2014b). Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *307*, E1009-1019.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 9–22.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* *132*, 9–14.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.

Fanto, M., and McNeill, H. (2004). Planar polarity from flies to vertebrates. *J. Cell Sci.* *117*, 527–533.

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

Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S., and Jeltsch, A. (2001). The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA1. *J. Mol. Biol.* *309*, 1189–1199.

Feng, Y., Zhang, X., Graves, P., and Zeng, Y. (2012). A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA N. Y. N* *18*, 2083–2092.

Fiorenza, A., and Barco, A. (2016). Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol. Learn. Mem.* *135*, 3–12.

Fowler, B. (2001). The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int. Suppl.* *78*, S221-229.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.

Furukawa, A., Miyatake, A., Ohnishi, T., and Ichikawa, Y. (1998). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.* *71*, 2231–2238.

Gao, B. (2012). Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Curr. Top. Dev. Biol.* *101*, 263–295.

Gao, Z., Ure, K., Ables, J.L., Lagace, D.C., Nave, K.-A., Goebbels, S., Eisch, A.J., and Hsieh, J. (2009). Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* *12*, 1090–1092.

Garcia-Segura, L.M., Arévalo, M.-A., and Azcoitia, I. (2010). Interactions of estradiol and insulin-like growth factor-I signalling in the nervous system: new advances. *Prog. Brain Res.* *181*, 251–272.

Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., et al. (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5078–5083.

Geoffroy, A., Kerek, R., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Daval, J.-L., and Bossenmeyer-Pourié, C. (2016). Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. *Mol. Neurobiol.*

Goldowitz, D., and Hamre, K. (1998). The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.* *21*, 375–382.

Goodall, E.F., Heath, P.R., Bandmann, O., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2013). Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 178.

Goyal, R., Reinhardt, R., and Jeltsch, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 1182–1188.

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

Guéant, J.-L., Elakoum, R., Ziegler, O., Coelho, D., Feigerlova, E., Daval, J.-L., and Guéant-Rodriguez, R.-M. (2014). Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Arch.* *466*, 833–850.

Hall, A.C., Lucas, F.R., and Salinas, P.C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* *100*, 525–535.

Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009a). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* *136*, 75–84.

Han, M., Serrano, M.C., Lastra-Vicente, R., Brinez, P., Acharya, G., Huhta, J.C., Chen, R., and Linask, K.K. (2009b). Folate rescues lithium-, homocysteine- and Wnt3A-induced vertebrate cardiac anomalies. *Dis. Model. Mech.* *2*, 467–478.

Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. (2009). Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* *138*, 129–145.

Hatten, M.E., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* *18*, 385–408.

Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* 279, 48350–48359.

Hernández, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., and Lucas, J.J. (2002). Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* 83, 1529–1533.

Herrmann, W. (2001). The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39, 666–674.

Hibi, M., and Shimizu, T. (2012). Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev. Neurobiol.* 72, 282–301.

Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205–2232.

Hunt, C.A., Schenker, L.J., and Kennedy, M.B. (1996). PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 1380–1388.

Huttner, W.B., Schiebler, W., Greengard, P., and De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J. Cell Biol.* 96, 1374–1388.

Ikeuchi, Y., Stegmüller, J., Netherton, S., Huynh, M.A., Masu, M., Frank, D., Bonni, S., and Bonni, A. (2009). A SnoN-Ccd1 pathway promotes axonal morphogenesis in the mammalian brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4312–4321.

Inestrosa, N.C., and Arenas, E. (2010). Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 77–86.

Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline (1998). Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline (Washington (DC): National Academies Press (US)).

Iskandar, B.J., Rizk, E., Meier, B., Hariharan, N., Bottiglieri, T., Finnell, R.H., Jarrard, D.F., Banerjee, R.V., Skene, J.H.P., Nelson, A., et al. (2010). Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J. Clin. Invest.* 120, 1603–1616.

Itoh, K., Krupnik, V.E., and Sokol, S.Y. (1998). Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and β -catenin. *Curr. Biol.* 8, 591–594.

Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64.

Jevsinek Skok, D., Godnic, I., Zorc, M., Horvat, S., Dovc, P., Kovac, M., and Kunej, T. (2013). Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species. *Anim. Genet.* *44*, 669–677.

Jönsson, M.E., Nelander Wahlestedt, J., Åkerblom, M., Kirkeby, A., Malmevik, J., Brattaas, P.L., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2015). Comprehensive analysis of microRNA expression in regionalized human neural progenitor cells reveals microRNA-10 as a caudalizing factor. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 3166–3177.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *12*, 206–222.

Kaelin, W.G., and McKnight, S.L. (2013). Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell* *153*, 56–69.

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

Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., and Matsumoto, S. (2011). New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *291*, 21–71.

Kishida, M., Koyama, S., Kishida, S., Matsubara, K., Nakashima, S., Higano, K., Takada, R., Takada, S., and Kikuchi, A. (1999). Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene* *18*, 979–985.

Krichevsky, A.M., Sonntag, K.-C., Isacson, O., and Kosik, K.S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 857–864.

Kumar, S., Vijayan, M., and Reddy, P.H. (2017). MicroRNA-455-3p as a potential peripheral biomarker for Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 3808–3822.

Kung, J.T.Y., Colognori, D., and Lee, J.T. (2013). Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics* *193*, 651–669.

Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D.C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M., and Gage, F.H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* *12*, 1097–1105.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.

Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* *13*, 1095–1107.

Lee, J.S., Ishimoto, A., and Yanagawa, S. (1999). Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J. Biol. Chem.* *274*, 21464–21470.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.

Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865–873.

Leucht, C., Stigloher, C., Wizenmann, A., Klafke, R., Folchert, A., and Bally-Cuif, L. (2008). MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat. Neurosci.* 11, 641–648.

Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 3, 662–673.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., et al. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315–322.

Liu, H., Tian, T., Qin, S., Li, W., Zhang, X., Wang, X., Gao, Y., and Huang, G. (2015). Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1502–1508.

Lucas, F.R., and Salinas, P.C. (1997). WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev. Biol.* 192, 31–44.

Lucas, F.R., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., and Salinas, P.C. (1998). Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 10), 1351–1361.

MacLennan, N.K., James, S.J., Melnyk, S., Pirooz, A., Jernigan, S., Hsu, J.L., Janke, S.M., Pham, T.D., and Lane, R.H. (2004). Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol. Genomics* 18, 43–50.

Marco, A., Macpherson, J.I., Ronshaugen, M., and Griffiths-Jones, S. (2012). MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. *Silence* 3, 8.

Marsit, C.J., Eddy, K., and Kelsey, K.T. (2006). MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res.* 66, 10843–10848.

Marzban, H., Del Bigio, M.R., Alizadeh, J., Ghavami, S., Zachariah, R.M., and Rastegar, M. (2014). Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 450.

Mason, J.B., and Tang, S.Y. (2017). Folate status and colorectal cancer risk: A 2016 update. *Mol. Aspects Med.* 53, 73–79.

Mattson, M.P., and Shea, T.B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 26, 137–146.

McCully, K.S. (2009). Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 39, 219–232.

McMahon, A.P., and Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073–1085.

Melse-Boonstra, A., Holm, P.I., Ueland, P.M., Olthof, M., Clarke, R., and Verhoef, P. (2005). Betaine concentration as a determinant of fasting total homocysteine concentrations and the effect of folic acid supplementation on betaine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 1378–1382.

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560.

Ming, G., and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250.

Molasy, M., Walczak, A., Szaflik, J., Szaflik, J.P., and Majsterek, I. (2017). MicroRNAs in glaucoma and neurodegenerative diseases. *J. Hum. Genet.* 62, 105–112.

Moore, L.D., Le, T., and Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 38, 23–38.

Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8905–8909.

Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 407–422.

Nowak, J.S., and Michlewski, G. (2013). miRNAs in development and pathogenesis of the nervous system. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 815–820.

Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* 18, 523–527.

Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801.

Obeid, R. (2013). The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients* 5, 3481–3495.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Olde Loohuis, N.F.M., Kos, A., Martens, G.J.M., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., and Aschrafi, A. (2012). MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 89–102.

Oliva, C.A., Vargas, J.Y., and Inestrosa, N.C. (2013). Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 224.

Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., and Werge, T. (2009). MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PloS One* 4, e7225.

Orozco-Solís, R., Matos, R.J.B., Guzmán-Quevedo, O., Lopes de Souza, S., Bihouée, A., Houlgatte, R., Manhães de Castro, R., and Bolaños-Jiménez, F. (2010). Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. *PloS One* 5, e13537.

Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635–646.

Pellanda, H., Forges, T., Bressenot, A., Chango, A., Bronowicki, J.-P., Guéant, J.-L., and Namour, F. (2012). Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in fetuses. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 976–985.

Peschansky, V.J., and Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* 9, 3–12.

Peterson, C.L., and Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol. CB* 14, R546-551.

Pierson, J., Hostager, B., Fan, R., and Vibhakar, R. (2008). Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma. *J. Neurooncol.* 90, 1–7.

Piyathilake, C.J., Macaluso, M., Celedonio, J.E., Badiga, S., Bell, W.C., and Grizzle, W.E. (2010). Mandatory fortification with folic acid in the United States appears to have adverse effects on histone methylation in women with pre-cancer but not in women free of pre-cancer. *Int. J. Womens Health* 1, 131–137.

Pogribny, I.P., Ross, S.A., Tryndyak, V.P., Pogribna, M., Poirier, L.A., and Karpinets, T.V. (2006). Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. *Carcinogenesis* 27, 1180–1186.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Muskhelishvili, L., Rusyn, I., and Ross, S.A. (2007). Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J. Nutr.* 137, 216S–222S.

Pogribny, I.P., Karpf, A.R., James, S.R., Melnyk, S., Han, T., and Tryndyak, V.P. (2008). Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet. *Brain Res.* 1237, 25–34.

Pourié, G., Martin, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Akchiche, N., Guéant-Rodriguez, R.M., Geoffroy, A., Jeannesson, E., El Hajj Chehadeh, S., Mimoun, K., Brachet, P., et al. (2015). Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 3713–3725.

Quadros, E.V. (2010). Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br. J. Haematol.* 148, 195–204.

Ramaekers, V.T., Sequeira, J.M., and Quadros, E.V. (2016). The basis for folinic acid treatment in neuro-psychiatric disorders. *Biochimie* 126, 79–90.

Ramakrishnan, A.-B., and Cadigan, K.M. (2017). Wnt target genes and where to find them. *F1000Research* 6.

Ranade, S.C., Sarfaraz Nawaz, M., Kumar Rambtla, P., Rose, A.J., Gressens, P., and Mani, S. (2012). Early protein malnutrition disrupts cerebellar development and impairs motor coordination. *Br. J. Nutr.* 107, 1167–1175.

Rando, O.J., and Simmons, R.A. (2015). I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell* 161, 93–105.

Raux, E., Schubert, H.L., and Warren, M.J. (2000). Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 57, 1880–1893.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.

Riikonen, R. (2017). Insulin-Like Growth Factors in the Pathogenesis of Neurological Diseases in Children. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Roussel, M.F., and Hatten, M.E. (2011). Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr. Top. Dev. Biol.* 94, 235–282.

Sable, P., Kale, A., Joshi, A., and Joshi, S. (2014). Maternal micronutrient imbalance alters gene expression of BDNF, NGF, TrkB and CREB in the offspring brain at an adult age. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 34, 24–32.

Sakai, C., Tomitsuka, E., Miyagishi, M., Harada, S., and Kita, K. (2013). Type II Fp of human mitochondrial respiratory complex II and its role in adaptation to hypoxia and nutrition-deprived conditions. *Mitochondrion* 13, 602–609.

Salinas, P.C., and Zou, Y. (2008). Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 339–358.

Salinas, P.C., Fletcher, C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nusse, R. (1994). Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Dev. Camb. Engl.* *120*, 1277–1286.

Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. (2004). *Sall1*, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *319*, 103–113.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1412–1417.

Schmahmann, J.D., Weilburg, J.B., and Sherman, J.C. (2007). The neuropsychiatry of the cerebellum - insights from the clinic. *Cerebellum Lond. Engl.* *6*, 254–267.

Schonrock, N., Harvey, R.P., and Mattick, J.S. (2012). Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology. *Circ. Res.* *111*, 1349–1362.

Sherbet, G.V. (1974). Epigenetic mechanisms and paraneoplastic phenomena. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *230*, 516–532.

Sherwood, V. (2015). WNT signaling: an emerging mediator of cancer cell metabolism? *Mol. Cell. Biol.* *35*, 2–10.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941–953.

Shiomi, K., Uchida, H., Keino-Masu, K., and Masu, M. (2003). *Ccd1*, a novel protein with a DIX domain, is a positive regulator in the Wnt signaling during zebrafish neural patterning. *Curr. Biol. CB* *13*, 73–77.

Shookhoff, J.M., and Gallicano, G.I. (2010). A new perspective on neural tube defects: folic acid and microRNA misexpression. *Genes. N. Y. N* *2000* *48*, 282–294.

Sillitoe, R.V., and Joyner, A.L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 549–577.

Simons, K., and Fuller, S.D. (1985). Cell surface polarity in epithelia. *Annu. Rev. Cell Biol.* *1*, 243–288.

Smalley, M.J., Sara, E., Paterson, H., Naylor, S., Cook, D., Jayatilake, H., Fryer, L.G., Hutchinson, L., Fry, M.J., and Dale, T.C. (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J.* *18*, 2823–2835.

Smith, A.D., and Refsum, H. (2016). Homocysteine, B Vitamins, and Cognitive Impairment. *Annu. Rev. Nutr.* 36, 211–239.

Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1026–1032.

Stone, N., Pangilinan, F., Molloy, A.M., Shane, B., Scott, J.M., Ueland, P.M., Mills, J.L., Kirke, P.N., Sethupathy, P., and Brody, L.C. (2011). Bioinformatic and genetic association analysis of microRNA target sites in one-carbon metabolism genes. *PloS One* 6, e21851.

Strata, P. (2015). The emotional cerebellum. *Cerebellum Lond. Engl.* 14, 570–577.

van Straten, E.M.E., Bloks, V.W., van Dijk, T.H., Baller, J.F.W., Huijkman, N.C.A., Kuipers, I., Verkade, H.J., and Plösch, T. (2012). Sex-dependent programming of glucose and fatty acid metabolism in mouse offspring by maternal protein restriction. *Gend. Med.* 9, 166–179.e13.

Sunden, S.L., Renduchintala, M.S., Park, E.I., Miklasz, S.D., and Garrow, T.A. (1997). Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 345, 171–174.

Swanson, D.A., Liu, M.-L., Baker, P.J., Garrett, L., Stitzel, M., Wu, J., Harris, M., Banerjee, R., Shane, B., and Brody, L.C. (2001). Targeted Disruption of the Methionine Synthase Gene in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1058–1065.

Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., and Mattick, J.S. (2010). Non-coding RNAs: regulators of disease. *J. Pathol.* 220, 126–139.

Tai, D., Wells, K., Arcaroli, J., Vanderbilt, C., Aisner, D.L., Messersmith, W.A., and Lieu, C.H. (2015). Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *The Oncologist* 20, 1189–1198.

Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev. Cell* 11, 791–801.

Takai, D., and Jones, P.A. (2004). Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol. Biol. Evol.* 21, 463–467.

Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X., and Selker, E.U. (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* 34, 75–79.

Tan, L., Yu, J.-T., Hu, N., and Tan, L. (2013). Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 47, 382–393.

Tryndyak, V.P., Latendresse, J.R., Montgomery, B., Ross, S.A., Beland, F.A., Rusyn, I., and Pogribny, I.P. (2012). Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 52–59.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., and Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 355–367.

Tserga, A., Binder, A.M., and Michels, K.B. (2017). Impact of folic acid intake during pregnancy on genomic imprinting of IGF2/H19 and 1-carbon metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*

Tsutsui, K. (2006). Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the developing Purkinje cell. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102, 187–194.

Tsutsui, K., Ukena, K., Sakamoto, H., Okuyama, S.-I., and Haraguchi, S. (2011). Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the purkinje cell. *Front. Endocrinol.* 2, 61.

van Uiter, E.M., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2013). Influence of maternal folate status on human fetal growth parameters. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 582–595.

Uziel, T., Karginov, F.V., Xie, S., Parker, J.S., Wang, Y.-D., Gajjar, A., He, L., Ellison, D., Gilbertson, R.J., Hannon, G., et al. (2009). The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2812–2817.

Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev. Cell* 5, 367–377.

Vidal, D.O., Marques, M.M.C., Lopes, L.F., and Reis, R.M. (2013). The role of microRNAs in medulloblastoma. *Pediatr. Hematol. Oncol.* 30, 367–378.

Visentin, M., Diop-Bove, N., Zhao, R., and Goldman, I.D. (2014). The intestinal absorption of folates. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 251–274.

van Vliet, E., Eixarch, E., Illa, M., Arbat-Plana, A., González-Tendero, A., Hogberg, H.T., Zhao, L., Hartung, T., and Gratacos, E. (2013). Metabolomics reveals metabolic alterations by intrauterine growth restriction in the fetal rabbit brain. *PloS One* 8, e64545.

Wadiche, J.I., and Jahr, C.E. (2001). Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* 32, 301–313.

Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., and Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 457–466.

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C., and Jürgens, G. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* 193, 296–307.

Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007864.

Wolf, S.S. (2009). The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2109–2121.

Wyatt, G.R. (1950). Occurrence of 5-Methyl-Cytosine in Nucleic Acids. *Nature* 166, 237–238.

Xiao, B., Jing, C., Wilson, J.R., Walker, P.A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I.A., Blackburn, G.M., and Gamblin, S.J. (2003). Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. *Nature* 421, 652–656.

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.W., Okumura, K., and Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 236, 87–95.

Xu, W., and Kimelman, D. (2007). Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J. Cell Sci.* 120, 3337–3344.

Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* 26, 5310–5318.

Yokochi, T., and Robertson, K.D. (2002). Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J. Biol. Chem.* 277, 11735–11745.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA N. Y. N* 9, 112–123.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.

Zhang, Z., Hou, C., Meng, F., Zhao, X., Zhang, Z., Huang, G., Chen, W., Fu, M., and Liao, W. (2015). MiR-455-3p regulates early chondrogenic differentiation via inhibiting Runx2. *FEBS Lett.* 589, 3671–3678.

Zwain, I.H., and Yen, S.S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140, 3843–3852.

Liste des publications et des communications

Publications :

El Hajj Chehadeh, S., Dreumont, N., **Willekens, J.**, Canabady-Rochelle, L., Jeannesson, E., Alberto, J.-M., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., and Leininger-Muller, B. (2014).

Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307(11)**, E1009-1019.

Communications :

1- Cerebellar Wnt-signaling pathway alterations in a methyl donor deficiency rat model.

J. Willekens, S. Hergalant, JM. Alberto, F. Marin, C. Nemos, JL. Guéant, B. Leininger-Muller and N. Dreumont - **Poster, One Carbon Metabolism and Homocysteine, 2017**

2- miR-344, a candidate miRNA to explain wnt-pathway dysregulation in the cerebellum in response to methyl donor deficiency.

J. Willekens, T. Kaoma, F. Bernardin, L. Valla, JL. Daval, JL. Guéant, N. Dreumont and B. Leininger-Muller - **Poster, SifrARN, 2016**

3- Effets délétères et sexe-dépendants d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur la neurostéroïdogénèse dans le cervelet des rats nouveau-nés.

Willekens J., El Hajj Chehadeh S., Dreumibt N., Pourié G., Daval JL., Guéant JL., Leininger-Muller B - **Poster, SFE Angers, 2015**

4- Les déficiences en donneurs de méthyles affectent la neurogenèse et les régulations épigénétiques dans le cervelet des rats femelles.

J. Willekens, F. Marin, S. Hergalant, R. Houlgatte, J.L. Daval, J.L. Guéant, N. Dreumont et B. Leininger-Muller - **Poster, Journée ED BioSE, 2015**

5- Methyl-donor deficiency affects neurogenesis and epigenetic regulations in the cerebellum of female rats.

J. Willekens, N. Dreumont, T. Kaoma, F. Marin, S. Hergalant, R. Houlgatte, L. Vallar, C. Nemos, JL. Guéant, JL. Daval, B. Leininger-Muller- **Poster, One Carbon Metabolism and Homocysteine, 2014**

Annexes

Annexe 1 : Code histone

Les histones sont des protéines impliquées dans l’empaquetage de l’ADN. Leur domaine N-terminal est sujet à de nombreuses modifications possédant un effet activateur ou inhibiteur de la transcription en entraînant des changements dans la structure de la chromatine. On parle de code histone. L’ensemble de ces modifications n’est pas compris, mais les plus décrites ont été présentées dans cette annexe.

Acétylations :

Histone	Site	Enzyme responsable de la modification	Fonction proposée
H₂A	K ₄	Esa1	Activation de la transcription
	K ₅	Tip60 ; CBP/P300	Activation de la transcription
	K ₇	Hat1	Inconnue
		Esa1	Activation de la transcription
H₂B	K ₅	P300 ; ATF2	Activation de la transcription
	K ₁₁	Gcn5	Activation de la transcription
	K ₁₂	CBP/P300 ; ATF2	Activation de la transcription
	K ₁₅	CBP/P300 ; ATF2	Activation de la transcription
	K ₁₆	Gcn5, Esa1	Activation de la transcription
	K ₂₀	P300 ; ATF2	Activation de la transcription
H₃	K ₄	Esa1	Activation de la transcription
		Hpa2	Inconnue
	K ₉	Inconnue	Déposition d'histone
		Gcn5, SRC-1	Activation de la transcription
	K ₁₄	Inconnue	Déposition d'histone
		Gcn5, PCAF	Activation de la transcription
		Esa1 ; Tip60	Activation de la transcription
		SRP-1	Réparation de l'ADN
		Elp3	Activation de la transcription
		Hpa2	Activation de la transcription (élongation)
		Inconnue	Inconnue
		hTFIIIC90	Transcription par l'ARN polymérase III
		TAF1	Transcription par l'ARN polymérase III
		Sas2	Euchromatine
		Sas3	Activation de la transcription (élongation)
		P300	Activation de la transcription
	K ₁₈	Gcn5	Activation de la transcription
		CBP/P300	Activation de la transcription Réparation de l'ADN

	K ₂₃	Inconnue Gcn5 Sas3 CBP/P300	Déposition d'histone Activation de la transcription Réparation de l'ADN Activation de la transcription (élongation) Activation de la transcription
	K ₂₇	Gcn5	Activation de la transcription
	K ₃₇	Gcn5	Activation de la transcription
	K ₅₆	Spt10	Activation de la transcription Réparation de l'ADN
H₄	K ₅	Hat1	Déposition d'histone
		Esa1 ; Tip60	Activation de la transcription
		ATF2	Réparation de l'ADN
		Hpa2	Activation de la transcription
		P300	Inconnue
	K ₈	Gcn5 ; PCAF	Activation de la transcription
		Esa1 ; Tip60	Activation de la transcription
		ATF2	Réparation de l'ADN
		Elp3	Activation de la transcription
		P300	Activation de la transcription (élongation)
		P300	Activation de la transcription
	K ₁₂	Hat1	Déposition d'histone
		Esa1 ; Tip60	Silencing telomérique
		Hpa2	Activation de la transcription
		P300	Réparation de l'ADN
		P300	Inconnue
	K ₁₆	Gcn15	Activation de la transcription
		MOF	Activation de la transcription
		Esa1 ; Tip60	Activation de la transcription
		ATF2	Réparation de l'ADN
		Sas2	Activation de la transcription
	K ₉₁	Hat1/Hat2	Euchromatine Assemblage de la chromatine

K : Lysine

Méthylations :

Histone	Site	Enzyme responsable de la modification	Fonction proposée
H ₁	K ₂₆	Ezh2	Silencing de la transcription
H _{2A}	R ₃	PRMT1/6 ; PRMT5/7	Activation de la transcription Repression de la transcription
H ₃	R ₂	PRMT5 ; PRMT6	Repression de la transcription
	R ₈	PRMT5 ; PRMT2/6	Activation de la transcription Repression de la transcription
	R ₁₇	CARM1	Activation de la transcription
	R ₂₆	CARM1	Activation de la transcription
	R ₄₂	CARM1	Activation de la transcription
	K ₄	Set1	Euchromatine permissive (diméthylation)
		Set7/9	Activation de la transcription (triméthylation)
		MLL ; ALL-1	Activation de la transcription
		Ash1	Activation de la transcription
	K ₉	Suv39h, Clr4	Silencing de la transcription (triméthylation)
		G9a	Répression transcriptionnel des régions soumises à empreinte
		SETDB1	Répression de la transcription (triméthylation)
		Ash1	Activation de la transcription
	K ₂₇	Ezh2	Silencing de la transcription
		G9a	Inactivation du X (triméthylation) Silencing de la transcription
	K ₃₆	Set2	Activation de la transcription (élongation)
	K ₇₉	Dot1	Euchromatine Activation de la transcription (élongation)
H ₄	R ₃	PRMT1/6	Activation de la transcription
		PRMT5/7	Répression de la transcription
	K ₂₀	PR-Set7 Suv4-20h Ash1	Silencing de la transcription (monométhylation) Hétérochromatine (triméthylation) Activation de la transcription

	K ₅₉	Inconnue	Silencing de la transcription
--	-----------------	----------	-------------------------------

K : Lysine

R : Thréonine

Phosphorylations :

Histone	Site	Enzyme responsable de la modification	Fonction proposée
H ₁	S ₂₇	Inconnue	Activation de la transcription Décondensation de la chromatine
H _{2A}	S ₁	Inconnue MSK1	Assemblage de la chromatine Répression de la transcription
	S ₁₂₂	Inconnue	Réparation de l'ADN
	S ₁₂₉	Mec1 ; Tel1	Réparation de l'ADN
	S ₁₃₉	ATR ; ATM ; DNA-PK	Réparation de l'ADN
	T ₁₂₀	Bub1 ; VprBP	Répression de la transcription Apoptose
	T ₁₄₂	WSTF	Réparation de l'ADN
H _{2B}	S ₁₀	Ste20	Apoptose
	S ₁₄	Mst1 Inconnue	Apoptose Réparation de l'ADN
	S ₃₃	TAF1	Activation de la transcription
	S ₃₆	AMPK	Activation de la transcription
H ₃	S ₁₀	MSK1 ; MSK2 IKK- α Snf1	Activation immédiate précoce de la transcription Activation de la transcription Activation de la transcription
	S ₂₈	MSK1 ; MSK2	Activation immédiate précoce de la transcription
	Y ₆	PKC β 1	Inconnue
	Y ₄₁	JAK2	Activation de la transcription
	Y ₄₅	PKC δ	Apoptose

S : Sérine

T : Thréonine

Y : Tyrosine

Ubiquitynylations :

Histone	Site	Enzyme responsable de la modification	Fonction proposée
H ₂ A	K ₁₁₉	Ring2	Spermatogenèse
H ₂ B	K ₁₂₃	Rad6	Activation de la transcription Euchromatine

K : Lysine

Sumoylations :

Histone	Site	Enzyme responsable de la modification	Fonction proposée
H ₂ A	K ₁₂₆	Ubc9	Répression de la transcription
H ₂ B	K ₆	Ubc9	Répression de la transcription
	K ₇	Ubc9	Répression de la transcription
H ₄	<i>Histon tail</i>	Ubc9	Répression de la transcription

K : Lysine

Biotinylations :

Histone	Site	Enzyme responsable de la modification	Fonction proposée
H ₂ A	K ₉	Biotinidase	Inconnue
	K ₁₃	Biotinidase	Inconnue
H ₃	K ₄	Biotinidase	Expression génique
	K ₉	Biotinidase	Expression génique
	K ₁₈	Biotinidase	Expression génique
H ₄	K ₁₂	Biotinidase	Réponse aux dommages de l'ADN

K : Lysine

Annexe 2 : Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups

La publication présentée dans cette annexe et dans laquelle je suis cité en deuxième auteur constitue la base de mon projet de thèse. Elle a permis de mettre en évidence des défauts de NSG dans le cervelet des femelles MDD, ainsi que des altérations de la voie de signalisation dépendante de la PKC. Les résultats appuient les différences qui existent entre mâles et femelles, et permettent de faire le lien avec les données précédentes faisant état de défauts locomoteurs en réponse à la carence. A la suite de cette étude, nous avons décidé continuer notre étude sur cervelet en réalisant le transcriptome de cette structure uniquement chez les femelles, car plus affectées que les mâles. Le but initial était de mettre en évidence les défauts de NSG *via* l'analyse des résultats.

Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups

Sarah El Hajj Chehadeh,* Natacha Dreumont,* Jérôme Willekens, Laetitia Canabady-Rochelle, Elise Jeannesson, Jean-Marc Alberto, Jean-Luc Daval,# Jean-Louis Guéant,# and Brigitte Leininger-Muller

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U-954, Nutrition-Génétique et Exposition Aux Risques Environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre les Nancy, France

Submitted 31 July 2014; accepted in final form 29 September 2014

El Hajj Chehadeh S, Dreumont N, Willekens J, Canabady-Rochelle L, Jeannesson E, Alberto J, Daval J, Guéant J, Leininger-Muller B. Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307: E1009–E1019, 2014. First published October 7, 2014; doi:10.1152/ajpendo.00364.2014.—Early deficiency of the methyl donors folate and vitamin B12 produces hyperhomocysteinemia and cognitive and motor disorders in 21-day-old rat pups from dams fed a diet deficient in methyl donors during gestation and lactation. These disorders are associated with impaired neurogenesis and altered synaptic plasticity in cerebellum. We aimed to investigate whether these disorders could be related to impaired expression of neurosteroidogenesis-associated proteins, key regulator receptors, and some steroid content in the cerebellum. The methyl donor deficiency produced a decreased concentration of folate and vitamin B12, along with accumulation of homocysteine in Purkinje cells in both sexes, whereas the *S*-adenosylmethionine/*S*-adenosylhomocysteine ratio was reduced only in females. The transcription level and protein expression of StAR, aromatase, ER α , ER β , and LH receptors were decreased only in females, with a marked effect in Purkinje cells, as shown by immunohistochemistry. Consistently, reduced levels of estradiol and pregnenolone were measured in cerebellar extracts of females only. The decreased expression levels of the transcriptional factors CREB, phospho-CREB, and SF-1, the lesser increase of cAMP concentration, and the lower level of phospho-PKC in the cerebellum of deficient females suggest that the activation of neurosteroidogenesis via cAMP-mediated signaling pathways associated with LHR activation would be altered. In conclusion, a gestational methyl donor deficiency impairs neurosteroidogenesis in cerebellum in a sex-dependent manner.

early methyl donor deficiency; neurosteroids; cerebellum development; cyclic AMP signaling cascade

DEFICIENCY OF METHYL DONORS (folate and vitamin B12) involved in the one-carbon metabolism and the consecutive accumulation of the neurotoxic amino acid homocysteine (HCY) have been associated with various neurological diseases (33). A loss of cerebellar granule cells along with HCY accumulation was reported in a transgenic model of mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase, a key enzyme of the one-carbon metabolism. This observation is of particular interest since the accumulation of HCY in the brain appeared to be

heterogeneous, with the cerebellum displaying a higher amount than other cerebral regions (6).

In a validated animal model based on rats born to dams fed a diet deficient in methyl donors during the gestational and lactating periods (2–5), the 21-day-old progeny showed a marked accumulation of HCY, along with increased apoptosis in selective brain structures, notably the cerebellum (5). At the time of weaning, animals exhibited cognitive and motor defects, and it has been reported that methyl donor privation during early life is associated with alteration of synaptic plasticity and impaired neurogenesis (9), processes that are closely related to an increased neurosteroidogenesis during postnatal age in the cerebellum (36). Evidence that neurosteroids play a critical role during fetal, postnatal, and adolescent development has been provided (16). The cerebellum contains the whole enzymatic machinery allowing neurosteroid synthesis, with Purkinje cells being a major site for neurosteroid formation (36). The first rate-limiting step implies the recruitment of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein, which transfers cholesterol into the mitochondrial inner membrane, thus allowing its further conversion into pregnenolone via the cholesterol side chain cleavage enzyme (CYP11A1) activity (19, 35). StAR is regulated during cerebellar development, and the highest mRNA levels are detected at early postnatal age (21). The final step of neurosteroidogenesis occurs via the key enzyme aromatase (CYP19A1), which converts testosterone into estradiol. Aromatase expression in the Purkinje cells confers to this enzyme a role during the cerebellum postnatal development (1, 36). Estradiol synthesized *de novo* in the cerebellum acts locally on Purkinje cell dendritic growth and synapse formation. These effects are mediated through the ER α and ER β estrogen receptors, which play distinct roles throughout the development of the cerebellum (13). ER β receptors are required for controlling the maturation of Purkinje cells, where they are present around 3 wk after birth in the rat. In contrast to ER β , which remains detectable during adulthood, ER α is expressed specifically during development and participates in Purkinje cell differentiation, dendritic growth, and synapse formation (17).

The expression level of the *StAR* gene is induced by the binding of the luteinizing hormone (LH) to the LH receptor (LHR), and its presence has been shown in the cerebellum (26, 27). The binding of LH allows the transcriptional regulation of the *StAR* gene via a G protein/adenylate cyclase pathway with cAMP formation, which in turn activates protein kinase A (PKA). This results in the phosphorylation of various transcription factors that bind to the *StAR* gene promoter region (28), notably the cAMP response element (CRE)-binding protein

* S. El Hajj Chehadeh and N. Dreumont contributed equally to this article.
J. -L. Daval and J. -L. Guéant contributed equally to this article and are both senior authors of this article.

Address for reprint requests and other correspondence: B. Leininger-Muller, Inserm U-954, Nutrition-Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France (e-mail: Brigitte.Leininger@univ-lorraine.fr).

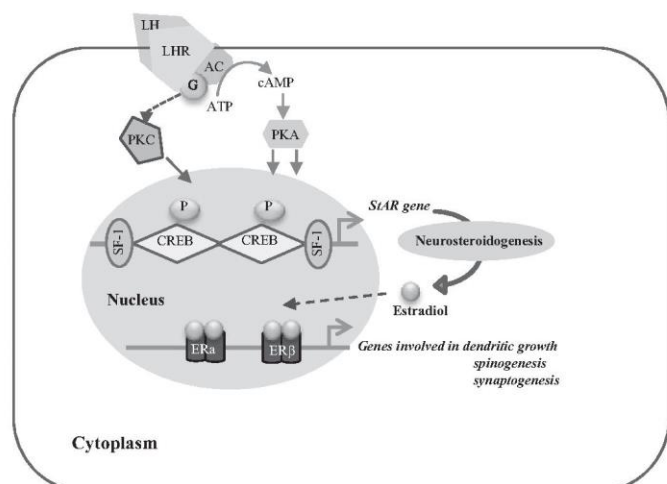


Fig. 1. Schematic representation of the signaling cascade regulating steroidogenic acute regulatory (StAR) gene transcription. The binding of the luteinizing hormone (LH) to its receptor allows the transcriptional regulation of the *StAR* gene via a G protein/adenylate cyclase pathway with cAMP formation, which in turn activates protein kinase A (PKA). This results in the phosphorylation of the transcription factors binding to the *StAR* gene promoter region. The protein kinase C (PKC) also participates in the regulation of *StAR*. LHR, luteinizing hormone receptor; CREB, cAMP response element-binding protein; SF-1, steroidogenic factor-1; ER α and - β , estrogen receptor- α and - β , respectively. Adapted with permission from Manna et al. (28).

(CREB) and the steroidogenic factor-1 (SF-1; NR5A1) (Fig. 1). The protein kinase C (PKC) also participates to the regulation of *StAR* by reinforcing its cAMP-mediated expression (30), which has been reported in neural cells (19, 23).

The orphan nuclear receptor SF-1 is widely distributed in the steroidogenic tissues and plays a central role in steroid synthesis regulation through binding to its response element, which is present in the promoter regions of the genes encoding for *StAR* and LHR as well as cytochrome P450 (CYP) enzymes (31). SF-1 is itself under the regulation of various factors at the transcriptional level, including the cAMP pathway (25).

To our knowledge, nothing is known about perinatal alterations of the one-carbon metabolism on local steroid synthesis in the cerebellum despite their determinant role during cerebellar development. Therefore, we investigated the expression levels of aromatase, *StAR*, LHR, and ER α and ER β receptors as well as the nuclear factor SF-1 in the cerebellum of 21-day-old rats born to dams subjected to a methyl donor-deficient diet (3, 5). In addition, the protein levels of the key regulators of *SF-1* and *StAR* gene transcriptional activity, i.e., PKA, PKC, CREB, and p-CREB, were monitored. The cAMP, pregnenolone, and estradiol concentrations were also measured.

METHODS

Animals. Animal experiments were performed on Wistar rats (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) and conducted in accordance with the internal guidelines (Lorraine-University Ethic Comity) for animal care and housing, and they met all applicable standards for the ethics of experimentation and research integrity. Adult female rats were maintained under standard laboratory conditions on a 12:12-h light-dark cycle, with food and water available ad libitum. One month before pregnancy, they were fed either with standard food ($n = 4$, maintenance diet M20; Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or with a lowered

choline diet lacking methyl donors, as described previously ($n = 4$; Special Diet Service, Saint-Gratien, France) (12). The assigned diet was maintained until weaning of the offspring on postnatal day 21.

Tissue collection. Rat pups were euthanized at postnatal day 21 by an excess of isoflurane. Intracardiac blood samples were drawn for the measurement of HCY plasma concentrations. The cerebellum was rapidly harvested. For immunohistochemical analyses, one-half of the cerebellum was immediately frozen in methylbutane previously chilled to -30°C and stored at -80°C . The other half was rapidly dissected before freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C until biochemical analyses. Gonads, lungs, and hypothalamus were also collected as positive and negative controls for protein expression.

Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry analysis of neurosteroids. Lipids of cerebellar tissues were extracted according to the method of Folch et al. (14). Briefly, samples were added with internal standards and homogenized in chloroform-methanol solution (2:1 vol/vol) using a tissue lyser (Qiagen). After 30-min incubation at ambient temperature under ultrasonication, the former mix was added to a water-methanol solution (1:1, vol/vol) and centrifuged at 760 g for 1 min. The organic phases were added to methanol-water-chloroform solution (48:47:3, vol/vol/vol) and dried under a nitrogen stream after ultrasonication. The extracts were dissolved in a 1-ml methanol-acetic acid solution (99:1, vol/vol), with 1 ml of water added, and passed through Strata-X cartridges (60 mg adsorbent; Phenomenex, Torrance, CA) conditioned prior to use. The purified steroids were evaporated under nitrogen atmosphere, and the dried extracts were dissolved in methanol-formate solution (60:40) (Sigma-Aldrich) and stirred for 15 min (PST Thermoshaker, Biosan, France).

Pregnenolone and estradiol were quantified by a single, fast liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry procedure with a run time of 12 min according to Higashi et al. (18). Briefly, 10 μl of the sample was injected in the Acquity UPLC HSST3 column (1.8 μm , 2.1×100 mm; Waters, St. Quentin en Yvelines, France). D3-testosterone was used as an internal standard (Accros Organics, Geel, Belgium). The analysis of the steroids was performed using a triple-quadrupole mass spectrometer 4000 QTRAP (ABSciex, Courtaboeuf, France) equipped with an APCI ionization source used in positive. Quantification was made using calibration curves with correction against internal standard peak area.

Preparation of mitochondrial and microsomal fractions. The tissue samples were homogenized (1 g tissue/3-ml buffer) in the isolation medium (0.32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, and 1 mM EDTA, pH 7.4)

Table 1. List of antibodies used in the study

Target	Source	Dilution for Western Blot Analyses
HCY	Millipore	NA
StAR protein	D. Stocco, Texas Tech University	1:1,000
Aromatase	Biovision Research Products	1:1,000
SF-1	Abcam	1:250
Estradiol	US Biological	NA
ER α	Santa Cruz Biotechnology	1:200
ER β	Abcam	1:1,000
LHR	Santa Cruz Biotechnology	1:100
PKA	Cell Signaling Technology	1:700
PKC α	Abcam	1:700
p-PKC α	Abcam	1:700
CREB	Cell Signaling Technology	1:1,000
p-CREB	Cell Signaling Technology	1:1,000

HCY, homocysteine; StAR, steroidogenic acute regulatory; SF-1, steroidogenic factor-1; ER α and - β ; LHR, luteinizing hormone receptor; CREB, cAMP response element-binding protein; p-PKC α and p-CREB, phosphorylated PKC α and CREB, respectively; NA, not applicable. The above antibodies were used to detect the proteins of interest in the cerebellum extracts and were used at the indicated concentrations. Some of them were also used at a 1:200 dilution to perform immunostaining on brain sections.

Table 2. Sequences of primers used for quantitative PCR

Target	Forward Primer	Reverse Primer
StAR	AGGAAAGCCAGCAGGAGAAT	CTGTCCATGGGCTGGTCTA
Aromatase	TTGATTTTCGCTGAGAGACG	ACAGAGTGACGGACATGGTG
SF-1	GTCCAGAACAACAAGCATTACAC	ATCAGCAGCGACAGCTTC
Polymerase II	GCATTAACATCAGGAACAATAAAGGC	GATCTCTCTAAAGTTGACCTCATTGG

Sequences are given in the 5' to 3' orientation.

and first centrifuged at 2,000 *g* for 3 min at 4°C (TLX ultracentrifuge Optima, Beckman, France). The supernatant was then centrifuged at 12,500 *g* for 10 min at 4°C, resulting in a new supernatant retained for the isolation of microsomes. The pellet was resuspended in the isolation medium and centrifuged at 11,000 *g* for 10 min. The mitochondrial fraction was pelleted by additional centrifugation at 10,000 *g* for 10 min and suspended in RIPA buffer [136 mM NaCl, 1.7 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 1% Tergitol (vol/vol), 0.5% deoxycholate (wt/vol), 0.1% sodium dodecyl sulphate (wt/vol), 100 mM Na₃VO₄, 57 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and 0.14% protease inhibitor] so that the mitochondrial fraction extracted from 0.1 g of tissue was suspended in 0.5 ml of RIPA buffer.

For the microsomal fractions, the previously collected supernatant was centrifuged at 15,000 *g* for 20 min at 4°C. The pellet was discarded, and the supernatant was centrifuged once more at 105,000 *g* for 90 min at 4°C. The microsomal pellet was resuspended in the storage buffer [80 mM K₂HPO₄, 19 mM KH₂PO₄, 0.2 mM EDTA, and 20% glycerol (vol/vol), pH 7.4] so that 1 ml of suspension contained the microsomal fraction extracted from 3 g of tissue.

The protein concentration in subcellular fractions was assessed by a bicinchoninic acid (BCA) protein determination kit (Interchim), using BSA as a standard.

Measurement of plasma homocysteine and cerebellar vitamin B12, folate, S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and cAMP concentration. Plasma concentrations of HCY were measured as described previously (5). Vitamin B12 and folate concentrations were measured by radiodilution isotope assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals, Versailles, France) (7). The S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH) concentrations were measured in cerebellar tissue homogenates using high-performance liquid chromatography adapted from Delabar et al. (11). Proteins were precipitated with 0.2 N HClO₄ before injection on the column (Lichrospher, 100 RP-C18, 5 μ m, 250 $\times$ 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 min), was applied at a 0.75 ml/min flow rate. Amounts of SAM and SAH were quantified using a UV detector set at 254 nm.

Twenty milligrams of cerebellar extracts was homogenized in 200 μ l of 0.1 M HCl solution, and cAMP level was measured using the direct cAMP ELISA kit (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France), following the manufacturer's recommendations.

Immunohistochemistry. Immunohistochemical analyses were performed on cryostat-generated, 20- μ m sagittal brain sections mounted onto glass slides. For immunostaining, tissue sections previously fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 min at room temperature were permeabilized for 10 min in PBS-0.1% Triton. After three washes in PBS of 5 min each, nonspecific binding was blocked by incubation in PBS-BSA 10% (wt/vol) for 1 h. Tissue sections were further incubated for 72 h at 4°C with the different primary antibodies (given in Table 1) used at a 1:200 dilution. Brain slices were then incubated for 1 h at room temperature in the presence of the secondary antibody conjugated to Alexa Fluor (1:2,000; Molecular Probes, Cergy Pontoise, France).

The cell nuclei were stained by the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 5 μ g/ml in distilled water). Slices were then washed three times in PBS, coverslipped using mounting medium Fluoromount (Sigma, St. Louis, MO), and kept in the dark until fluorescence analysis. The sections were observed using a fluorescence microscope (Olympus, Rungis, France) at $\times$ 20 magnification. The pictures were digitized with a monochromatic camera and analyzed using Cell F (Olympus, Rungis, France). Specific labeling was absent in the control sections incubated without the primary antibodies.

Western immunoblot analyses. The dissected cerebral regions were solubilized in RIPA lysis buffer, lysed by three cycles of freezing/thawing, and finally centrifuged at 4°C for 30 min at 15,000 *g*. The supernatant protein concentration was determined using the BCA protein assay kit. Samples were mixed with an equal volume of 2 $\times$ Laemmli buffer and denatured by heating the mixture for 5 min at 100°C.

Thirty micrograms of cerebellar mitochondrial fractions (for StAR detection) or microsomal fractions (for aromatase detection) and 30–50 μ g of total proteins were separated on SDS-PAGE (10–12%; Bio-Rad Mini Protean 3) (24) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-PS2; Millipore, Bedford, MA) in Tris-glycine transfer buffer with 20% ethanol in a miniblitter (Bio-Rad). After being blocked in 5% nonfat dry milk in Tris phosphate-buffered saline solution (200 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.4)-0.1% Tween 20 for 1 h under shaking, membranes were incubated with various primary antibodies at 4°C overnight (given in Table 1). Secondary peroxidase-labeled antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology and used at a 1:2,000 dilution. Immunoreactivity was detected with a chemiluminescence kit (ECL Plus, Amersham BioSciences, Piscataway, NJ) and a chemiluminescence detector (Fu-

Table 3. Circulating HCY and cerebellar concentration of folate, vitamin B12, SAM, and SAH measured in 21-day-old rats from controls and dams fed the methyl donor-deficient diet during pregnancy and lactation periods

	Females		Male	
	Normal diet	Deficient diet	Normal diet	Deficient diet
HCY, μ mol/l	9.27 $\pm$ 0.91	39.24 $\pm$ 21.78**	9.45 $\pm$ 1.03	30.24 $\pm$ 14.11**
Vitamin B9, nmol/g tissue	0.92 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.19**	0.89 $\pm$ 0.24	0.32 $\pm$ 0.19*
Vitamin B12, pmol/g tissue	44.8 $\pm$ 11.34	21.76 $\pm$ 2.05**	26.63 $\pm$ 6.43	18.00 $\pm$ 2.12*
SAM, nmol/g tissue	26.12 $\pm$ 9.00	26.23 $\pm$ 9.94	31.77 $\pm$ 4.24	31.13 $\pm$ 9.92
SAH, nmol/g tissue	4.55 $\pm$ 1.05	8.33 $\pm$ 2.02**	4.88 $\pm$ 0.84	6.38 $\pm$ 1.96
SAM/SAH ratio	5.82 $\pm$ 1.92	3.36 $\pm$ 1.63*	6.70 $\pm$ 1.62	5.30 $\pm$ 2.30

Data are means $\pm$ SD; *n* = 5 in each group. SAM, S-adenosylmethionine; SAH, S-adenosylhomocysteine. Statistically significant differences between control and deficient animals for each sex (ANOVA). **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 (ANOVA).

sion FX7; Thermo Fisher). To normalize the total amount of protein per lane, membranes were stripped and incubated with a monoclonal goat antibody against β -actin (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or a monoclonal mouse antibody against GAPDH (1:1,000; Millipore). Densitometric analysis of the Western blot band intensity was performed using ImageJ 1.44p.

Quantitative RT-PCR analysis. After rat brain tissues were grinded in liquid nitrogen, total RNA was isolated using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions. cDNA was reverse-transcribed from total RNA (1 μ g) using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), following the manufacturer's specifications. Real-time PCR was performed on the Light Cycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen). The validated couples of primers are indicated in Table 2. Temperature cycling consisted of one cycle to activate the enzyme (95°C, 15 min) followed by 43 cycles, each one consisting of denaturation (95°C, 10 s), annealing (53°C for StAR, 56°C for both

aromatase and SF-1; 15 s), and extension (72°C; 10 s). Melting curve analyses were performed by increasing temperature from 65 to 95°C. Cycle threshold (C_T) was determined for each sample, and real-time PCR amplification efficiencies were expressed by calculating the ratio of crossing points of amplification curves, using the RelQuant software (Roche Diagnostics). The expression of the genes of interest was normalized to that of *polII* using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

Statistical analysis. Data were prospectively collected and analyzed with SAS software (SAS Institute, Berkley, CA). Raw data reported as means $\pm$ SD were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. A *P* value of <0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Folate and vitamin B12 concentrations are reduced in the cerebellum of deficient rat pups. To validate the experimental protocol, concentrations of folate and vitamin B12 were mea-

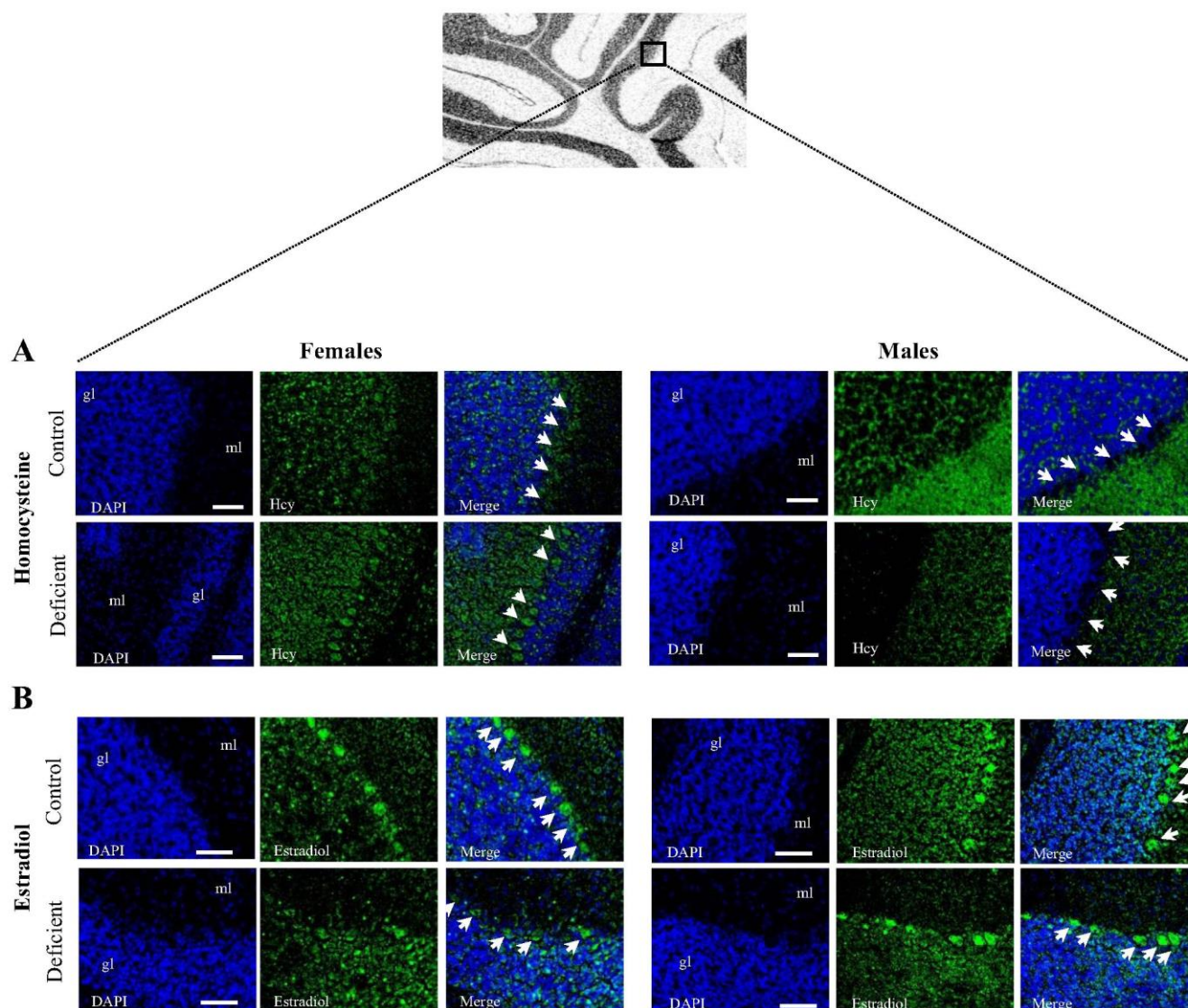


Fig. 2. Immunostaining of homocysteine (HCY) and estradiol in the 21-day-old rat cerebellum. A: distribution of HCY (green) in the cerebellum of 21-day-old female rats. Immunostaining of HCY-positive cells was performed on sagittal brain sections by means of a rabbit polyclonal antibody against HCY ($n = 5$ /group). The cell nuclei were counterstained by the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). In the deficient group, strong accumulation of HCY was observed in the cerebellar Purkinje cells. B: localization of estradiol (green) in the Purkinje cells of cerebellum counterstained with DAPI (blue) ($n = 5$ /group). ml, Molecular layer; gl, granular layer. Calibration bars, 200 μ m. Original magnifications, $\times 20$.

sured in cerebellum extracts prepared from pups fed by dams receiving the control or the methyl donor (folate and vitamin B12)-deficient diet. Both male and female animals exhibited substantial lower folate and vitamin B12 concentrations in the cerebellum compared with the controls (Table 3). As reported previously in the same animal model, HCY plasma levels increased significantly in the 21-day-old offspring from methyl donor deprived mothers (Table 3). HCY detection was higher in brain sections of deficient female pups, with a marked accumulation in the cerebellum Purkinje cells, compared with control animals (Fig. 2A). However, this sustained accumulation of HCY was not observed in males.

The concentrations of the classical determinants of HCY metabolism were also measured in cerebellar homogenates.

The universal methyl donor SAM, generated through the methionine cycle, is demethylated to form SAH, which is finally hydrolyzed into HCY. As illustrated in Table 3, SAM concentration remained unchanged, whereas SAH concentration was higher solely in the cerebellum of deficient compared with control females. Therefore, the SAM/SAH ratio was lower in the deficient female cerebellum (Table 3), with no significant change between control and deficient males.

Neurosteroidogenesis is altered in female cerebellum subjected to methyl donor deficiency. We first investigated the expression of the two key step proteins of neurosteroidogenesis, StAR and aromatase. Western blot analyses on cerebellum extracts showed a decreased expression of StAR and aromatase in the deficient female pups (Fig. 3A, left and right). The low

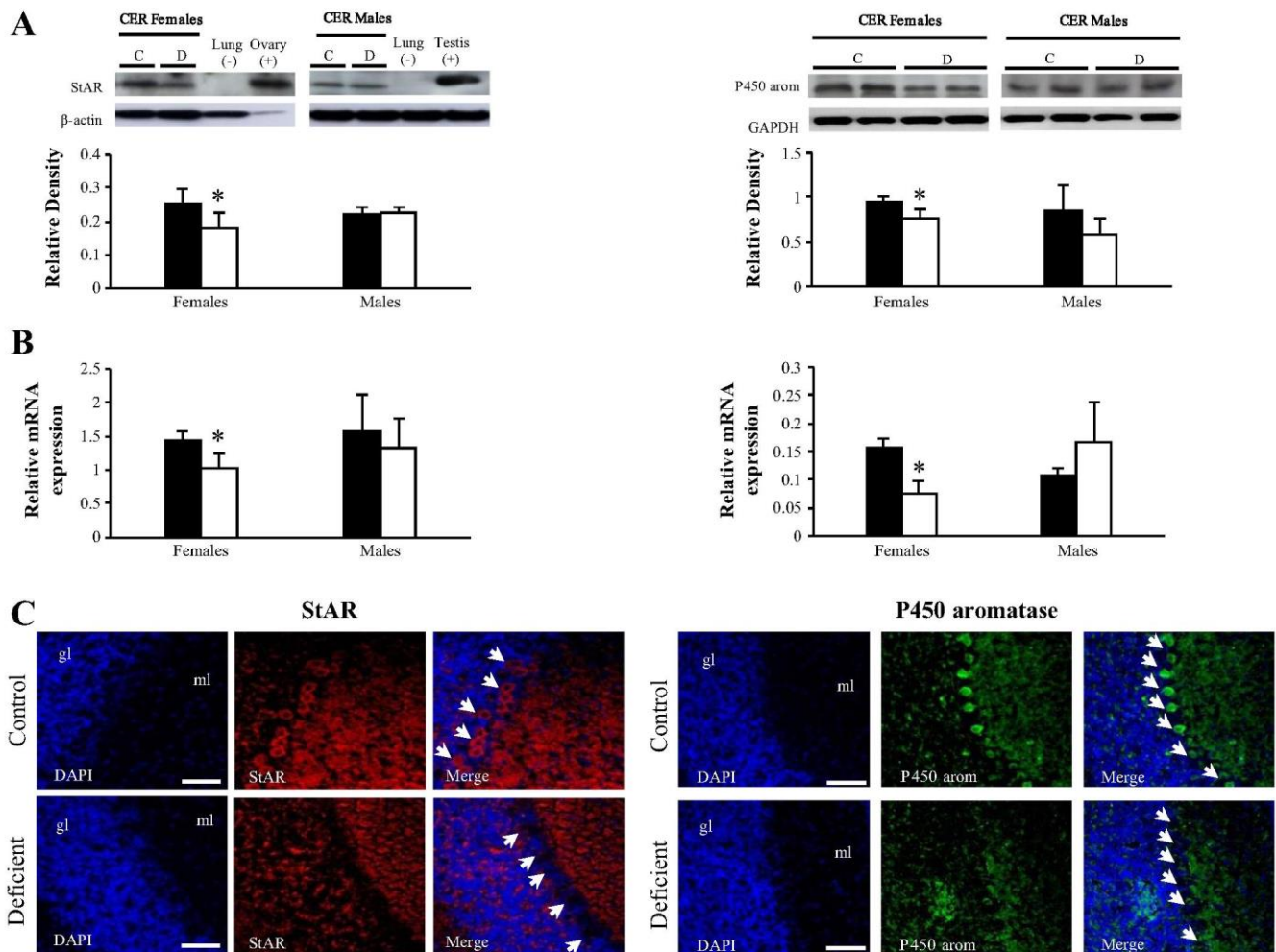


Fig. 3. Expression of StAR protein and aromatase in the cerebellum of 21-day-old female rats. **A:** Western-blot analysis. *Left:* representative set of a Western blot showing immunodetectable StAR protein. From left to right, the lanes contain mitochondria from cerebellum (CER; 30 μ g protein) of control (C) and deficient (D) 21-day-old rats. Lung of adult rat (30 μ g of protein) and ovary or testis of adult rats (5 or 30 μ g of protein) were used as negative or positive controls, respectively. Expression of StAR (30 kDa) was quantified and normalized against β -actin (43 kDa). *Right:* representative set of Western blots showing immunodetectable P450 aromatase protein. The lanes contain microsomes isolated from CER (30 μ g of protein) of C and D 21-day-old rats. Expression of aromatase (55 kDa) was quantified and normalized against GAPDH (38 kDa). Densitometric data were obtained from 5 separate experiments. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between the 2 experimental groups. **B:** RT-quantitative (q)PCR analysis of the effect of the deficient diet on StAR and aromatase mRNA expression in the cerebellum of 21-day-old rats. Arbitrary unit refers to an internal standard in the CER of C and D animals ($n = 5$ /group, run in duplicate). Statistically significant differences between the 2 experimental groups. **C:** immunohistochemical analysis. Observations were restricted to Purkinje cells of 21-day-old females exposed early to the deficient diet compared with control rats ($n = 5$ /group). Localization of StAR (red) and aromatase (green) in the Purkinje cells of cerebellum counterstained with DAPI (blue). Calibration bars, 200 μ m. Original magnifications, $\times 20$. * $P < 0.05$ (ANOVA).

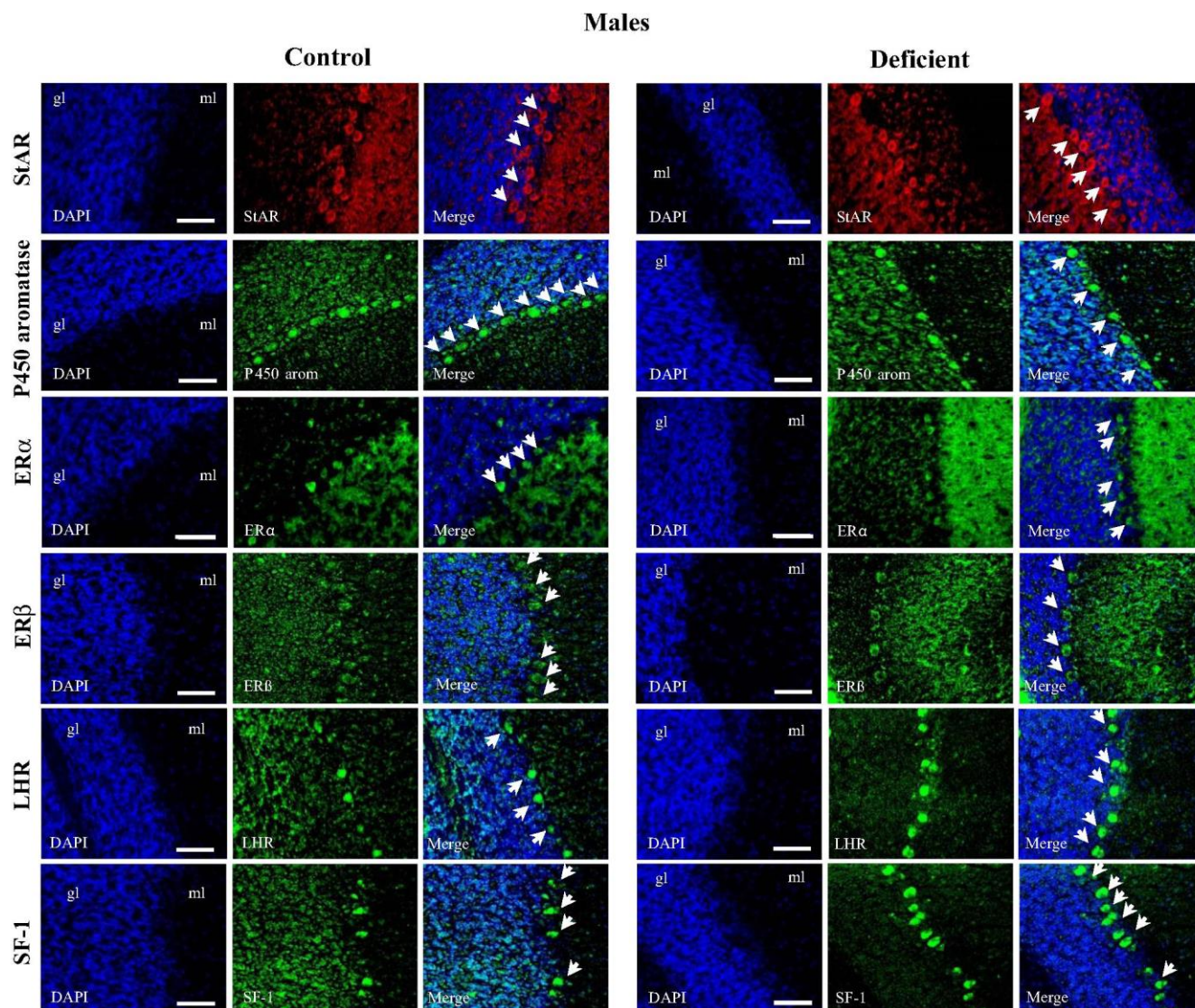


Fig. 4. Immunostaining of key proteins of neurosteroidogenesis in the 21-day-old rat male CER. Immunostaining of StAR, aromatase, ER receptor, LHR, and SF-1-positive cells was performed on sagittal brain sections ($n = 5/\text{group}$). The cell nuclei were counterstained by the fluorescent dye DAPI (blue). No significant difference of expression was observed between control and deficient pups from dams fed the deficient diet.

levels of StAR and aromatase in deficient females were mirrored by the diminution of the corresponding mRNAs, as determined by quantitative (q)RT-PCR (Fig. 3B). This result suggests that the deficiency in methyl donors affects the transcriptional or posttranscriptional regulation of both genes. Immunoreactivity for StAR (Fig. 3A, left) and aromatase (Fig. 3A, right) was detected mostly in Purkinje cells in control but not in deficient female pups. The pattern of expression of both proteins was not altered in males (Fig. 4).

We next determined the consequences of the diminished StAR and aromatase expression levels. Therefore, we measured the levels of pregnenolone and estradiol, the two metabolites directly affected by an alteration of StAR and aromatase activity, respectively. In agreement with the diminished expression level of the two enzymes, the amounts of pregnenolone and estradiol were reduced in deficient compared with control female cerebellar extracts, but not in males (Table 4).

The presence of the ER α and ER β receptors was assessed by Western immunoblot analysis of cerebellar fractions (Fig. 5A). A single band located at 66 kDa (Fig. 5A, left) and at 55 kDa (Fig. 5A, right) was observed for ER α and ER β , respectively. Densitometric analysis showed a strong decline for both recep-

Table 4. Pregnenolone and estradiol concentrations measured in the cerebellums of 21-day-old rats

	Females		Males	
	Normal diet	Deficient diet	Normal diet	Deficient diet
Pregnenolone, ng/g tissue	38.25 $\pm$ 5.70	27.55 $\pm$ 2.17**	39.35 $\pm$ 3.12	40.15 $\pm$ 10.44
Estradiol, ng/g tissue	0.91 $\pm$ 0.35	0.31 $\pm$ 0.06*	1.47 $\pm$ 0.52	0.84 $\pm$ 0.21

Data are means $\pm$ SD; $n = 5$ in each group. Statistically significant differences between control and deficient animals for each sex (ANOVA). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (ANOVA).

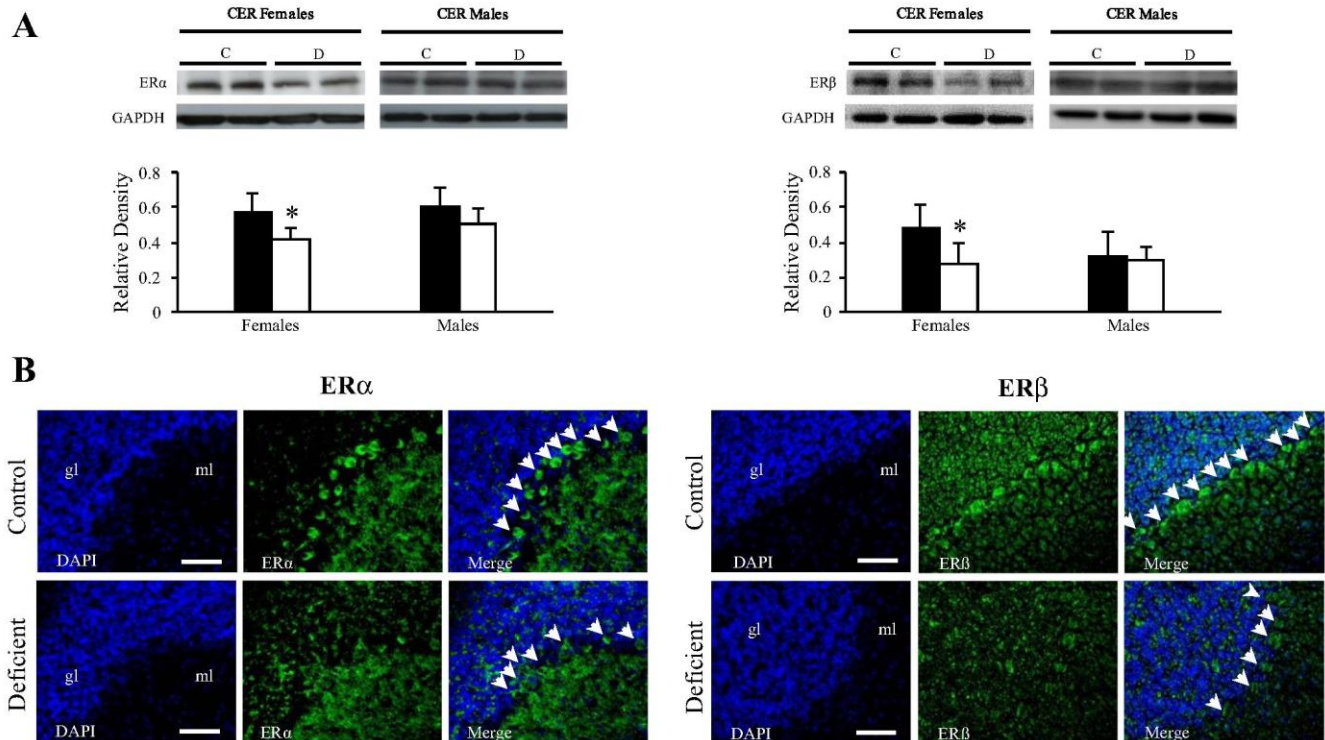


Fig. 5. Localization of ER α and ER β receptors in the CER of 21-day-old female rats. **A:** Western-blot analysis. *Left:* representative set of Western blots showing immunodetectable ER α protein. From left to right, the lanes contain total proteins isolated from CER (50 μ g protein) of C and D 21-day-old rats. *Right:* representative set of Western blots showing immunodetectable ER β protein. The lanes contain total proteins isolated from CER (50 μ g of protein). Expression of both ER α (66 kDa) and ER β (55 kDa) was quantified and normalized against GAPDH (38 kDa). Densitometric data were obtained from 5 separate experiments. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between the 2 experimental groups: * $P < 0.05$ (ANOVA). **B:** immunohistochemical analysis. Observations were restricted in the cerebellar Purkinje cells of 21-day-old females exposed early to the deficient diet compared with control rats ($n = 5/\text{group}$). Localization of ER α (green; *left*) and ER β (green; *right*) in the Purkinje cells of CER counterstained with DAPI (blue). Calibration bars, 200 μ m. Original magnifications, $\times 20$.

tors in the cerebellum fractions of female pups from deficient dams compared with controls. No significant differences were observed in males. Immunohistochemical analysis showed the presence of ER α and ER β receptors (Fig. 5B, *left* and *right*, respectively) in the cerebellum granular layer, with no immunostaining detected in the Purkinje cells from deficient female pups (Fig. 5B).

Taken together, these results show that neurosteroidogenesis is altered in female cerebellum following exposure to methyl donor deficiency.

The signaling cascade regulating neurosteroidogenesis is altered in the cerebellum of females subjected to methyl donor deficiency. To understand the events linking the methyl donor deficiency to altered neurosteroidogenesis, we investigated key proteins involved in the signaling cascade in steroidogenic tissues.

Densitometric analysis of Western blot performed against LHR showed a significant fall in the expression level of the receptor in the cerebellum fractions of female pups from deficient dams compared with controls. No significant difference was observed in males (Fig. 6A). This result was confirmed by immunostaining of LHR that was reduced in the Purkinje cells from deficient compared with control females (Fig. 6B), but not in males (Fig. 4).

Ligand binding on the LHR leads to the production of cAMP, which serves as a secondary messenger for activating PKA that is responsible for the phosphorylation of transcriptional

factors and regulators as well as the StAR protein itself. Therefore, we measured cAMP levels in the cerebellum of male and female pups (Fig. 6C). An increase in cAMP levels was found in pups of both sexes fed the deficient diet compared with controls. However, the increase was smaller in females than in males ($P < 0.05$) (Fig. 6C), suggesting a less efficient activation of neurosteroidogenesis in females. The level of PKA was not significantly affected in male or female deficient rats (Fig. 6D). However, the level of phospho-PKC, which was involved in a parallel signaling pathway, was significantly decreased in deficient females and increased in deficient males. Taken together, these results suggest that the activation of neurosteroidogenesis is altered and less efficient in deficient females.

A specific dysregulation of the transcription factors CREB and SF-1 occurs in deficient females. In addition to the signaling cascade, the expression of the ultimate activators SF-1 and CREB was assessed in the cerebellar tissues. By Western blot analysis, a single band of 46 kDa was detected for SF-1, and its intensity was significantly reduced in deficient females compared with controls or males (Fig. 7A). This diminution of protein expression was mirrored by a fall of mRNA levels in deficient females, as measured by qRT-PCR (Fig. 7B). An immunopositive signal was detected in the Purkinje cells of control animals (Fig. 7C). In line with previous observations regarding StAR and aromatase, the absence of SF-1 immunostaining of Purkinje cells was observed only in the case of

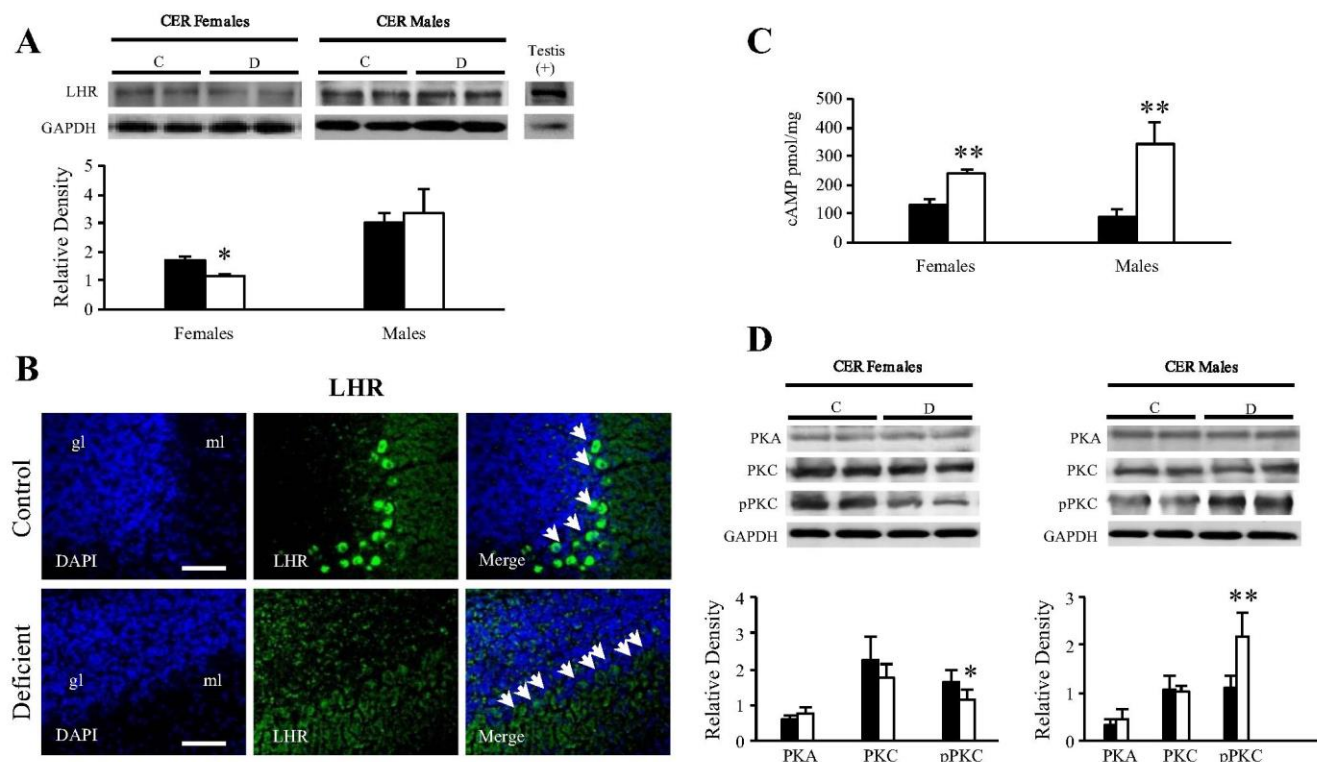


Fig. 6. Analysis of the signaling cascade proteins and cAMP concentration in the cerebellum of the 21-day-old rats. Western blot analysis of LHR. Representative set of Western blots showing immunodetectable LHR protein. Expression of LHR (80 kDa) was quantified and normalized against GAPDH (38 kDa). Testis (5 μ g of protein) was used as a positive control. Densitometric data were obtained from 5 separate experiments. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between the 2 experimental groups. *B*: immunostaining of LHR. Observations were restricted in the cerebellar Purkinje cells of 21-day-old females exposed early to the deficient diet compared with control rats ($n = 5$ /group). Localization of LHR (green) in the Purkinje cells of CER counterstained with DAPI (blue). Calibration bars, 200 μ m. Original magnifications, $\times 20$. *C*: cAMP levels in cerebellar extracts of control and deficient 21-day-old rats. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between C and D pups in each sex. *D*: Western blot analysis of PKA, PKC, and phospho-PKC (pPKC) of female (left) and male (right) cerebellar extracts. The lanes contain total proteins (40 μ g) isolated from C and D 21-day-old rats. Expression of each protein of interest was quantified and normalized against GAPDH (38 kDa). Densitometric data were obtained from 5 separate experiments. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between the 2 experimental groups. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (ANOVA).

deficient females and not deficient males (Fig. 4). In parallel, a diminution of CREB and phospho-CREB protein levels was also observed in the cerebellum of deficient females, whereas the expression of both proteins tended to increase in deficient males (Fig. 7D).

DISCUSSION

The postnatal period is determinant for the cerebellum development since neurogenesis is achieved around the third postnatal week in the rat (13, 22), which corresponds to the age of the pups assessed in our study. Our data demonstrate for the first time that early methyl donor deficiency impaired neurosteroidogenesis and consecutively the content of pregnenolone and estradiol in female cerebellum in association with decreased protein expression levels of StAR, aromatase, and estrogen receptors ER α and ER β as well as LHR. This was accompanied by impairment of the cAMP-dependent signaling pathway and of the expression levels of the ultimate activators CREB and SF-1 in deficient female pups.

As expected, exposure to the methyl donor-deficient diet until weaning markedly reduced tissue levels of folate and vitamin B12, with a subsequent accumulation of HCY, notably in Purkinje cells, in agreement with previous reports (4, 5). SAH concentration was increased only in deficient females,

resulting in a decreased index of methylation, as reflected by the SAM/SAH ratio. This may affect epigenetic regulation of gene expression in accord with the previously reported lower amounts of methylated DNA in the olfactory bulbs of 21-day-old deficient females (12) as well as in the embryonic brains of the progeny from dams fed the deficient diet (20). Regarding steroidogenesis, epigenetic regulation occurs principally through SF-1, which is the major transcriptional regulator of the StAR and aromatase genes (29, 38). A decreased SF-1 expression associated with impaired steroidogenesis has been reported previously in mouse adrenocortical cells (15). This nuclear factor plays a pivotal role in endocrine development but also in female sexual behavior and in energy balance (22, 34). According to the literature, the cerebral localization of SF-1 would be restricted to the ventromedial hypothalamic neurons, except for one paper describing the presence of SF-1 in the pyramidal cells of rat hippocampus (37). We report herein for the first time the expression of SF-1 in the cerebellar Purkinje cells. This suggests that SF-1 could play additional roles by regulating locally the synthesis of neurosteroids at the postnatal age in the cerebellum. Thus, the decreased expression levels of SF-1 could explain the impairment of StAR and aromatase expression measured in the cerebellum of female pups born to dams fed the deficient diet.

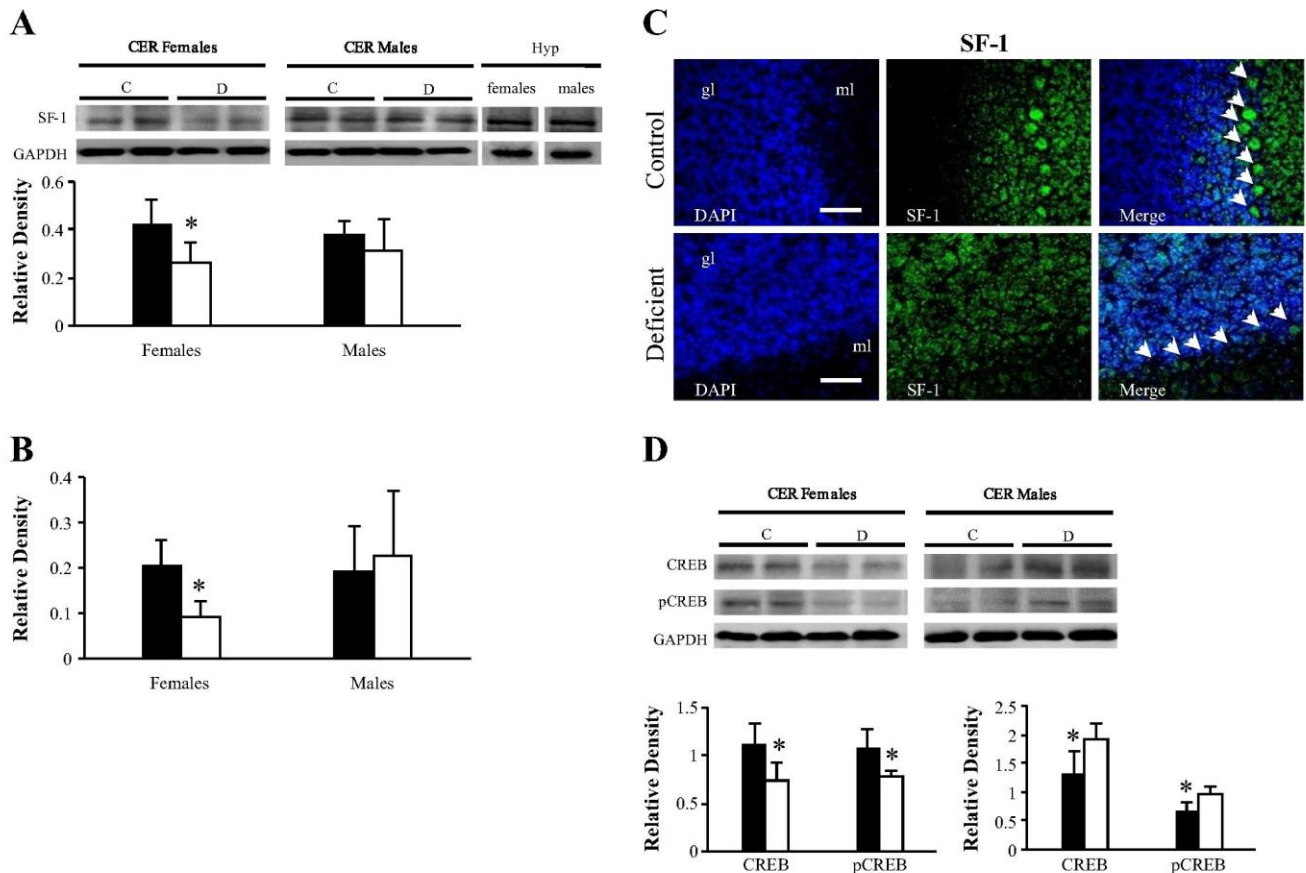


Fig. 7. Expression levels of the transcription factors CREB and SF-1 in the cerebellum of the 21-day-old rats. **A:** representative set of Western blots showing immunodetectable SF-1 protein. The lanes contain total proteins isolated from CER (30 μ g of protein) of C and D 21-day-old rats. Expression of SF-1 (55 kDa) was quantified and normalized against GAPDH (38 kDa). Two additional lanes contain proteins extracted from female and male hypothalamus (30 μ g) used as positive controls. Densitometric data obtained from 5 separate experiments. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between the 2 experimental groups. **B:** RT-qPCR analysis of the effect of the deficient diet on SF-1 mRNA expression in the cerebellum of 21-day-old rats. Arbitrary unit refers to an internal standard in the cerebellum of C and D animals ($n = 5$ /group, run in duplicate). Statistically significant differences between the 2 experimental groups. **C:** immunohistochemical staining of SF-1. Observations were restricted to Purkinje cells of 21-day-old females exposed early to the deficient diet compared with control rats ($n = 5$ /group). Localization of SF-1 in the Purkinje cells of CER counterstained with DAPI (blue). Calibration bars, 200 μ m. Original magnifications, $\times 20$. **D:** CREB and phospho-CREB (p-CREB) Western blot analysis. The lanes contain total proteins isolated from cerebellum (40 μ g of protein) of C and D 21-day-old rats. Expression of CREB and p-CREB was quantified and normalized against GAPDH (38 kDa). Densitometric data obtained from 5 separate experiments. Results are presented as means $\pm$ SD. Statistically significant differences between the 2 experimental groups. * $P < 0.05$ (ANOVA).

The reduced expression of StAR in the cerebellum of 21-day-old females is particularly relevant due to its involvement in pregnenolone synthesis as well as in the control of its expression levels via the LHR. Accordingly, both pregnenolone tissue concentration and LHR protein level were altered in deficient female pups, with a strong decrease in LHR immunostaining in the Purkinje cells.

Concerning the key step of aromatase-mediated conversion of testosterone to estradiol, both tissue content and Purkinje cell immunostaining of aromatase and estradiol were strongly reduced in deficient females. This could dramatically compromise the building of the neuronal circuits and the sexual maturation of the cerebellum since they act on the density of Purkinje dendritic spines and synapses through both ER α and ER β receptors, whose protein levels were also strongly reduced in the cerebellum of the 21-day-old deficient females.

The exploration of the cAMP-mediated signaling cascade associated with LHR activation allowed us to refine the mo-

lecular mechanisms accounting for the observed deleterious effects of methyl donor deficiency on neurosteroidogenesis. Indeed, the lesser increase of cAMP concentration and the lower level of phospho-PKC suggest that the activation of neurosteroidogenesis via phosphorylation mechanisms may be altered. Moreover, the expression levels of the transcriptional factors CREB, phospho-CREB, and SF-1 were also decreased specifically in deficient females.

Because all of these observations occurred specifically in female pups, it appears that the gestational methyl donor privation affects the cerebellum in a sex-dependent manner. Indeed, the effect of sex difference appears not only in the consequences on the neurosteroid synthesis pathway but also on HCY metabolism, since a reduced SAM/SAH ratio was measured only in female cerebellum. This is in accord with the findings of da Silva et al. (8), who recently reported sex differences in the alteration of methyl metabolism in newborn mouse brains after exposure to an early vitamin B-deficient diet.

Other previous reports about the pivotal role of the neurosteroidogenesis machinery in cerebellar development may contribute to explain the effect of sex difference observed in the present study. According to Dean and McCarthy (10), the sex-dependent differences are not related to the basal amounts of neurosteroids or receptors but to the differential regulation of their levels following environmental insults. Moreover, perinatal exposure to chemical toxins affects neurodevelopment, motor coordination, and behavior differently in males and females, in line with sex-dependent changes in cerebellar protein expression (32). Such dimorphic variations could account for the sex-dependent prevalence of some neuropsychological disorders, like depression or schizophrenia, in adulthood.

In summary, our results provide the first evidence of the dramatic effects of an early methyl donor deficiency on the cerebellar neurosteroidogenic pathway at the postnatal stage in female rats, with a decreased expression in major components of this pathway. This is in good accord with our previous report of methyl donor deficiency-associated alteration of neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs, in association with impaired olfactory performances in female rat progeny (12). In the present study, we also provide the first evidence of a cerebellar expression of SF-1, the main regulator of steroidogenic gene expression, the expression levels of which were also impaired in the cerebellum of females born to dams fed a deficient diet. These alterations of the neurosteroidogenesis-related proteins may participate in the previously documented impaired locomotor coordination involving cerebellar functions in the same animal model of methyl donor deficiency (5). In addition, the cerebellum is also involved in cognitive tasks through the coordination of the cortico-thalamic-cerebellar-cortical circuit (10), and our observations may also account for the impaired learning capacities and memory documented previously in deficient rat pups (5).

Early privation of folate also has long-term effects in adulthood, and these observations are in accord with the hypothesis of "fetal programming" on life-long health. This suggests that the influence of an early deficiency in folate and vitamin B12 on brain neurosteroidogenesis and brain development and maturation may prove to be a potential mechanism accounting for neurologic disorders in the early and later steps of life.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank D. Stocco (Texas Tech University) for providing antibodies against StAR protein and members of the laboratory for helpful comments. We also thank Rémy Umoret and Marilyn Schwartz for technical assistance.

GRANTS

Institutional grants were received from the French National Agency for Research (ANR Nutrivigene Project) and the Region of Lorraine (France).

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

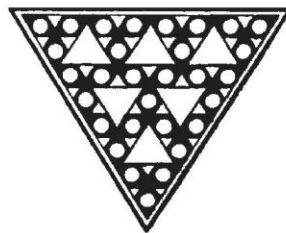
S.E.H.C., N.D., J.W., J.-L.D., J.-L.G., and B.L.-M. conception and design of research; S.E.H.C., N.D., J.W., L.C.-R., E.J., and J.-M.A. performed experiments; S.E.H.C., N.D., J.W., L.C.-R., E.J., J.-M.A., J.-L.D., J.-L.G., and B.L.-M. analyzed data; S.E.H.C., N.D., J.W., E.J., J.-M.A., and B.L.-M. interpreted results of experiments; S.E.H.C. and N.D. prepared figures; S.E.H.C., N.D., J.-L.D., and B.L.-M. drafted manuscript; S.E.H.C., N.D., J.W.,

L.C.-R., E.J., J.-M.A., J.-L.D., J.-L.G., and B.L.-M. approved final version of manuscript; N.D., J.-L.D., J.-L.G., and B.L.-M. edited and revised manuscript.

REFERENCES

1. Azcoitia I, Yague JG, Garcia-Segura LM. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* 191: 139–147, 2011.
2. Blaise S, Alberto JM, Nedelec E, Ayav A, Pourie G, Bronowicki JP, Gueant JL, Daval JL. Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr Res* 57: 777–782, 2005.
3. Blaise SA, Alberto JM, Audonnet-Blaise S, Gueant JL, Daval JL. Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1492–E1502, 2007.
4. Blaise SA, Nedelec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL. Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol* 216: 231–238, 2009.
5. Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, Alberto JM, Bossenmeyer-Pourie C, Gueant JL, Daval JL. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am J Pathol* 170: 667–679, 2007.
6. Chen Z, Schwahn BC, Wu Q, He X, Rozen R. Postnatal cerebellar defects in mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase. *Int J Dev Neurosci* 23: 465–474, 2005.
7. Chery C, Barbe F, Lequere C, Abdelmoutaleb 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.
8. da Silva VC, Fernandes L, Haseyama EJ, Agamme AL, Guerra Shinohara EM, Muniz MT, D'Almeida V. Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring. *PLoS One* 9: e92683, 2014.
9. Daval JL, Blaise S, Gueant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: E1; author reply E2, 2009.
10. Dean SL, McCarthy MM. Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease. *Cerebellum* 7: 38–47, 2008.
11. 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.
12. El Hajj Chehadeh S, Pourié G, Martin N, Alberto JM, Daval JL, Gueant 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* 111: 1021–1031, 2014.
13. Fan X, Xu H, Warner M, Gustafsson JA. ERbeta in CNS: new roles in development and function. *Prog Brain Res* 181: 233–250, 2010.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497–509, 1957.
15. Frigeri C, Tsao J, Czerwinski W, Schimmer BP. Impaired steroidogenic factor 1 (NR5A1) activity in mutant Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Mol Endocrinol* 14: 535–544, 2000.
16. Frye CA, Hirst JJ, Brunton PJ, Russell JA. Neurosteroids for a successful pregnancy. *Stress* 14: 1–5, 2011.
17. Guo XZ, Su JD, Sun QW, Jiao BH. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and -beta transcripts in the neonatal and adult rat cerebral cortex, cerebellum, and olfactory bulb. *Cell Res* 11: 321–324, 2001.
18. Higashi T, Yokoi H, Nagura Y, Nishio T, Shimada K. Studies on neurosteroids XXIV. Determination of neuroactive androgens, androsterone and 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol, in rat brain and serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 22: 1434–1441, 2008.
19. Karri S, Dertien JS, Stocco DM, Syapin PJ. Steroidogenic acute regulatory protein expression and pregnenolone synthesis in rat astrocyte cultures. *J Neuroendocrinol* 19: 860–869, 2007.
20. Kerek R, Geoffroy A, Bison A, Martin N, Akchiche N, Pourié G, Helle D, Guéant JL, Bossenmeyer-Pourie C, Daval JL. Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis* 4: e755, 2013.

21. Kim HJ, Park CH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. Changes of steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in postnatal rat development. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 247–254, 2002.
22. Kim KW, Sohn JW, Kohno D, Xu Y, Williams K, Elmquist JK. SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 336: 219–223, 2011.
23. King SR, Manna PR, Ishii T, Syapin PJ, Ginsberg SD, Wilson K, Walsh LP, Parker KL, Stocco DM, Smith RG, Lamb DJ. An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. *J Neurosci* 22: 10613–10620, 2002.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685, 1970.
25. Lalli E, Doghman M, Latre de Late P, El Wakil A, Mus-Veteau I. Beyond steroidogenesis: novel target genes for SF-1 discovered by genomics. *Mol Cell Endocrinol* 371: 154–159, 2013.
26. Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene in brain. *Endocrinology* 132: 2262–2270, 1993.
27. Liu T, Wimalasena J, Bowen RL, Atwood CS. Luteinizing hormone receptor mediates neuronal pregnenolone production via up-regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression. *J Neurochem* 100: 1329–1339, 2007.
28. Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 15: 321–333, 2009.
29. Manna PR, Eubank DW, Lalli E, Sassone-Corsi P, Stocco DM. Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 30: 381–397, 2003.
30. Manna PR, Stocco DM. The role of specific mitogen-activated protein kinase signaling cascades in the regulation of steroidogenesis. *J Signal Transduct* 2011: 821615, 2011.
31. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids* 75: 467–476, 2010.
32. Nguon K, Ladd B, Baxter MG, Sajdel-Sulkowska EM. Sexual dimorphism in cerebellar structure, function, and response to environmental perturbations. *Prog Brain Res* 148: 341–351, 2005.
33. Obeid R, Schlundt J, Umanskaya N, Herrmann W, Herrmann M. Folate is related to phosphorylated neurofilament-H and P-tau (Ser396) in rat brain. *J Neurochem* 117: 1047–1054, 2011.
34. Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley NA, Stallings N, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 57: 19–36, 2002.
35. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164: 247–253, 2000.
36. Tsutsui K. Biosynthesis, mode of action and functional significance of neurosteroids in the developing Purkinje cell. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102: 187–194, 2006.
37. Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem* 76: 1879–1886, 2001.
38. Young M, McPhaul MJ. A steroidogenic factor-1-binding site and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like elements are required for the activity of the rat aromatase promoter in rat Leydig tumor cell lines. *Endocrinology* 139: 5082–5093, 1998.



Résumé :

Les carences précoces en donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12 notamment) sont à l'origine de malformations congénitales. Elles exercent un effet délétère sur le développement du cerveau et sont associées à une augmentation de l'incidence de pathologies neurologiques et neurodégénératives à l'âge adulte. Un modèle murin de carence en donneurs de méthyles, le modèle MDD, a été développé au laboratoire et a permis d'étudier la réponse à cette carence, et de mettre en évidence des altérations de la structure cérébrale et des défauts de locomotion chez les rats issus de mères carencées. Ce comportement est contrôlé par le cervelet, dont on sait que le développement est altéré chez les MDD. En revanche, les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la réponse à la carence dans le cervelet restent peu compris.

Afin d'étudier les gènes et voies de signalisation dérégulés chez les MDD, nous avons réalisé l'étude du transcriptome du cervelet des rats carencés. Puis, nous nous sommes intéressés aux modifications épigénomiques engendrées par la carence en analysant leur miRnome et les modifications des protéines histones dans leur cervelet.

Nous avons mis en évidence des altérations des voies wnt, dans le cervelet des femelles carencées, qui n'ont pas été retrouvées chez les mâles. De même, de nombreux gènes impliqués dans le développement et les fonctions synaptiques sont dérégulés chez les femelles. Nous avons aussi montré des variations de plusieurs marques d'acétylation et de méthylation des histones chez les MDD. Enfin, de manière plus ciblée, nous avons mis en évidence un miARN dont l'expression diminue dans le cervelet des rats carencés : miR-344-5p. Nos premiers résultats semblent indiquer qu'il est impliqué dans le contrôle de la mort cellulaire.

Ces résultats montrent l'implication de dérégulations globales dépendantes du sexe mais aussi des altérations ciblées dans la réponse à la carence. Une amélioration de la compréhension de ces mécanismes moléculaires nous permettra de mieux appréhender le lien qui existe entre carence précoce en donneurs de méthyles, développement cérébral et incidence de pathologies à l'âge adulte.

Mots-clés : Vitamines B9 et B12, Cervelet, miARN, Voies de signalisation wnt, Epigénétique

Abstract :

Early methyl-donor deficiencies (e.g. B9 and B12 vitamins) can lead to congenital disabilities. They are behind developmental abnormalities of the brain, and are associated with the development of neurological and neurodegenerative diseases at adulthood as well. In the lab, we developed a methyl donor deficiency rat model called MDD. It has allowed us to show structure alterations of several brain areas and also locomotor coordination impairments in pups born from dams fed a MDD diet. Cerebellum is the brain structure involved in the control of this behavior and we know its development is delayed in MDD. However, the molecular mechanisms underlying methyl donor deficiency still remain misunderstood in this brain structure.

In order to study genes and signaling pathways dysregulated in MDD, we performed transcriptomic analysis of deficient pups' cerebellum. We also led miRnome analyses and histone modifications investigations with the purpose of understanding epigenomic modifications caused by MDD.

We showed alterations of wnt signaling pathways in female's cerebellum which we did not find in males. We also found that several genes involved in cerebellum's development and synaptic function were dysregulated in females. Regarding epigenomic regulation, acetylation and methylation of histone marks were also modified in females. Finally, we chose miR-344-5p as an interesting candidate to study more specific epigenetic modifications. Its expression is decreased in MDD and it seems to be involved in cellular death control, according to our first results.

These results shed light on global dysregulations, in a sex-dependent manner, as a consequence of methyl donor deficiency but also more specific alterations. A better understanding of the molecular mechanisms taking place in response to MDD could help us to link methyl donor deficiency, brain development and neurodegenerative pathologies occurrence at adulthood.

Keywords: B9 and B12 vitamins, Cerebellum, miRNAs, Wnt signaling pathways, Epigenetics