Nancy-Université
Université Henri Poincaré

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 SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.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

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Paul Verlaine université - metz

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

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

Par Nicolas Martin

Programmation fœtale et plasticité cérébrale : conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles chez le rat-Impact à long terme d'un conditionnement hypoxique néonatal

Le 14 Novembre 2011

Membres du jury:

Rapporteurs:

Mme Myriam Bernaudin	DR2,UMR 6232 CNRS, Caen
M Régis Guieu	PU-PH, FRE CNRS 2738, Marseille

Examinateurs:

M Jean-Christophe Cassel	DR2,UMR 7237 CNRS, Strasbourg
M Patrick Brachet	CR1, UMR 1019 INRA, Clermont-Ferrand
M Jean-Louis Guéant	PU-PH,UMR 954 INSERM, Nancy,
M Jean-Luc Daval	DR2,UMR 954 INSERM, Nancy, directeur de thèse
M Grégory Pourié	MCU,UMR 954 INSERM, Nancy, co-directeur de thèse

UMR 954 INSERM, Laboratoire de nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux,
9 avenue de la Foret de Haye-Faculté de Médecine 54505 Vandœuvre-lès-Nancy cedex

Je tiens à remercier Monsieur le professeur Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité INSERM U954 et chef de service du laboratoire de biochimie du CHU Nancy-Brabois de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de l'intérêt qui l'a porté à ce travail.

Pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire, je tiens à remercier Madame le docteur Myriam Bernaudin et Monsieur le professeur Régis Guieu. J'espère pouvoir montrer ici le signe de ma reconnaissance la plus sincère.

J'adresse mes remerciements à Monsieur le docteur Jean-Christophe Cassel et Monsieur le docteur Patrick Brachet d'avoir bien voulu évaluer ce travail et de participer au jury de ma soutenance de thèse.

Un grand merci à Monsieur le docteur Jean-Luc Daval, directeur de recherche et directeur adjoint de l'unité INSERM U954 pour avoir dirigé ces recherches, pour m'avoir fait confiance durant ces années de master et de thèse et surtout pour sa disponibilité et sa gentillesse qui m'ont vraiment permis de m'épanouir dans ces recherches. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de l'estime que je lui porte.

Je tiens à remercier Monsieur le docteur Grégory Pourié sans qui ce travail n'aurait pu être ce qu'il est. Je le remercie tout particulièrement pour la passion qu'il m'a inculqué et tout le savoir qu'il m'a prodigué durant toutes ces années. Son co-encadrement m'a permis d'acquérir une plus grande maturité scientifique. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect

Je tiens remercie Madame le docteur Carine Bossenmeyer-Pourié pour les conseils qui ont favorisé sans aucun doute l'aboutissement de ce travail, pour sa disponibilité et pour m'avoir ouvert un univers de la biologie qui pour moi était à la base hostile et abstraite : la biologie moléculaire.

Je voulais également remercier Monsieur le docteur Bernard Beck pour nous avoir fait partager son expérience et de m'avoir permis de commencer cette thèse au laboratoire.

Je voulais également remercier Madame Violette Koziel pour sa gentillesse, sa disponibilité et son grande aide durant toute cette thèse. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Un grand merci aux ingénieurs et aux techniciens de l'INSERM U954 et du CHU Brabois : Emmanuelle, Sandrine (qui m'a initié aux joies de la biologie moléculaire !!), Nicole, Céline, Deborah, Pierre, Florence, Sophie, Ferechteh pour leurs aides et leurs conseils. Sans oublier la « dream team » des secrétaires : Dominique et Catherine.

Un merci particulier à Philippe et à Jean Marc (« le Big boss de la bioch ») pour leurs précieux conseils, leur gentillesse pour tous ces instants de franches rigolades. Ne changez pas les gars !!!

A mes compagnons de route qui furent présent depuis le début : Hélène, Ma'atem, Sonia, Nassila, Maira, Soufiane, Patrice et Cyril et celles arrivées en cours : Sarah, Shabnam, Racha,

Rania, Rose avec qui j'ai passé de très bons moments que ce soit au labo ou en dehors. Je vous adresse l'expression de ma sincère amitié.

Je salue également tous les autres membres de notre unité et les stagiaires qui ont été de passage dans notre laboratoire.

Je salue et remercie toute ma famille et en particulier ma grande mère Gisèle, ma tante Agnès, Guillaume et Jean sans oublier mes amis Raphael et Manuela.

Je salue et dédie ce travail à mes parents Michel et Martine qui sans leurs soutiens ne m'aurai pas permis d'être là où j'en suis maintenant. Je les remercie du plus profond de mon cœur.

Enfin il me reste plus qu'à remercier une personne qui m'a soutenu, qui m'a supporté durant plus de la moitié de cette thèse et j'espère qui le fera encore très longtemps. A Dorine à qui je témoigne tout mon amour.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 5

ABREVIATIONS et ACRONYMES 7

CONTEXTE DE L'ETUDE 10

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **11**

PARTIE 1 : MATURATION ET VIEILLISSEMENT CEREBRAL **12**

I. Développement postnatal de l'hippocampe **12**
1. Description anatomique de l'hippocampe du rat **12**
   a. Structure interne **12**
   b. Connectivité interne **13**
2. L'apprentissage et les différents types de mémoire **14**
   a. La dichotomie temporelle de la mémoire **14**
   b. Le modèle de classification de Larry Squire et d'Endel Tulving **15**
   c. Le circuit de Papez **16**
3. Développement et maturation de la formation hippocampique **17**
   a. La neurogenèse **17**
   b. La synaptogenèse **18**

II. Développement postnatal du cervelet **19**
1. Description anatomique du cervelet chez le rat **19**
   a. Structure interne **19**
   b. Connectivité interne **21**
2. Développement et maturation du cervelet : focus sur la cellule de Purkinje **22**
3. Développement post-natal du rat **24**

III. Vieillissement cérébral **24**
1. Aspects généraux cérébraux **24**
2. Vieillissement hippocampique **25**
   a. Aspects cellulaires **25**
   b. Aspects fonctionnels du vieillissement hippocampique **27**
3. Vieillissement du cervelet **28**
   a. Aspects cellulaires: focus sur la cellule de Purkinje **28**
   b. Aspects fonctionnels du vieillissement cérébelleux **29**

IV. Facteurs influençant le vieillissement cérébral **29**
1. Stress oxydant **29**
   a. Altérations mitochondriales **29**
   b. Dommages lipidiques et oxydation protéique **31**
2. Facteurs nutritifs antioxydants **31**
   a. La vitamine E **31**

b. Composés phytochimiques et polyphénoliques 32
3. Les oestrogènes 33
4. La programmation fœtale 36
5. Mode de vie 37

PARTIE 2 : CYCLE DES MONOCARBONES 39

I. Les folates (vitamine B9) 39
1. Structure, sources, apports et besoins en folates 39
2. Métabolisme et distribution des folates 40
3. Principales causes des carences en vitamine B9 43

II. Les cobalamines (vitamine B12) 44
1. Structure, sources, apports et besoins de la vitamine B12 44
2. Métabolisme et distribution des cobalamines 46
3. Principales causes de carence en vitamine B12 49

III. L'homocystéine 49
1. Les différentes formes d'homocystéine circulante 50
2. Voie de synthèse et de dégradation 51
3. Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine 53
4. Mécanismes de l'hyperhomocystéinémie 55
   a. Altération de la synthèse du N5-méthyltétrahydrofolate 55
   b. Altération de la reméthylation de l'homocystéine 55
   c. Altération de la voie catabolique de l'homocystéine 55
5. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie 56
   a. Facteurs génétiques 56
   b. Facteurs nutritionnels 57
   c. Facteurs environnementaux et inhérents au mode de vie 58

PARTIE 3 : PATHOLOGIES NEUROLOGIQUES EN LIEN AVEC UNE HYPERHOMOCYSTEINEMIE 60

I. Aspects cellulaires de la neurotoxicité de l'homocystéine 60
1. Homocystéine, phénomène d'excitotoxicité et récepteurs au glutamate 60
   a. Phénomène d'excitotoxicité et récepteurs au glutamate 60
   b. L'acide homocystéique : agoniste des récepteurs au glutamate 62
2. Homocystéine et stress oxydant 63
3. Homocystéine et hypométhylation 64

II. Pathologies neurologiques développementales, adultes et au cours du vieillissement 66
1. Pathologies développementales 66
2. Les pathologies chez l'adulte 68
3. Les pathologies neurodégénératives liées au vieillissement 69

PARTIE 4 : L'HYPOXIE NEONATALE : DE LA NEURODEGENERESCENCE A LA NEUROGENESE 73

I. Les différents types d'hypoxie et sa régulation physiologique 73
1. Les différents types d'hypoxie 73
2. Adaptation physiologique à une hypoxie 74
3. Influence de l'âge à une lésion hypoxie-ischémie 75

II. L'hypoxie sévère 76
1. L'asphyxie périnatale 76
2. Conséquences de l'hypoxie-ischémie périnatale 77
   a. Déficit énergétique et accumulation de lactate 78
   b. Excitotoxicité et œdème cytotoxique 78
   c. La mort cellulaire : nécrose et apoptose 79

III. Le préconditionnement 80
1. Les principaux types de préconditionnement 81
   a. L'ischémie 81
   b. Les lipopolysaccharides 81
   c. L'hypoxie 82
   d. L'acide 3-nitropropionique 82
   e. L'hypothermie et l'hyperthermie 82
   f. Le Cortical spreading depression et les anesthésiques 82
2. Les mécanismes cellulaires et moléculaires dans la tolérance cérébrale 83
   a. Les récepteurs au glutamate et l'excitotoxicité 83
   b. Lutte contre le stress oxydatif 83
   c. La voie des protéines kinase 84
   d. Les facteurs de transcription 84
   e. Les protéines chaperonnes 85
   f. Les réponses neuroinflammatoires 85
   g. Les facteurs trophiques 85
   h. Autres mécanismes 86

IV. Stimulation d'une neurogenèse par un conditionnement hypoxique néonatal 86
1. La neurogenèse 86
   a. La neurogenèse embryonnaire 86
   b. Le neurogenèse adulte 87
2. Le conditionnement hypoxique néonatal 89

OBJECTIFS 91

RESULTATS 94

PREMIERE PARTIE: **Une carence en folate altère la différenciation et la plasticité de neuroprogéniteurs via les voies épigénétiques et l'homocystéinylation**
Objectifs **95**
Publication **96**
Synthèse **151**

DEUXIEME PARTIE **: Une carence en donneurs de méthyles modifie la neuroplascticité cérébelleuse dépendante des synapsines via une altération de la voie des récepteurs aux œstrogènes**
Objectifs **153**
Publication **154**
Synthèse **206**

TROISIEME PARTIE: **Un conditionnement hypoxique néonatal bref améliore les fonctions cognitives et les propriétés tissulaires cérébrales chez le rat adulte – Mise en évidence d'un dimorphisme sexuel**
Objectifs **210**
Publication **211**
Synthèse **219**

QUATRIEME PARTIE **: Une brève hypoxie néonatale confère une résistance à la senescence cérébrale chez les rats mâles âgés associés avec une augmentation de la plasticité synaptique et une amélioration des performances mnésiques**
Objectifs **220**
Publication **221**
Synthèse **260**

CINQUIEME PARTIE **: Programmation fœtale et vieillissement cérébral : influences conjuguées d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles et d'un conditionnement hypoxique périnatal**
Publication **263**

DISCUSSION/CONCLUSION **290**

PERSPECTIVES **302**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **304**

MATERIELS ET METHODES **344**

LISTE DE MES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS **421**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : L'hippocampe 13

Figure 2 : Les connectivités internes de l'hippocampe 14

Figure 3 : Modèle SPI 16

Figure 4 : Schéma du circuit de Papez 17

Figure 5 : Dessin de cellules de Purkinje et de cellules granulaires à partir d'un cervelet de pigeon 20

Figure 6 : Structure du cervelet 21

Figure 7 : Schéma fonctionnel des connexions cérébelleuses 22

Figure 8 : Maturation des cellules de Purkinje dans le cervelet du rat 24

Figure 9 : Expression d'Erα et Erβ dans le cerveau de rongeurs 34

Figure 10 : Différents modes d'action possibles des œstrogènes dans la neuroprotection 36

Figure 11 : Effets d'une altération nutritionnelle fœtale sur la croissance et la maturation des organes en lien avec des pathologies adultes 37

Figure 12 : Structure chimique de l'acide folique et ses dérivés 39

Figure 13 : Schéma d'absorption des folates au niveau intestinal 41

Figure 14 : Schéma de distribution des folates dans les hépatocytes et autres cellules des organes périphériques 42

Figure 15 : Cycle des folates (vitamine B9) 43

Figure 16 : Structure de la vitamine B12 ou cobalamine 45

Figure 17 : Voie d'assimilation et distribution de la vitamine B12 47

Figure 18 : Réaction de la conversion du méthylmalonyl-CoA en méthylsuccinyl-CoA 48

Figure 19 : Réaction de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine 48

Figure 20 : Formules chimiques de l'homocystéine, ses formes circulantes et ses dérivés 50

Figure 21 : Représentation du métabolisme de l'homocystéine 53

Figure 22 : Régulation nutritionnelle de l'homocystéine 54

Figure 23 : Résumé des effets neurotoxiques de l'homocystéine 66

Figure 24 : Sensibilité à l'oxygène 75

Figure 25 : Mécanisme cellulaire issu d'une hypoxie-ischémie 80

Figure 26 : Critères définissant les concepts du conditionnement et la tolérance cérébrale 81

Figure 27 : La neurogenèse à différents stades du développement et de la vie 89

Figure 28 : La neurogenèse issue d'une hypoxie néonatale dans le cerveau de raton à 20 jours post-hypoxie 90

Figure 29 : Schéma mécanistique des voies de régulation d'ERα sur les synapsines 208

Tableau 1 : Les différents types de mémoire et leurs structures cérébrales associées 15

Tableau 2 : ANC en folates pour la population française 40

Tableau 3 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine B12 pour la population française 45

Tableau 4 : Valeurs normales et pathologiques du taux d'homocystéine plasmatique 51

Tableau 5 : Principaux déterminants du niveau d'hyperhomocystéinémie 59

ABREVIATIONS et ACRONYMES

3-NP	Acide 3-nitropropionique
8-OHdG	8-hydroxy-2'-désoxyguanosine
AA	Acide arachidonique
AAE	Acide aminé excitateur
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNn	Acide désoxyribonucléique nucléaire
AdoCbl	Adénosylcobalamine
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ANC	Apport nutritionnel conseillé
ANSES	Agence national de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AP-1	Activator protein 1
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid protein precursor
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébrale
BDNF	Brain-derivated neurotrophic factor
bHLH	basic helix-loop-helix
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BHMT	Bétaïne homocystéine méthyltransférase
BrdU	Bromodeoxyuridine
CA 1, 2,3	Corne d'Ammon 1, 2,3
Cbl	Cobalamine
CBS	Cystathionine β-synthase
CH_3-THF	Méthyl tétrahydrofolate
CO	Monoxyde de carbone
CREB	Cyclic AMP-response element binding protein
CSN	Cellule souche neurale
DHF	Dihydrofolate
DLT	Dépression à long terme
E	Embryonnaire
EC	Cortex entorhinal
EGCG	Epigallocatechine-3 gallate
EGF	Epidermal growth factor
EHI	Encéphalopathie hypoxique-ischémique
ER	Estrogen receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FI	Facteur intrinsèque
GABA	Acide γ-aminobutyrique

GAD	Glutamate acid decarboxylase
GD	Gyrus Denté
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GNMT	Glycine-N-méthyltransférase
Grid 2	Glutamate receptor ionotropic delta 2
GST	Glutathion S-transférase
Hcy	Homocystéine
HERP	Homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein
HES	Hairy Enhancer of Split
HH	Hypothalamo-hypophysaire
HIF	Hypoxia inducible factor
HNE	Acide linoléique 4-hydroxy-2-nonénal
HO-1	Hème oxygènase 1
HSF	Heat shock factor
HSP	Heat shock protein
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1
iNOS	Inducible NO synthétase
KO	Knock out
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Math	Mouse basic helix-loop-helix transcription homolog of the drosophila astral gene
MDA	Malondialdéhyde
MeCbl	Méthylcobalamine
MEK	Mitogen-activated protein Extracellular signal-regulated Kinase
MG	Monoglutamate
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3,6-tétrahydropyridine
MTHFR	5,10 méthylènetétrahydrofolate réductase
MTR	Méthionine synthase
MTRR	Méthionine synthase réductase
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NeuroD	Neurogenic differentiation
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve growth factor
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NT-3	Neurotrophine-3
P	Post-natal
ParaS	Parasubiculum
PC	Préconditionnement
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PG	Polyglutamate
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PLP	Pyridoxal 5'-phosphate
PLT	Potentialisation à long terme
PPM1	Protein phosphatase M1
PreS	Presubiculum
PS1	Présiniline 1

RFC1	Folate receptor 1
ROR α	RAR-related orphan receptor alpha
SAH	S-adénosyl-homocystéine
SAM	S-adénosyl-méthionine
Sb	Subiculum
S-FBP	Folate binding protein soluble
SHMT	Sérine hydroxyméthylase
SOD	Superoxyde dismutase
SPI	Serial Parallel Independent
Src	Sarc
TC	Transcobalamine
TGF	Transforming growth factor
tHcy	Homocystéine totale
THF	Tétrahydrofolate
Trk	Tyrosine kinase receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
Vit E	Vitamine E
ZSV	Zone subventriculaire

CONTEXTE DE L'ETUDE

Beaucoup de données laissent penser que les nutriments et les facteurs environnementaux ont une grande influence sur l'expression génique. Les facteurs génétiques sont susceptibles de déterminer en partie la survenue de différentes pathologies, alors que les facteurs environnementaux sont plutôt impliqués dans la modulation de la sensibilité envers les pathologies. Cette relation gène-environnement a été décrite pour la première fois en 1942 par le biologiste Conrad H. Waddington qui avait émis cette hypothèse afin de comprendre pourquoi les cellules ayant un même patrimoine génétique présentaient une grande différence d'expression génique illustrée par de fortes variations phénotypiques.

La relation gène-environnement a fait suite à la mise en évidence des mécanismes épigénétiques et épigénomiques où la nutrition tient une place prépondérante. Dans ce contexte, les folates et la vitamine B12 sont des micronutriments majeurs, en interaction directe avec la régulation de l'expression du génome et de ses produits. Selon les données épidémiologiques de l'Organisation mondiale de la santé, les carences en folates et vitamine B12 demeurent une priorité mondiale. L'OMS et les pouvoirs publics sont à l'origine de nombreuses campagnes de sensibilisation aux avitaminoses en folate et cobalamine, notamment au cours de la grossesse, période critique pour le développement de l'enfant. Par ailleurs, ces carences associées à une élévation du taux d'homocystéine circulante ont été identifiées comme facteur de risque dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, neurologiques, hématologiques et digestives, à différentes périodes de la vie.

L'hypoxie est un phénomène biologique résultant le plus souvent d'une conjonction de facteurs environnementaux particuliers, et qui est souvent rencontré lors de la grossesse et de l'accouchement, intégrant dans un nombre non négligeable de cas les processus physiopathologiques de l'asphyxie périnatale. Alors que l'hypoxie est un phénomène généralement délétère, en particulier pour le cerveau qui est gros consommateurs d'oxygène, elle peut induire une tolérance cérébrale vis-à-vis d'évènements ultérieurs lorsqu'elle est appliquée en-deçà de son seuil dommageable. Différents mécanismes ont été évoqués pour sous-tendre ce phénomène, parmi lesquels la stimulation d'une neurogenèse endogène réactionnelle.

Revue bibliographique

PARTIE 1 : MATURATION ET VIEILLISSEMENT CEREBRAL

I. Développement postnatal de l'hippocampe

1. Description anatomique de l'hippocampe du rat

a. Structure interne

L'hippocampe est une structure bilatérale et symétrique, faisant partie du système limbique et qui joue un rôle central dans la mémoire et la navigation spatiale. Il s'agit d'une structure corticale ancienne (archicortex) repliée sur elle-même et située dans la face médiane du lobe temporal. La formation hippocampique est composée de 5 structures : l'hippocampe, le subiculum, le presubiculum, le parasubiculum, et le cortex entorhinal (*Amaral et Witter, 1995*). L'hippocampe est composé de deux principales couches de cellules enchâssées l'une dans l'autre : le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon (CA). La corne d'Ammon est elle-même divisée en 3 parties : CA1, CA2 et CA3 **(Figure 1)**

Différents types de cellules sont présents dans l'hippocampe, comme dans la majorité du système nerveux central. Les cellules ayant la plus évidente importance physiologique sont les neurones pyramidaux, appelés ainsi en raison de leur forme. Ce sont des neurones excitateurs glutamatergiques. Ils constituent la majeure partie des cellules du *stratum pyramidal* de la corne d'Ammon et sont également majoritaires dans diverses régions corticales. Dans le gyrus denté, les neurones principaux sont les cellules granulaires. Plus petites et de forme arrondie, elles ne comportent pas de dendrites basales.

Environ 12% des neurones hippocampiques sont des cellules dites non-pyramidales (*Caeser et Aertsen., 1991*), c'est-à-dire n'appartenant ni à la classe des cellules pyramidales, ni aux cellules granulaires. Leur classification est basée sur la localisation et l'apparence de ces cellules. La principale caractéristique morphologique étant que leurs dendrites n'ont pas d'épines dendritiques. De plus, leur noyau est entouré d'une membrane nucléaire largement invaginée. On distingue 5 types de cellules non-pyramidales : les cellules en corbeille, situées dans le *stratum oriens*, les neurones fusiformes, dans la région du hile, les cellules en corbeille de type pyramidal, dans le *stratum granulosum* du gyrus denté, les cellules bipolaires et multipolaires, principalement situées dans le *stratum pyramidal*. L'axone des cellules non-pyramidales ne suit pas les voies des fibres intrinsèques et leurs ramifications sont clairement différentes de celles des cellules pyramidales et granulaires. La plupart des cellules non-pyramidales ont été décrites comme des interneurones utilisant le GABA (Acide γ-aminobutyrique) comme neurotransmetteur principal exerçant une action inhibitrice sur les réseaux avoisinants. Plusieurs de ces interneurones pourraient également contenir des neuropeptides comme la cholécystokinine (*Greenwood et al., 1981*), le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) (*Loren et al., 1979*) ou encore la substance P (*Vincent et al., 1981*). Signalons également la présence transitoire de neurones non-pyramidaux appelés cellules de Cajal-Retzius. Encore largement méconnues, ces cellules joueraient un rôle dans l'établissement des premières connexions synaptiques de l'hippocampe avec le cortex entorhinal ainsi que dans la migration neuronale (*Del Rio et al., 1997*).

Quatre types de cellules gliales ont été décrits dans l'hippocampe : les astrocytes, représentant environ 75% des cellules non-neuronales (*Beach et al., 1982*), sont identifiés par la présence de glycogène et de la protéine GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein*)* ainsi que par leur morphologie caractéristique : les astrocytes de type I sont des astrocytes fibreux, qui montrent une morphologie de type neuronal par leurs prolongements fins et irréguliers. Les astrocytes de type II sont plus compacts, larges et plats et présentent un cytoplasme plus clair en microscopie électronique. Les astrocytes sont en contact avec les vaisseaux sanguins par leurs filopodes et participent ainsi à la constitution de la barrière hémato-encéphalique. On pense qu'ils jouent également un rôle important dans la nutrition des neurones. Les oligodendrocytes sont de larges cellules avec de longues et fines excroissances excessivement ramifiées. Ils sont impliqués dans la myélinisation des axones. La microglie, largement mobile, impliquée dans la phagocytose d'éventuels déchets cellulaires. Les épendymocytes, enfin, sont des cellules de soutien larges et plates, sans excroissance.

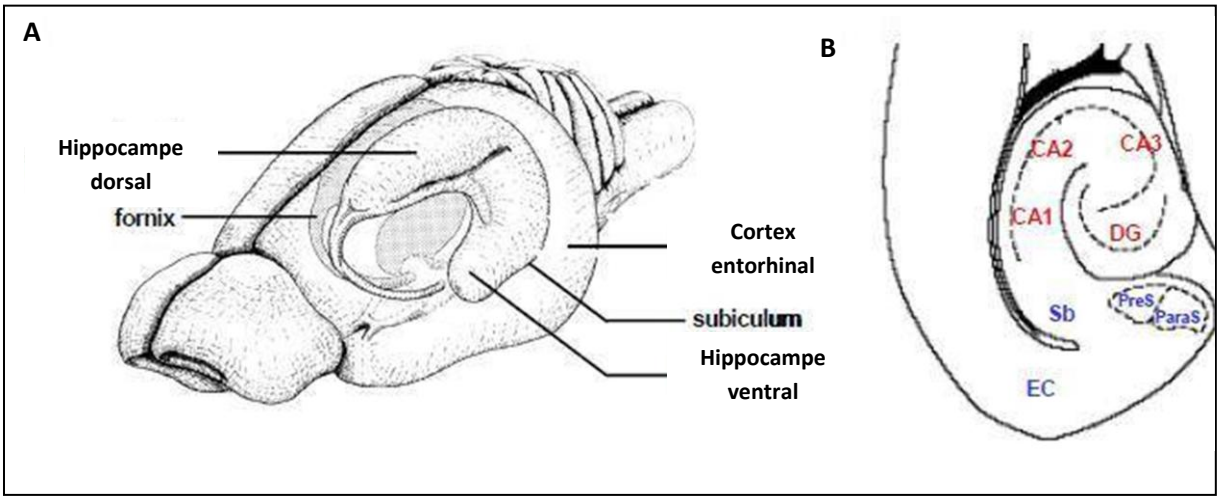


Figure 1 : L'hippocampe. **A**. localisation de la formation hippocampique dans un cerveau de rat (*D'après Amaral et Witter, 1995*).**B**. représentation d'une section horizontal d'hippocampe illustrant les différentes structures de la formation hippocampique (d'après Amaral et Witter, 1995). CA1, CA2 et CA3 : Corne d'Ammon 1,2 et 3 ; GD : gyrus denté ; Sb : subiculum ; PreS : presubiculum ; ParaS : parasubiculum ; EC : cortex entorhinal.

b. Connectivité interne

Le réseau hippocampique comprend des entrées, des sorties et des connections internes. Le flux d'informations à travers l'hippocampe est unidirectionnel. Le circuit le plus simple est constitué d'une voie principale excitatrice trisynaptique mettant en jeu 4 groupes de neurones : les cellules pyramidales du cortex entorhinal envoient leurs axones, formant la voie perforante, vers le gyrus denté pour contacter les cellules granulaires. Les axones des cellules granulaires, les fibres moussues, contactent les cellules pyramidales de la région CA3 qui, à leur tour, envoient des axones, appelés les collatérales de Schaeffer, à travers le *stratum pyramidal* vers l'aire CA1. Ces derniers neurones envoient leurs projections hors de l'hippocampe, vers le subiculum qui contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une

boucle anatomique. Outre cette voie trisynaptique, d'autres régions de l'hippocampe sont également contactées par le cortex entorhinal, telles que CA1 et CA3, ainsi que le subiculum **(Figure 2)**.

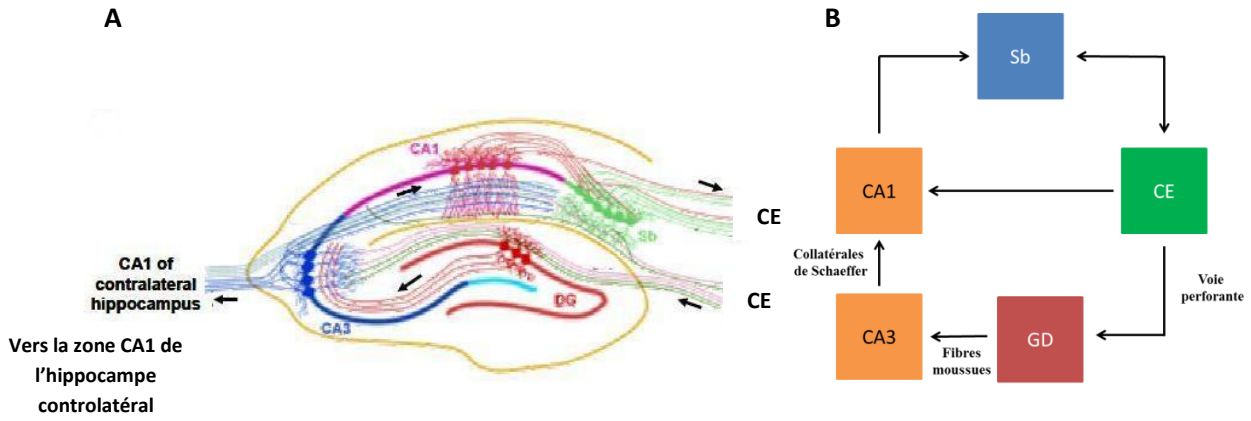


Figure 2 : Les connectivités internes de l'hippocampe. **A**. Connexions hippocampiques sur une coupe coronale (*D'après le site www.bris.ac.uk*). **B**. Représentation schématique des connexions internes de l'hippocampe.CA1 et CA3 : corne d'Ammon 1 et 3 ; GD : gyrus denté ; CE : cortex entorhinal ; Sb : subiculum

2. L'apprentissage et les différents types de mémoire

Le cas clinique du patient H.M.[1] (*Scoville et Milner, 1957*) ainsi que d'autres moins connus ont éclairé les recherches sur la mémoire en dégageant deux points essentiels au niveau de l'organisation de la mémoire chez l'Homme. Premièrement, ces observations indiquent que l'hippocampe est indispensable à la formation de nouveaux souvenirs, mais n'intervient plus dans le rappel de souvenirs très anciens. Son rôle ne serait que temporaire dans le stockage des informations. Deuxièmement, des systèmes de mémoire reposent sur d'autres structures anatomiques que la formation hippocampique, comme le montre la capacité d'apprentissage d'habilités motrices du patient H.M. C'est alors qu'il a semblé nécessaire aux scientifiques de déterminer ces différents types de mémoire et de comprendre leur fonctionnement.

a. La dichotomie temporelle de la mémoire

A la suite d'un test portant sur la mémorisation et le rappel de syllabe (*Ebbinghaus, 1885*), Ebbinghaus dégagea deux caractéristiques principales, la première étant que les souvenirs peuvent être de courte durée (quelques minutes) ou persister pendant des jours ou des mois (de longue durée). C'est la première fois que ce concept de mémoire à court terme et à long terme fut dégagé d'une étude scientifique. D'autres travaux par la suite confirmèrent cette

[1] Souffrant d'épilepsie résistante aux médicaments, H.M. a subi une opération chirurgicale consistant à retirer bilatéralement une large portion de l'hippocampe et des tissus environnant notamment les lobes temporaux, où Scoville pensait que les foyers épileptogènes étaient localisés. A son réveil, H.M. souffrait d'une amnésie antérograde quasi-totale et d'une amnésie rétrograde temporellement graduée, alors que sa mémoire immédiate (mémoire à court terme) était intacte.

hypothèse où la mémoire à court terme était qualifiée de mémoire primaire et celle à long terme de mémoire secondaire (*James, 1890*). Le corrélat fut établi avec le cas de H.M. car si effectivement sa mémoire à long terme antérograde fut altérée, sa mémoire à court terme resta intacte. La mémoire à court terme conserve donc les informations sur un temps assez limité (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes) par rapport à la mémoire à long terme (de plusieurs secondes à toute une vie). Dans la mémoire à long terme, on retrouve notamment la mémoire de travail qui intervient dans le traitement cognitif d'éléments temporairement stockés. Cette mémoire de travail est organisée selon un administrateur central qui contrôle deux autres composantes, la boucle phonologique traitant les informations phonologiques et le calepin visuo-spatial traitant les informations visuo-spatiales (*Baddeley et Hitch, 1974*).

b. Le modèle de classification de Larry Squire et d'Endel Tulving

Il existe donc une mémoire à court terme et une mémoire à long terme. La mémoire à long terme consciente ne semble pas reposer sur les mêmes structures anatomiques que la mémoire inconsciente. Ceci montre que la mémoire n'est pas un bloc uniforme, mais qu'il existe bien différents types de mémoire. Les scientifiques ont tenté de classer ces différents types de mémoire en fonctions de leurs aspects variés (*Shallice, 1979 ; Sherry et Schachter, 1987 ; Baddeley, 1988 ; Tulving, 1995 ; Squire, 2004*). En 1992, Larry Squire établit une classification basé sur l'hypothèse que chaque processus mental repose sur une structure cérébrale clé (*Squire, 1992*). Tout d'abord, cette classification différencie la mémoire accessible à la conscience (mémoire déclarative ou explicite) de celle mettant en jeu des systèmes d'apprentissages inconscients (mémoire non déclarative ou implicite). Il en découle ensuite dans ces 2 catégories des sous-types :

Mémoire non déclarative	Mémoire déclarative
Mémoire procédurale→ concerne les habilités motrices, perceptives ou cognitives (cervelet, ganglions de la base, cortex frontal)	Mémoire épisodique→ concerne les souvenirs d'instants uniques, bien localisés dans le temps et l'espace (hippocampe)
Mémoire d'amorçage→ concerne la capacité à détecter ou identifier des mots ou des objets, peu après les avoir perçus (cortex et néocortex)	Mémoire sémantique→ concerne les connaissances générales accumulées (hippocampe, néocortex)
Conditionnement classique→ concerne l'apprentissage associatif : réponse émotionnelle (amygdale), réponse musculaire (cervelet)	
Apprentissage non-associatif→ concerne l'habituation et la sensibilisation (voies réflexes)	

Tableau 1 : Les différents types de mémoire et leurs structures cérébrales associées

Les limites de cette classification sont qu'elle ne prend pas assez en compte les interactions entre les différents systèmes, même si celle-ci reste à ce jour l'une des références les plus utilisée. De plus le modèle de Squire se base sur un traitement en série de l'épisodique au sémantique (*Knowlton et Squire, 1996*), suggérant qu'aucune connaissance sémantique n'est possible sans mémoire épisodique. Or des études sur des patients cérébro-lésés (*Vargha-Khadem et al., 1977 ; Tulving et al., 1988 ; Tulving et al., 1991 ; Rosenbaum et al., 2005*) montrent que de lourds déficits de la mémoire épisodique n'entraînent pas forcément d'altération de la mémoire sémantique. Endel Tulving proposa alors un système de classification structural dans lequel il distingue cinq systèmes de mémoire, organisés de façon hiérarchique, que ce soit en termes phylogéniques ou en termes de prépondérance au sein du système cognitif. L'encodage se ferait en série du système le plus ancien au plus récent et le stockage se ferait en parallèle. Cette classification a été nommée SPI pour ***S**erial **P**arallel **I**ndependent* **(Figure 3)**.

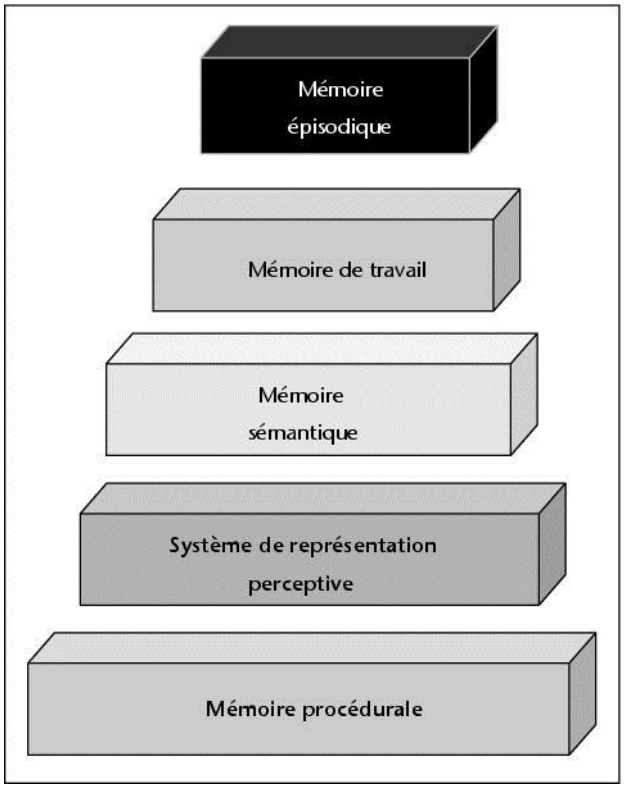


Figure 3 : Modèle SPI (*D'après Tulving.,1995 et Eustache et Desgranges.,2003*).

c. Le circuit de Papez

Le circuit de Papez (1937) (*Papez.,1995*) fut à l'origine une tentative d'explication de voies anatomiques impliquées dans les émotions. Malgré le peu de techniques disponibles à l'époque pour étudier les voies cérébrales, pratiquement toutes les voies prédites par Papez se sont avérées effectives, non pas pour décrire le cheminement des émotions mais pour expliquer les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendants (apprentissage spatial). Le sujet (animal ou humain) recueille les différentes informations provenant de son environnement afin de construire sa mémoire. Ces informations sensorielles

(tactiles et olfactives chez les rongeurs, principalement visuelles chez l'homme) entrent dans le système limbique via l'amygdale ou directement via le gyrus denté de l'hippocampe. Plus les informations seront importantes pour le sujet (émotionnellement pertinentes, fréquence élevée, de haut niveau dans une échelle de sensibilité), plus l'hippocampe sera actif en termes d'intensité et de fréquence de potentiel d'action dans son réseau neuronal. Cette activation de l'hippocampe est caractérisée par une boucle d'auto activation. Les messages nerveux sont transmis du gyrus denté aux couches CA3 et CA1 de l'hippocampe. L'influx nerveux passe alors de CA1 au cortex cingulaire qui agit comme un point de passage. En effet, il va rediriger les informations soit vers l'hippocampe afin de la réactiver et consolider ces informations soit vers les lobes frontaux afin de stocker à long terme les informations afin de garder en mémoire les données environnantes (par exemple les différents chemins d'un labyrinthe afin d'en trouver la sortie) **(Figure 4)**

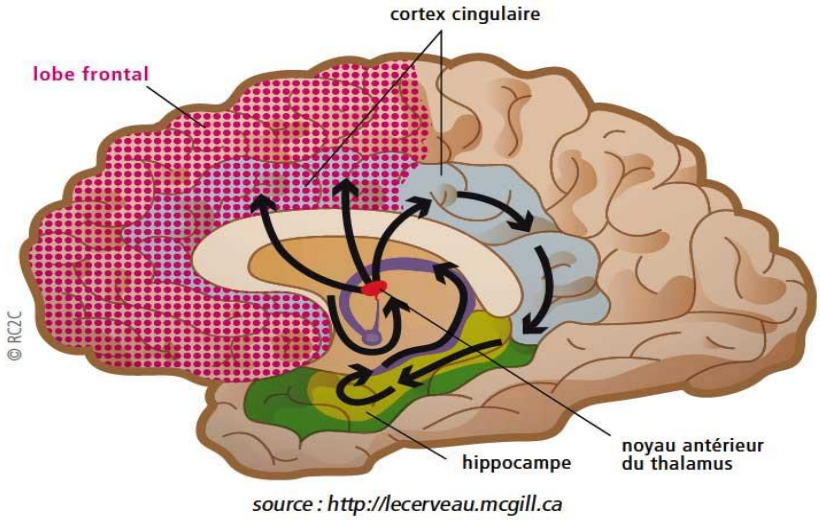


Figure 4 : Schéma du circuit de Papez (*D'après lecerveau.mcgill.ca*)

3. Développement et maturation de la formation hippocampique

a. La neurogenèse

Dans la formation hippocampique, la neurogenèse des interneurones est un processus précoce par rapport à celle des cellules glutamatergiques. En effet, les interneurones prolifèrent entre les 13ième et 19ième jours embryonnaires (E) chez le rat et précèdent la prolifération des cellules pyramidales (E17-E19) et celles des cellules granulaires du gyrus denté (E17-P16) (*Amaral et Kurz, 1985 ; Bayer, 1980 ; Lubbers et al., 1985*). Dans l'hippocampe, les interneurones ont un pic de neurogenèse à E14 et prolifèrent selon un gradient temporo-septal et latéro-médian (CA1 vers CA3). A E18, les interneurones sont regroupés en deux bandes distinctes : la zone intermédiaire profonde et la zone marginale superficielle qui donneront naissance respectivement aux strata oriens et radiatum. Les interneurones générés le plus tardivement

sont ceux situés dans le *stratum pyramidal*. Leur prolifération a lieu selon un gradient *" inside-out "* (de la zone intermédiaire vers la zone marginale) (*Soriano et al., 1989*). Les cellules pyramidales de la région CA3 se divisent plus tôt que celles de la région CA1 (E17-E18 contre E18-E19). La prolifération des cellules pyramidales s'opère selon différents gradients ; un gradient latéro-médian (de CA1 à CA3), un gradient *inside-out* et un gradient temporo-septal. L'alignement des cellules pyramidales est discernable dès E18-E19 et prolonge la plaque corticale. Au même stade du développement, la fimbria ainsi que la fissure hippocampique apparaissent. A E20-E21, le stratum pyramidal est bien différencié et s'incurve pour pénétrer dans le hile (*Bayer, 1980 ; Altman et Bayer, 1990*). Les cellules granulaires du gyrus denté sont les cellules de l'hippocampe dont la maturation est la plus tardive. En effet chez le rat, les premières cellules granulaires apparaissent pendant la période embryonnaire à E16. Leur prolifération se fait davantage après la naissance (15% des cellules granulaires produites avant la naissance contre 70% pendant les deux premières semaines de vie postnatale) (*Altman et Bayer, 1990*).

b. La synaptogenèse

Les interneurones GABAergiques présentent des caractéristiques immatures pendant la première semaine de vie postnatale comme la présence de cônes de croissance au niveau des dendrites et des axones (*Seay-Lowe et Claiborne, 1992*). Malgré cela, leurs arborisations dendritiques et axonales sont bien développées, celles-ci pouvant s'étendre dans différentes régions de l'hippocampe (*Khalilov et al., 1997 ; Seay-Lowe et Claiborne, 1992*). Au 5ième jour de vie postnatal (P5), la densité de synapses symétriques supposées inhibitrices représente 15% de la densité adulte qui est atteinte lors de la troisième semaine de vie postnatale (*Pokorny et Yamamoto, 1981*). A cet âge, les interneurones établissent des connections synaptiques sur les corps cellulaires et sur les dendrites des cellules pyramidales et granulaires. En revanche, les terminaisons synaptiques GAD-positives sont généralement petites et contiennent un faible nombre de vésicules de neurotransmetteurs (*Seress et al., 1989*). Du fait de la neurogenèse tardive des cellules granulaires et d'une période de prolifération relativement longue, on retrouve une hétérogénéité importante du degré de maturation dans cette population cellulaire pendant les deux premières semaines de vie postnatale. Dès P5, il est possible d'observer les différents stades de maturation des cellules granulaires :

1 : Apparition des varicosités le long des dendrites ;
2 : Présence de cônes de croissance à la pointe des dendrites ;
3 : Formation des dendrites basales ;
4 : Développement progressif des épines dendritiques ;

La majorité des synapses sont alors GABAergiques et sont essentiellement présentes sur le tronc dendritique (*Lubbers et Frotscher, 1988*).

Les axones des cellules granulaires en direction de la région CA3, les fibres moussues, se développent après la naissance. Ces fibres ont été mises en évidence la première fois par la coloration de Timm grâce à la présence de zinc dans ces axones. Ce marquage est faible à la naissance mais va s'étendre au cours du développement sous différents gradients. Les premiers contacts entre les fibres moussues et les dendrites encore lisses des cellules

pyramidales de CA3 se font entre P3 et P9. Les invaginations membranaires deviennent alors de plus en plus complexes avec l'âge. A P14, certaines des terminaisons ont atteint leur stade adulte, mais le nombre de terminaisons continue de s'accroitre avec l'âge, du fait de la maturation tardive des cellules granulaires et de leur axone.
A la naissance, les cellules pyramidales de CA3 ont déjà acquis leur polarité caractéristique. A P3, l'arbre dendritique est encore faiblement ramifié. Pendant les deux premières semaines de vie postnatale, la longueur dendritique et le nombre de points de connections augmente, pour atteindre un aspect morphologique proche de l'adulte vers P15 (*Fitch et al., 1989; Gaïarsa et al., 1992*). Ce type de profil développemental est comparable à celui qui est décrit pour l'arbre dendritique des cellules pyramidales de CA1 (*Pokorny et Yamamoto, 1981*). A P3, des collatérales récurrentes entre les cellules pyramidales de CA3 ainsi que des collatérales de Schaeffer contactant la région CA1 peuvent être observées (*Gaïarsa et al., 1992 ; Pokorny et Yamamoto, 1981*). Par marquage rétrograde des axones présents dans les régions CA1 et CA3, il est possible de mettre en évidence des projections commissurales CA3-CA3 et CA1-CA2 à cet âge. Par contre, les projection controlatérales de la région CA3 vers CA1 ne sont pas encore développés chez le rat nouveau-né (*Buchhalter et al., 1990*).

II. Développement postnatal du cervelet

1. Description anatomique du cervelet chez le rat

a. Structure interne

Le cervelet est une composante volumineuse de l'encéphale, impaire et médiane, située dans la fosse postérieure du crâne dont elle occupe l'espace compris entre le pôle occipital du cerveau et le tronc cérébral. Il joue un rôle dans le contrôle de la posture, de l'équilibre, dans la coordination fine des mouvements, dans l'adaptation des réponses oculaires et dans l'apprentissage de certains comportements conditionnés.
Deux grandes structures composent le cervelet : le cortex cérébelleux et la substance blanche cérébelleuse.
Le cortex cérébelleux est une structure laminaire qui comporte trois couches bien distinctes :
- la couche moléculaire qui contient les arborisations dendritiques des cellules de Purkinje, les axones des cellules olivaires ou fibres grimpantes, les axones des cellules granulaires ou fibres parallèles ainsi que des interneurones (cellules étoilées et cellules en corbeille) ;
- la couche des cellules de Purkinje contenant les corps cellulaires des cellules de Purkinje **(Figure 5)** répartis en une seule assise. La cellule de Purkinje est une cellule GABAergique particulière car elle est l'élément central du réseau synaptique cortical cérébelleux (*Purkinje, 1837*). En effet, les interneurones de la couche moléculaire, cellules étoilées et en corbeille, ainsi que les cellules des grains de la couche granulaire interne se projettent majoritairement sur les cellules de Purkinje.

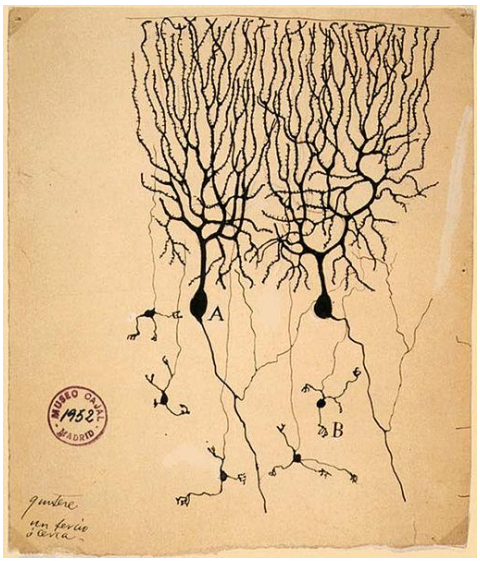


Figure 5: Dessin de cellules de Purkinje (A) et de cellules granulaires (B) à partir d'un cervelet de pigeon (*D'après Santiago Ramón y Cajal, 1899*)

- la couche granulaire dont les éléments dominants sont les cellules des grains, très nombreuses et de petites tailles. Les axones de ces cellules remontent dans la couche moléculaire et se divisent en « T » formant de longues branches, les fibres parallèles, qui suivent l'axe longitudinal du folium. La couche granulaire contient également les cellules de Golgi localisées au voisinage des somas des cellules de Purkinje. Les dendrites ascendantes reçoivent des contacts des fibres parallèles, alors que les dendrites descendantes reçoivent des contacts des fibres moussues. Leur axone est très ramifié et forme des contacts complexes avec les axones des cellules granulaires dans des formations particulières appelées glomérules. **(Figure 6)**

En dessous de ces trois couches s'étend la substance blanche cérébelleuse. Dans cette substance blanche se trouvent les noyaux profonds. Elle forme le centre médullaire du cervelet et constitue le lieu de passage des différentes fibres (afférentes, moussues, grimpantes et efférentes). En d'autre terme, la substance blanche est le lieu de jonction des axones des cellules de Purkinje (*Cajal, 1911 ; Palay et Chan-Palay, 1974 ; Ito, 1984*). L'ensemble de ces axones constitue des fibres d'association et des fibres de projection :
- les fibres d'association unissent deux territoires d'une même moitié de l'écorce ou bien relient l'écorce aux noyaux profonds du cervelet (axones des cellules de Purkinje)
- les fibres de projection unissent le cervelet aux organes voisins (moelle, cerveau, tronc cérébral). Les fibres efférentes proviennent des noyaux gris cérébelleux (eux-mêmes reliés à l'écorce) et empruntent les 3 paires de pédoncules cérébelleux inférieurs ou supérieurs. Les fibres afférentes arrivent au cervelet par les six pédoncules.

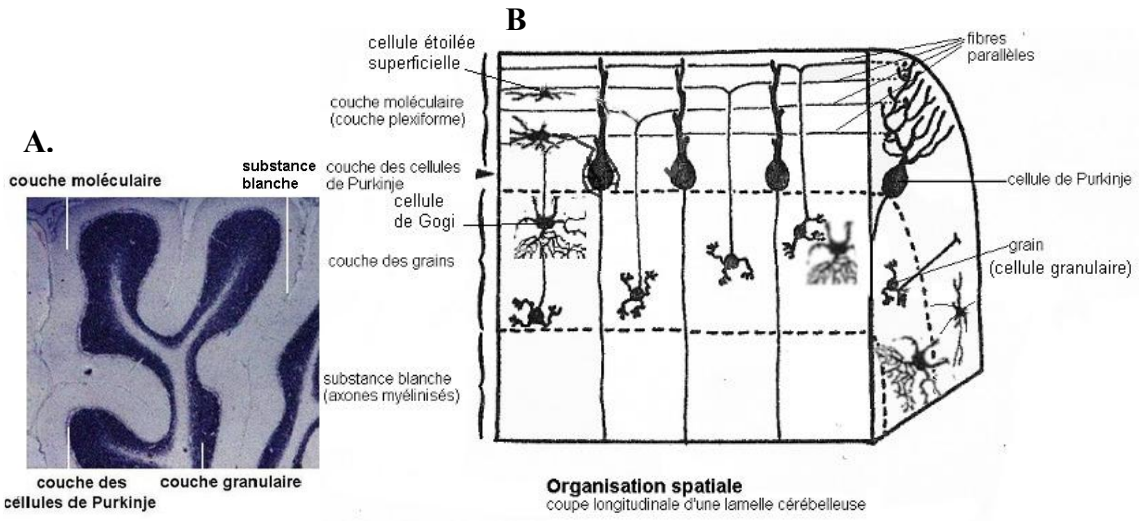


Figure 6 : Structure du cervelet **A**. Coupe longitudinale de cervelet chez le rat. **B**. Représentation de l'organisation spatiale à partir d'une coupe longitudinale d'une lamelle cérébelleuse (*D'après Ouahioune ; site : www.inrp.fr*)

b. Connectivité interne

Le cortex cérébelleux est une structure hautement répétitive constituée au niveau microscopique par un grand nombre de répétitions du même circuit élémentaire qui a été analysé en détail sur le plan anatomique depuis les premiers travaux de Cajal en 1911 et sur le plan microphysiologique depuis la description de Eccles et ses collaborateurs (*Eccles et al., 1967b*). Ce circuit est organisé autour de la cellule de Purkinje dont l'axone se projette sur les noyaux profonds du cervelet et/ou sur le noyau vestibulaire latéral (*Palay et Chan-Palay, 1972*) qui, ensuite les transmettent vers la moelle épinière (tonus) ou le cortex via le thalamus (motricité).

Il existe essentiellement trois systèmes afférents qui sont principalement excitateurs :

- les fibres grimpantes qui sont les axones des cellules de l'olive bulbaire controlatérale (*Eccles et al., 1967a ; Desclin, 1974 ; Palay et Chan-Palay, 1974 ; Batini et al., 1976*) et se terminent directement sur les cellules de Purkinje par des synapses excitatrices. Chez l'adulte, une fibre grimpante se connecte à une seule cellule de Purkinje ;
- les fibres moussues dont l'origine est multiple, noyaux vestibulaires, moelle épinière, substance réticulée du pont, etc... Ces fibres établissent des contacts synaptiques excitateurs avec les dendrites des cellules granulaires dont les axones, ou fibres parallèles, font de très nombreuses synapses excitatrices sur les dendrites des cellules de Purkinje. La plupart de ces fibres sont glutamatergiques mais celles qui sont issues des noyaux profonds sont GABAergiques et donc inhibitrices ; **(Figure 7)**
- les fibres monoaminergiques, issues du locus cœruleus (*Ito, 1984 ; Grzanna et al., 1989*), se distribuent dans la substance blanche, la couche granulaire et ont une orientation dans la couche moléculaire qui est apparentée à celle des fibres parallèles (*Mugnaini et Dahl, 1975*). Les fibres noradrénergiques ont des contacts synaptiques avec quelques épines dendritiques des cellules de Purkinje dans la couche moléculaire alors qu'elles sont localisées

à proximité des dendrites des cellules granulaires (*Kimoto et al., 1981*) où la libération de noradrénaline se ferait de nature non-jonctionnelle (*Abbott et Sotelo, 2000*). L'autre composante de ce type de fibres est de nature sérotoninergique. Ces fibres sont issues du raphé et vont s'étendre dans les noyaux profonds ainsi que dans les couches moléculaire et granulaire, particulièrement sous la surface piale (*Takeuchi et al., 1982*). Les fibres monoaminergiques ont essentiellement une action modulatrice en régulant la transmission synaptique entre les interneurones corticaux et les cellules de Purkinje.

Il existe également des interneurones inhibiteurs :
- cellules de Golgi qui reçoivent des afférences excitatrices des fibres moussues et des fibres parallèles et qui vont inhiber les cellules des grains ;
- cellules en panier et cellules étoilées qui reçoivent des afférences excitatrices des fibres parallèles et vont inhiber respectivement le segment initial de l'axone et les dendrites des cellules de Purkinje

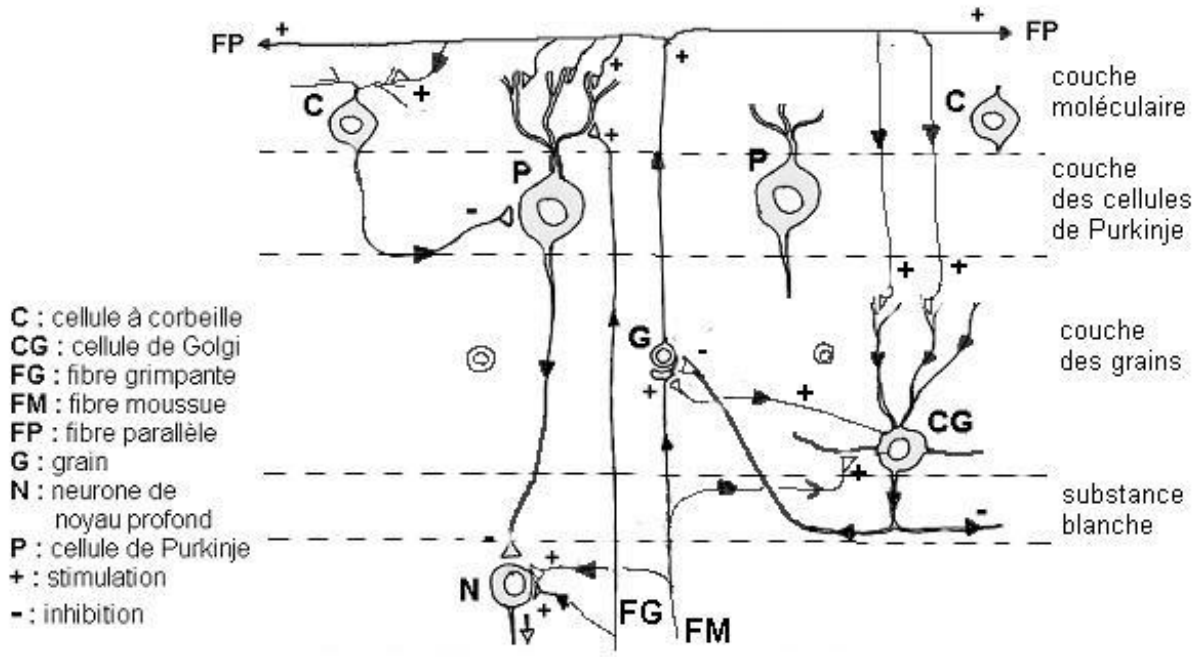


Figure 7: Schéma fonctionnel des connexions cérébelleuses (*D'après Ouahioune ; site : www.inrp.fr*)

2. Développement et maturation du cervelet : focus sur la cellule de Purkinje

Par rapport aux autres structures cérébrales, le cervelet a un profil de développement plus long, avec une forte composante postnatale. Chez l'homme, le développement du cervelet (et en particulier la prolifération des futures cellules granulaires) commence dans le dernier trimestre de la grossesse et se poursuit au cours de la première année de vie (*Dobbing et Sands, 1973*). Chez les rongeurs, le cortex cérébelleux se développe presque totalement pendant les 3 premières semaines postnatales (*Altman et Bayer, 1997*). Les cellules du cervelet proviennent de deux matrices germinales différentes : l'épithélium ventriculaire et les lèvres rhombiques du métencéphale (*Goldowitz et Hamre, 1998*). Les noyaux cérébelleux profonds, les cellules de Purkinje, les cellules de Golgi, étoilées et les cellules en panier

proviennent tous du neuroépithélium ventriculaire. Chez le rat, les premières cellules à quitter la zone ventriculaire sont les noyaux profonds du cervelet et les noyaux vestibulaires à environ E10-12. Les précurseurs des cellules de Purkinje naissent autour d'E13. Peu de temps après leur mitose finale, ils migrent au cours d'E14-17 le long des fibres gliales radiaires au cours de la formation des noyaux cérébelleux profonds dans l'ébauche du cervelet. De plus, les cellules de Purkinje commencent à exprimer la protéine de liaison au calcium, la calbindine, un marqueur classique de ces cellules. La formation d'une seconde matrice germinale issue des lèvres rhombiques, la couche granulaire externe, se produit au moment où les cellules de Purkinje ont cessé de se diviser. Durant la période postnatale chez le rat, les cellules de la couche granulaire externe envahissent la couche granulaire interne. De plus, les cellules étoilées et en panier générées à ce stade colonisent la couche moléculaire.

Chez le rat toujours, les comportements cérébelleux-dépendants sont globalement absents au moment de la naissance (*Altman et Bayer, 1997*). C'est seulement à partir de la quatrième semaine postnatale que se met en place l'expression de comportements posturaux, moteurs, oculaires et d'apprentissages. Le développement du cortex cérébelleux chez les animaux continue après la naissance, en parallèle avec le développement moteur (*Swinny et al., 2005*). Pendant la première semaine postnatale, les cellules de Purkinje se réorganisent à partir des multicouches désordonnées en une monocouche caractéristique de ces cellules avec leur région apicale orientée vers la surface piale. Chez le rat, 25-80% des cellules granulaires migrent vers la couche granulaire interne vers les deuxième et troisième semaines postnatales (*Altman, 1969*). Au cours de cette migration, les axones des cellules granulaires, les fibres parallèles, s'étendent transversalement (*Rakic, 1971*) et forment des connexions synaptiques excitatrices stables avec les épines dendritiques des cellules de Purkinje dans la couche moléculaire externe dès la deuxième semaine après la naissance jusqu'à la fin du processus migratoire (*Altman, 1972a, b, c*). De plus, il a été montré que ces différentes étapes de la maturation se poursuivaient au-delà de 30 jours postnatals (*Altman, 1972b*), tandis que les fibres parallèles continuent leur croissance jusqu'à 90 jours (*Lauder, 1979*). Outre les observations de la mise en place du cortex cérébelleux, quelques études se sont spécifiquement intéressées aux cellules de Purkinje qui est le type cellulaire le plus important dans le cervelet. À ce titre, 3 stades de développement morphologique postnatal ont été identifiés (*McKay et Turner., 2005*) :

- une période de croissance rapide somatique de P0 à P9 caractérisée par une augmentation des corps cellulaires jusqu'à P9 et un faible développement dendritique ;
- une période de croissance dendritique rapide entre P9 et P18, également caractérisée par une hétérogénéité de la morphologie cellulaire ;
- une période de croissance dendritique lente à partir de P18 jusqu'à l'âge adulte, caractérisée par une lente maturation de la longueur de ces prolongements **(Figure 8)**.

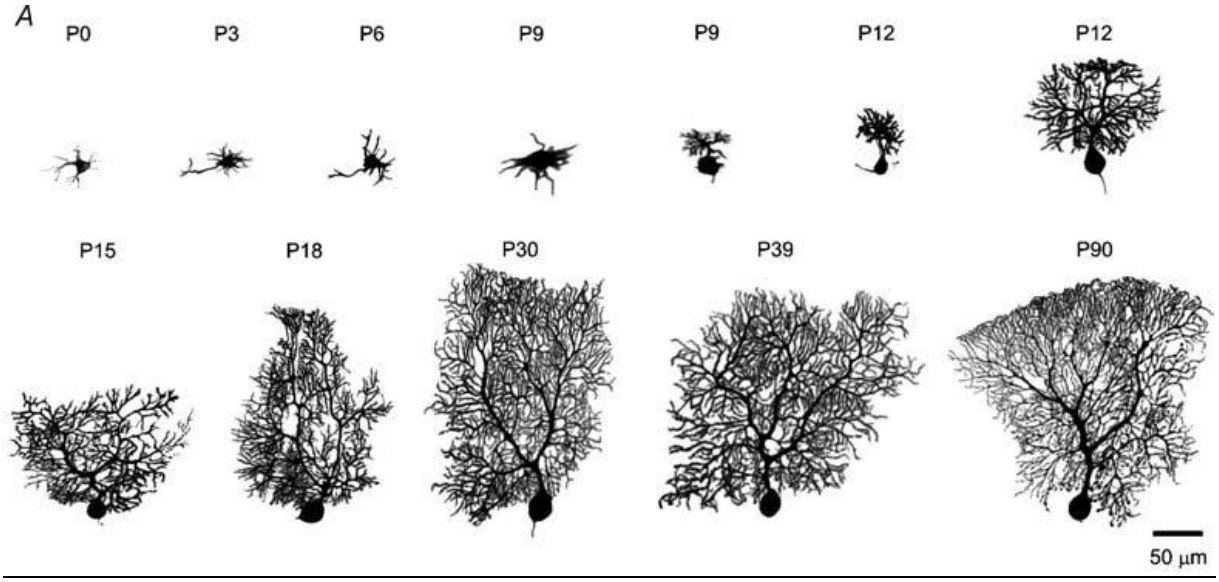


Figure 8 : Maturation des cellules de Purkinje dans le cervelet du rat. Il est à noter la grande hétérogénéité de la morphologie de ces cellules à P9 et P12, stades auxquels deux exemples sont illustrés (coloration neurobiotine). (*D'après McKay et Turner, 2005*)

3. Développement postnatal du rat

À la naissance, les rats sont aveugles, sourds et dépourvus de poils ; ils dépendent de leur mère pour toutes les fonctions vitales (nutrition et thermorégulation). Vers le troisième jour post-natal (P3), ils commencent à se mouvoir, mais ils se déplacent très difficilement en rampant et tournent le plus souvent en rond. Peu avant 10 jours après la naissance, le rat est capable de se tenir à quatre pattes mais présente encore des mouvements non coordonnés (*Geisler et al., 1996*). Vers P10, les oreilles se décollent, un léger duvet apparaît. Au terme de la deuxième semaine post-natale, les oreilles (méats auditifs) et les yeux s'ouvrent et vers P15-16, le rat est capable de tenir debout sur ses pattes arrières et de se déplacer de façon coordonnée (*Geisler et al., 1993*). Cette période correspond à la formation des connexions synaptiques entre les fibres grimpantes et les épines dendritiques des cellules de Purkinje. Les ratons sont beaucoup plus vifs, explorent leur environnement et commencent à goûter à la nourriture que prend la mère. Mais ils restent dépendant du lait maternel jusqu'au sevrage (P21).

III. Vieillissement cérébral

1. Aspects généraux cérébraux

Le vieillissement cérébral peut se caractériser tout d'abord d'un point de vue morphométrique. En effet, il a été démontré que le cerveau des personnes âgées présentait un élargissement progressif de la taille des ventricules (*Anderton, 1997*) ainsi qu'une atrophie corticale caractérisée par la perte de substance grise corticale (*Brody, 1955*). Ces deux phénomènes participeraient à la réduction du poids du cerveau lors du vieillissement (*Anderton, 2002*). Parallèlement à ce phénomène, on observe une diminution de la taille des

neurones chez les sujets âgés. Les dendrites qui sont essentiels dans le maintien des connexions subissent quelquefois des modifications dégénératives avec dans certains cas une perte des épines dendritiques où sont situées de nombreuses synapses ainsi qu'un changement de forme des dendrites elles-mêmes. Ces altérations perturberaient l'efficacité de la neurotransmission.
Il a été rapporté également une augmentation du nombre de cellules gliales afin de compenser la perte neuronale (*Pakkenberg et al., 2003*) et une diminution significative du diamètre des microvaisseaux cérébraux en lien avec l'accumulation de collagène de type IV dans la lame basale (*Uspenskaia et al., 2004*). De plus, on retrouve lors du vieillissement normal, la formation de plaques séniles (substance amorphe amyloïde), particulièrement au niveau du cortex et de l'hippocampe (*Anderton, 2002*), une accumulation de pigments tels que la lipofuscine et la neuromélanine (*Mann et Yates, 1979*), ainsi que l'augmentation de la dégénérescence granulo-vacuolaire (*Xu et al., 1992*) et du nombre de corps d'Hirano (*Tomonaga et al., 1975*). Enfin, le vieillissement cérébral s'accompagne de modifications des systèmes de neurotransmission au niveau des synapses. En effet, des études ont montré une diminution linéaire de la concentration de choline acétyltransférase avec l'âge, enzyme de synthèse de l'acétylcholine, notamment dans l'hippocampe et dans le cortex fronto-temporal (*Muller et al., 1991*). D'un point vu fonctionnel, le vieillissement physiologique entraîne le plus souvent une diminution des performances intellectuelles (*Gély-Nargeot et al., 2000*), notamment dans les processus linguistiques (apparition d'aphasie mixte) et attentionnels, alors qu'au niveau moteur, on observe des troubles de la marche et de l'équilibre en relation, entre autres, avec des atteintes cérébelleuses et du système nerveux périphérique. Le vieillissement modifie donc plusieurs aspects du comportement. Les effets du vieillissement sont complexes et de nombreuses études se sont focalisées sur l'évolution de deux structures importantes : l'hippocampe et le cervelet.

2. Vieillissement hippocampique

a. Aspects cellulaires

De nombreuses études ont rapporté une perte cellulaire en lien avec le vieillissement, au niveau de l'hippocampe (*Coleman et Flood, 1987*). Or, l'amélioration des techniques et les approches stéréologiques ont révélé que la perte neuronale, même si elle est présente, demeure très limitée et que de nombreuses régions, parmi lesquelles l'hippocampe, ne présentent qu'une faible diminution de leur population (*Rapp et Gallagher, 1996 ; Rasmussen et al., 1996 ; Burke et Barnes.,2006*). Au final, ces observations ne pouvant rendre compte des difficultés cognitives rencontrées chez le sujet âgé, certains auteurs ont proposé la survenue de modifications dans les ramifications dendritiques des cellules des différentes structures hippocampiques (*Applegate et al., 1984 ; McWilliams et Lynch, 1984 ; Bertoni-Freddari, 1986*). Les données montrent que ce type d'altération est spécifique de certaines régions et ne semble pas concerner de façon significative les arborescences dendritiques dans l'hippocampe (*Flood.,1993 ; Pyapali et Turner 1996*). Toutefois, ces hypothèses semblent également discutées car, selon les méthodes utilisées pour le comptage de synapses actives

(immunodétection ou mesure des potentiels postsynaptiques excitateurs), les résultats diffèrent (*Barnes et McNaughton, 1980 ; Nicolle et al., 1999 ; Smith et al., 2000 ; Geinisman et al., 2004 ; Nicholson et al., 2004*).

D'un point de vue électrophysiologique, la plupart des caractéristiques neuro-électriques (potentiel membranaire de repos, rhéobase…) basiques des cellules de l'hippocampe ne varie pas avec l'âge (*Niesen et al., 1988 ; Turner et Deupree, 1991 ;Potier et al., 1992*). Néanmoins, il a été relevé une augmentation du nombre de canaux calcique de Type L entraînant une perturbation de l'homéostasie calcique caractérisée par une forte entrée de calcium dans les cellules (*Landfield, 1987 ; Landfield, 1988 ;Foster et Norris, 1997*). Cela a pour conséquence un dérèglement des courants potassiques accroissant ainsi l'amplitude d'hyperpolarisation des cellules des régions CA1 et CA3 (*Foster et Norris, 1997 ; Kelly et al., 2006*), phénomène qui rendraient les neurones pyramidaux des animaux âgés moins excitables que précédemment. Toutefois, si cette hypothèse paraît intéressante, les données ont été obtenues in vitro et n'ont pas été confirmées chez des sujets vigiles où les taux de décharge ne semblent pas varier en fonction de l'âge (*Smith et al., 2000 ; Oler et Markus, 2000*).

Concernant la plasticité synaptique, de nombreuses études se sont intéressées aux phénomènes de potentialisation à long terme (PLT) et de dépression à long terme (DLT) chez le sujet âgé. PLT et DLT sont reconnues comme bases moléculaires de l'apprentissage et de la mémoire. Décrite pour la première fois dans l'hippocampe en 1973 par Bliss et Lomo, puis ensuite dans d'autres structures cérébrales, la PLT permet le renforcement durable des synapses entre deux neurones suite à certains types de stimulation à haute fréquence (potentiel postsynaptique excitateur) via les récepteurs glutamatergiques (AMPA et NMDA). Au contraire la DLT, décrite pour la première fois dans le cervelet (*Ito, 1986*), est un mécanisme permettant de ramener les synapses potentialisées par la PLT dans l'hippocampe à un niveau normal pour les rendre disponible au stockage de nouvelles informations par des niveaux de stimulation à faible fréquence.

L'efficacité synaptique de la PLT décroît plus rapidement chez le sujet vieillissant que chez le jeune adulte (*Barnes et al., 2000*). Selon les auteurs, ceci pourrait expliquer un oubli plus rapide chez le sujet âgé, par exemple lors d'un apprentissage spatial (*Barnes et al., 1987*). De même, s'il est pratiqué un stimulus liminaire chez le rat sénescent, il n'y a aura pas de PLT hippocampique (*Barnes et al., 2000*), reflétant la difficulté d'induction de ce processus. L'explication viendrait du fait que le nombre de récepteurs NMDA décroît chez les rats âgés, engendrant une difficulté à établir alors une PLT chez ces animaux (*Burke et Barnes, 2006*). Quant à la dépression à long terme, son induction semble facilitée au cours du vieillissement (*Rosenzweig et Barnes, 2003*). Ainsi, chez le sujet sénescent, la PLT, qui serait impliquée dans le stockage de nouvelles informations, serait déficiente, alors que la DLT, qui traduirait les phénomènes de pertes d'informations, serait renforcée.

Si les modifications liées à l'âge s'avèrent relativement faibles au niveau cellulaire, l'impact du vieillissement suscite de profonds changements au niveau des relations interneuronales et des interactions entre les différentes régions cérébrales. L'hypothèse actuelle pour expliquer les altérations cognitives liées au vieillissement prône la dégradation de la voie perforante, conduisant à une diminution des messages afférents vers l'hippocampe couplée à une diminution du nombre de synapses actives, ce qui limiterait le traitement des informations et

donc la production de messages efférents. Malgré la diminution du nombre de connexions synaptiques, ceci n'aurait aucune influence sur le taux de décharge des neurones pyramidaux car il existerait un mécanisme compensatoire au niveau des synapses encore actives (*Burke et Barnes.,2006*). En effet, ces synapses recruteraient davantage de récepteurs glutamatergiques AMPA afin de maintenir une transmission efficace de l'information nerveuse (*Barnes et McNaughton.,1980*).

b. Aspects fonctionnels du vieillissement hippocampique

Le vieillissement, même non pathologique, s'accompagne d'un déclin des fonctions cognitives (d'apprentissage et de rappel par exemple). Mais toutes les formes de mémoire ne sont pas forcément altérées. Ainsi chez l'Homme, hormis les déficits lié au langage et à l'attention, ce sont surtout la mémoire à court terme (minutes, heures) et la mémoire épisodique dont le centre est l'hippocampe qui sont altérées, alors que les mémoires immédiate (secondes), procédurale (habitude) et sémantique (informations générales) qui utilisent les ganglions de la base ne semblent pas être modifiées.
De même, les rats âgés sont autant capables que les jeunes d'apprendre et de mémoriser les tâches faisant appel à la mémoire procédurale (*Miyagawa et al., 1998 ; Churchill et al., 2003*). Les perturbations touchent plus particulièrement la mémoire spatiale qui est un processus hippocampo-dépendant et qui est une bonne illustration des altérations que subit cette structure chez les individus âgés (*Rosenzweig et Barnes, 2003 ; Burke et Barnes, 2006*). Les rats sénescents éprouvent des difficultés aussi bien lors de l'apprentissage que du rappel (*Barnes et McNaughton, 1985; Markowska et al., 1989*).Ces données ont été confirmées dans différents tests comportementaux faisant référence à ce type de mémoire :
- le labyrinthe circulaire de Barnes (*Barnes, 1979*) qui consiste à placer le rat sur une plateforme circulaire composée de 18 trous mais dont un seul possède un tunnel afin de s'échapper. Les rats âges ont montré des difficultés d'apprentissage et de mémorisation quant à l'emplacement du tunnel et à l'apprentissage d'un nouvel emplacement (*Barnes and McNaughton., 1985 ; Bach et al., 1999*).
- le labyrinthe multi-T qui a montré que les rats âgés avaient beaucoup plus de difficultés à localiser la branche où était placée la récompense en utilisant des repères spatiaux (*Barnes et al., 1980*)
- le labyrinthe radial à 8 branches (*Potegal, 1969 ; Olton et Samuelson, 1976*) où les rats âgés se sont montrés également beaucoup moins performants (*Barnes et al., 1980 ; Beatty et al., 1987 ; Caprioli et al., 1991., Mizumori et al., 1996*). Lorsqu'était utilisé un repère tactile et non spatial, les vieux rats ne présentaient pas de déficit dans leur performance mnésique, illustrant par là une perturbation de leur mémoire spatiale (*Barnes et al., 1987*).
- la piscine de Morris (*Morris, 1981*) qui a révélé des difficultés d'apprentissage chez les rats sénescents (*Gage et al., 1984 ; Rosenzweig et al., 1997 ; Shen et al., 1997*), mais pas dans les processus de rappel mnésique (*Barnes et al., 1997*).
Toutes ces données montrent une altération sévère de la mémoire spatiale au cours du vieillissement, contribuant à étayer l'hypothèse d'un dysfonctionnement de la structure hippocampique.

3. Vieillissement du cervelet

a. Aspects cellulaires: focus sur la cellule de Purkinje

Les cellules de Purkinje sont considérées comme le type de neurones le plus vulnérable dans le cerveau (*Patrick et Anderson, 2000 ; Servais et al., 2007 ; Woodruff-Pak et al., 2010*) et sont très sensibles aux effets du vieillissement (*Quackenbush et al., 1990 ; Andersen et al., 2003;. Zhang et al., 2006*). Comme pour l'hippocampe, l'effet du vieillissement sur la perte cellulaire est encore en discussion car les études qui ont voulu répondre à cette question sont contradictoires. En effet, certains éléments ont été rapportés en faveur d'une diminution notable du nombre de cellules de Purkinje (*Ogata et al., 1984 ; Pires et al., 2010; Woodruff-Pak, 2006 ;Woodruff-Pak et al., 2010*), étayée par la diminution de certains facteurs comme la neuroglobine (Sun et al.,2005) ou du nombre d'interactions avec des neurones cibles (*Huang et al., 1999*). A l'inverse, d'autres travaux ne montrent aucune diminution (*Drüge et al., 1986 ; Bakalian et al., 1991*) ou présente uniquement dans des zones précises du cervelet (*Andersen et al., 2003*). Toutefois, ces hypothèses semblent également discutées car selon les méthodes utilisées pour le comptage des cellules (stéréologie, examen visuel..), les zones du cervelet choisies, le mode de préparation des tissus, les résultats varient. Un autre point mis en évidence, et qui ne semble pas être discuté, est que le vieillissement entraînerait une atrophie des cellules de Purkinje (*Ogata et al., 1984 ; Andersen et al., 2003*). Cette diminution de la taille des cellules serait liée à une baisse des éléments nucléés (*Ogata et al., 1984*), à une dégénérescence d'autres organites (*Monteiro, 1991*), suggérant un déclin significatif de la synthèse de certaines substances et des dysfonctionnements trophiques. Les organites touchés sont préférentiellement les mitochondries (*Fattoretti et al., 1996 ; Fattoretti et al., 1998*) à l'origine d'une réduction du métabolisme énergétique (*Atamna, 2004*), le réticulum endoplasmique lisse perturbant l'homéostasie calcique (*Dlugos, 2005*), et l'appareil de Golgi (*Monteiro, 1991 ; Nosal, 1979*).

Au niveau dendritique, le vieillissement entraîne une atrophie de l'arborisation dendritique (*Quackenbush et al., 1990 ; Zhang et al., 2006*). En effet, il a été relevé une diminution de la longueur et de la largeur des dendrites des cellules de Purkinje (*Hadj-Sahraoui et al., 2001*) ainsi que des aberrations dans leurs cytoarchitecture (*Chen et Hillman, 1999*). Fonctionnellement, on retrouve une diminution de l'apport d'informations afférentes en direction des cellules de Purkinje illustré notamment par la perte de l'arborisation dendritique (*Rogers et al., 1984 ; Quackenbush et al., 1990*). Les causes de la perte de dendrites liée à l'âge restent encore incertaines mais plusieurs travaux rapportent une réduction des connexions synaptiques entre les cellules de Purkinje et les fibres parallèles (*Dlugos et Pentney, 1994 ; Huang et al., 1999 ; Huang et al., 2006*) et une diminution de l'apport de molécules trophiques comme l'IGF1 ou le BDNF (*Markowska et al., 1998 ; Erickson et al., 2010*). Outre l'altération de la fluidité de la bicouche lipidique des membranes synaptiques liée à l'âge (Ohyama et al., 1995), la réduction des connexions synaptiques avec les fibres parallèles s'expliquerait par une diminution des fibres parallèles elles-mêmes (Huang et al., 1999) et/ou par une diminution des cellules de la couche granulaire (*Pentney et al., 2002 ; Zhang et al., 2006*).

D'un point de vue neurochimique, il a été également montré que la concentration de la plupart des neurotransmetteurs et la capacité de réponse à ces derniers diminuaient lors de la sénescence cérébrale (*Bickford-Wimer et al., 1988 ; Bickford, 1993*). C'est notamment le cas de la noradrénaline, dont l'action neuromodulatrice sur les cellules de Purkinje est perturbée par le vieillissement. En effet, la noradrénaline agit dans le cortex cérébelleux en amplifiant l'action du GABA des cellules de Purkinje (*Bickford, 1993*) et, par conséquent, une diminution liée à l'âge de la concentration en noradrénaline entraîne une atténuation de l'effet inhibiteur du GABA. Enfin, il a été rapporté des changements électrophysiologiques liés à l'âge (*Rogers et al., 1981; Chung et al., 2003a*), notamment des altérations du seuil d'activation des cellules de Purkinje ainsi qu'une élévation du seuil d'inhibition (*Rogers et al., 1981*). Les causes évoquées sont diverses, comme la diminution de la réponse des récepteurs postsynaptiques (*Hoffer, 1988*), la diminution de la sensibilité aux neurotransmetteurs (*Marwaha et al.,1980*) et des déficits fonctionnels au niveau de nombreux canaux ioniques (*Chung et al., 2001a et b, Chung et al., 2003*).

b. Aspects fonctionnels du vieillissement cérébelleux

Les troubles affectant les cellules de Purkinje vont directement générer des dysfonctionnements cérébelleux dans diverses situations, qui ont été rapportés notamment dans des études portant sur les souris mutantes Lurcher (Grid2 +/- : *Glutamate receptor ionotropic delta 2*), Staggerer (Ror α -/- ou +/- : *RAR-related orphan receptor alpha*) ou Reeler (Reelin -/-) (*Sidman, 1962 ; Rakic et Sidman, 1973 ; Mariani et al., 1977 ; Hilber et Caston, 2001 ; Caston et al., 2003 ; Porras-al García et al., 2005 ; Porras-al García et al., 2010*). Ces animaux sont caractérisés par une apoptose prématurée et aberrante au niveau du cervelet, affectant essentiellement les cellules de Purkinje et les cellules granulaires. Ces observations en font un bon modèle de neurodégénérescence progressive cérébelleuse au cours du vieillissement (*Hilber et Caston, 2001*). Les données sur les souris Lurcher rapportent des déficits au niveau de l'apprentissage moteur et de la motricité (*Hilber et Caston, 2001*)

IV. Facteurs influençant le vieillissement cérébral

1. Stress oxydant

a. Altérations mitochondriales

Un des symptômes moléculaires prédominants du vieillissement correspond à l'accumulation de produits de gènes altérés. Le cerveau possède une grand potentiel d'oxydation mais une capacité limitée pour lutter contre le stress oxydant (*Calabrese et al., 2003 ; Poon et al., 2004a*). Dans la cellule, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont physiologiquement présentes à faible concentration en tant que sous-produits du métabolisme aérobie ainsi que sous forme de seconds messagers dans de nombreuses voies de transduction cellulaire. Dans les conditions normales, il existe un équilibre entre les pro-oxydants et les anti-oxydants nécessaires pour assurer une efficacité optimale des défenses (*Forman et al., 2004 ; Poon et*

al., 2004b ; Calabrese et al., 2004). Toutefois, lorsque le taux de production de radicaux libres dépasse les capacités de défenses anti-oxydantes, il se produit un stress oxydant entraînant différents dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (*Halliwell., 2002 ; Martindale et Holbrook, 2002 ; Bergamini et al., 2004*). Dans le système nerveux central, les cellules sont capables de lutter contre le stress oxydant grâce à de nombreuses ressources y compris des vitamines (A,C et E), des molécules bioactives (glutathion, thioredoxine, flavonoïdes), l'acide lipoïque, des enzymes (protéine de choc thermique-32, superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase, thiorédoxine réductase…), des facteurs de transcriptions sensibles au changement redox (AP-1,NF-κB,Nrf2, HSF…). Durant la sénescence du cerveau ainsi que dans le cas de plusieurs maladies neurodégénératives, il y a un déclin des mécanismes de défense anti-oxydante entraînant une augmentation de la vulnérabilité du cerveau aux effets délétères du stress oxydant (*Finkel et Holbrook, 2000*). Par exemple, les enzymes anti-oxydantes telles que les SOD, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase affichent une diminution de leur activité dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*Zemlan et al., 1989 ; Pappolla et al., 1992*). Les données montrent que les radicaux libres d'origine mitochondriale sont parmi les principaux responsables des dommages causés à l'ADN mitochondrial (ADNmt). Plusieurs études ont montré des niveaux accrus d'un biomarqueur reflétant les dommages oxydatifs de l'ADN, le 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), dans les ADNmt de cerveau âgé (*Richter et al., 1988 ; Agarwal et Sohal, 1994*). Des niveaux élevés de ce marqueur ont été également retrouvés au niveau de l'ADN nucléaire (ADNn) dans les cerveaux post-mortem de sujets âgés (*Mecocci et al., 1993*). Mais il semblerait que l'augmentation des dommages oxydatifs liés à l'âge soient plus de 10 fois supérieur au niveau de l'ADNmt que de l'ADNn, que ce soit chez l'homme ou le rongeur (*Richter et al., 1988 ; Ames et al., 1993 ; Agarwal et Sohal, 1994*). Cette plus grande sensibilité de l'ADNmt aux dommages oxydatifs viendrait de l'absence d'un mécanisme de réparation et de protection par les histones et du fait que l'ADNmt est situé à proximité de la membrane mitochondriale interne où les ERO sont générées (*Mecocci et al., 1993 ; Barja., 2004*). L'ADN mitochondrial possède un taux de mutation très élevé, et quand une mutation se produit, les cellules contiennent une combinaison d'ADNmt de type sauvage et mutant. Lors des divisions cellulaires, les deux types d'ADNmt sont répartis de façon aléatoire dans les cellules « filles ». Au fil des générations, l'ADNmt d'une lignée cellulaire peut devenir essentiellement sauvage ou muté. Si le pourcentage d'ADNmt muté augmente, cela a pour conséquence une diminution des capacités énergétiques de la cellule jusqu'à atteindre le seuil bioénergétique, c'est-à-dire en dessous de la production d'énergie minimale nécessaire au bon fonctionnement d'une cellule ou du tissu (*Shigenaga et Ames, 1991 ; Yoneda et al., 1995*). De nombreuses études ont montré que les mutations induites par des dommages oxydatifs sur l'ADNmt s'accumulent avec l'âge dans les tissus dits « post-mitotiques » comme le cerveau (*Chomyn et Attardi., 2003 ; Kraytsberg et al., 2003 ; Trifunovic et al., 2004*). Ainsi, l'accumulation de l'oxydation de l'ADN est un des facteurs responsables du déclin fonctionnel du cerveau sénescent, phénomène qui touche également les lipides et les protéines

b. Dommages lipidiques et oxydation protéique

Le vieillissement est également accompagné de changements de la composition des acides gras des membranes comprenant une augmentation des acides gras monoinsaturés (AGMI) et une diminution des acides gras polyinsaturés (AGPI). Les AGPI, tels que l'acide arachidonique (AA) sont abondants lors du vieillissement cérébral mais sont très sensibles aux attaques des radicaux libres. Ainsi, une corrélation a été démontrée entre la concentration d'AA et la potentialisation à long terme (*Lynch, 1998 ; Ulmann et al., 2001*). Les niveaux d'AA sont diminués dans l'hippocampe de rats âgés, ce qui est associé à une difficulté de maintenir une potentialisation à long terme suffisante. Les dommages oxydatifs peuvent être causés indirectement par la production d'aldéhydes très réactifs. En effet, la peroxydation des AA en malondialdéhyde (MDA) induit des dommages à l'ADN en perturbant l'appariement des bases. Ce composé aldéhyde est retrouvé à des taux élevés dans le cortex temporal inférieur du cerveau de sujets âgées (*Dei et al., 2002*) ainsi que dans l'hippocampe et le cervelet de vieux rongeurs (*Cini et Moretti., 1995 ; Gemma et al., 2002*). Un autre phénomène est observé pendant le vieillissement s'agissant de la peroxydation de l'acide linoléique 4-hydroxy-2-nonénal (HNE). Etant un composé plus stable que les radicaux libres, le HNE possède la particularité de pouvoir migrer vers des sites qui sont éloignés de ceux de sa formation, ce qui est l'origine de dommages plus importants. Sa pathogénicité réside dans le fait qu'il est capable de former des liaisons covalentes avec l'histidine, la lysine et des résidus cystéine de protéines, à l'origine d'une modification de leur activité (*Butterfield et al., 1997*). La plupart des études menées pour évaluer le rôle de l'oxydation des protéines dans le vieillissement cérébral concluent à une augmentation des protéines oxydées. Cette augmentation a été démontrée notamment en mesurant les niveaux de groupements carbonyles dans le cortex cérébral de sujets âgés (*Smith et al., 1991*). La formation de ces groupements carbonyles se produit par différents mécanismes comprenant l'oxydation directe des chaines latérales aminoacides ou l'oxydation induisant le clivage du peptide. De nombreuses études suggèrent que l'oxydation des protéines peut être responsable, de concert avec les autres processus, de la diminution progressive du fonctionnement physiologique qui accompagne le vieillissement.

2. Facteurs nutritifs antioxydants

a. La vitamine E

La vitamine E (Vit E) est le complément antioxydant le plus étudié et ses effets ont montré qu'il pouvait augmenter la longévité d'espèces à faible espérance de vie telles que C.elegans ou les rotifères Asplanchna brightwelli (*Sawada et Enesco., 1984 ; Harrington et Harley, 1988*). Les effets sur la longévité des rongeurs s'avèrent plus controversés (*Blackett et Hall , 1981 ; Morley et Trainor, 2001*) bien que l'on retrouve une augmentation de la durée de vie « fonctionnelle », notamment au niveau du cerveau. Par exemple, La Vit E administrée à des rongeurs peut atténuer les déficiences liées à l'âge de la potentialisation à long terme (*Murray et Lynch, 1998*) et donc améliorer les propriétés cognitives (*Joseph et al.,1998 ; Joseph et al., 1999*). Il a été montré également que la Vit E avait un effet neuroprotecteur chez des souris

déficientes en ApoE (*Veinbergs et al., 2001*) et qu'elle prévenait la toxicité du peptide Aβ *in vitro* (*Butterfield et al., 1999*) et *in vivo* (*Yamada et al., 1999*). Toutefois, les données chez l'homme apparaissent moins convaincantes. En effet, les essais cliniques de prévention par la Vit E n'ont pas montré une amélioration cognitive chez des patients Alzheimer bien qu'on retrouve une certaine amélioration de l'attitude générale (*Sano et al., 1996 ; Sano et al., 1997*). D'autres études ont noté une corrélation entre un apport alimentaire riche en Vit E (noix, fruits, légumes) et une diminution de l'incidence de maladies neurodégénératives (*Zhang et al., 2002*) suggérant qu'une alimentation riche en antioxydants peut participer à la prévention de pathologies neurologiques liées au vieillissement.

b. Composés phytochimiques et polyphénoliques

Les fruits, légumes, noix et autres produits diététiques tels que les algues bleu-vertes (spiruline) contiennent des milliers de composés phytochmiques comprenant des composés polyphénoliques caractérisés par leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires (*Annapurna et al., 1991 ; Careri et al., 2001*). Ces algues contiennent également des acides gras omégas, dont l'acide gamma-linoléique, qui peuvent réduire la peroxydation lipidique et l'inflammation. Le thé vert a été largement étudié avec un intérêt particulier pour l'un de ces composés polyphénoliques, l'epigallocatechine-3 gallate (EGCG). Outre ses effets anti-cancérigènes (*Lin et Liang, 2004 ; Moyers et Kumar, 2004*), il a été également rapporté des propriétés anti-inflammatoires (*Ahmed et al., 2002 ; Han, 2003*), anti-oxydantes (*Levites et al., 2003*) ainsi que des propriétés neuroprotectrices dans des maladies neurodégénératives (*Ahmed et al., 2002*). D'autres composés phytochimiqes ont été étudiés dans le cadre d'une activité neuroprotectrice comme la curcumine ou la quercitine (*Frautschy et al., 2001 ; Joseph et al., 2003 ;Kim et al., 2005 ; Ringman et al., 2005*).
Les bleuets, les épinards et la spiruline ont également été largement étudiés pour leurs actions neuroprotectrices potentielles. Par exemple dans le cervelet, il a été montré chez le sujet âgé une corrélation entre une perte de fonction des récepteurs β-adrénergiques et la difficulté à apprendre de nouvelles habilités motrices complexes (*Bickford, 1993*). Des travaux ont montré que si l'alimentation de rats âgés F344 était enrichie en épinards, cela avait pour conséquence d'améliorer la fonction des récepteurs β-adrénergiques ainsi que l'apprentissage moteur en diminuant le taux de glutathion oxydé et de cytokine pro-inflammatoire (*Bickford et al., 2000 ; Cartford et al., 2002*). Sur ce même modèle, l'ajout de concombre ou de spiruline entraîne également une amélioration de la fonction des récepteurs β-adrénergiques mais avec des effets plus ou moins positifs sur les taux de facteurs pro-inflammatoires ou pro-oxydants (*Gemma et al., 2002*). Dans des modèles d'animaux de la maladie de Parkinson, la supplémentation en bleuet et spiruline a montré une diminution de la lésion du striatum 1 mois après l'injection de 6-hydroxydopamine, alors que la lésion était similaire aux animaux contrôles une semaine après l'injection. Le délai d'apparition des premiers effets suggère que la supplémentation alimentaire permettrait une meilleure récupération et régénération des voies dopaminergiques du striatum mais n'aurait pas un rôle préventif dans ce type de

pathologie (*Strömberg et al., 2005*). En effet, la lésion entraîne l'activation de la microglie jouant son rôle de phagocytose mais l'enrichissement en bleuet et spiruline aurait pour conséquence de diminuer la durée de cette phase inflammatoire afin de préparer plus rapidement le cerveau à la régénération des fibres dopaminergiques dans la zone lésée. Un effet neuroprotecteur contre la maladie de Parkinson a été également observé avec le thé vert (*Levites et al., 2002*). Des données sur ces différents aliments ont été également rapportées sur l'effet neuroprotecteur dans le cas de lésions cérébrales ischémiques, notamment dans l'étude de Wang et ses collaborateurs qui montrent qu'une supplémentation en bleuet, spiruline et épinard pendant 1 mois réduisait les dommages suite à l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat (*Wang et al., 2005a*) et dans l'étude de Sweeney et collaborateurs où une dose très élevée de bleuet empêchait la perte cellulaire de l'hippocampe après un événement ischémique (*Sweeney et al., 2002*).

3. Les œstrogènes

Le cerveau reçoit l'influence des stéroïdes neuroactifs issus provenant des glandes endocrines périphériques et localement issus de la neurostéroidogenèse dans les neurones et les cellules gliales (*Baulieu et al., 2001*). Les stéroïdes neuroactifs sont des molécules lipophiles qui traversent facilement la barrière hémato-encéphalique. Une fois dans le cerveau, ils modulent la fonction des cellules neuronales et gliales. Ces stéroïdes neuroactifs et les neurostéroides présentent des effets bénéfiques sur la myélinisation, le comportement, l'humeur, l'apprentissage, la mémoire, la neuroprotection, la neuroplasticité et la neurogenèse. Néanmoins, ces effets ne sont pas toujours positifs puisqu'il a été montré l'apparition d'une neurotoxicité dans le cas de taux élevés de glucocorticoïdes ou de minéralocorticoïdes surrénaliens (*De Kloet et al., 2007*).

Parmi les nombreuses hormones stéroïdiennes, les œstrogènes sont qualifiés de neuroprotecteurs. En effet, les œstrogènes préviennent la mort cellulaire, augmentent la survie neuronale, la croissance des neurites, stimulent la synaptogenèse et régule la voie cholinergique dans différentes situations expérimentales. En 2002, McEwen fut le premier à montrer que les œstrogènes augmentent la formation des épines dendritiques et la densité synaptique dans les cellules pyramidales de la zone CA1 de l'hippocampe qui seraient médiées par les récepteurs aux œstrogènes. Différents effets neuroprotecteurs des œstrogènes ont été rapportés dans des cultures de neurones hippocampiques : protection contre la toxicité du glutamate, la déprivation du glucose, la toxicité du FeSO, la toxicité du peptide β-amyloïde (*Goodman et al., 1996*). In vivo, les œstrogènes diminueraient également les dépôts amyloïdes dans certains modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer (*Goodman et al., 1996*). Les voies génomique et non-génomique des œstrogènes passent par le récepteur ER *(estrogen receptor)* où la différence réside dans une interaction protéique du récepteur avec des protéines de signalisation cellulaire pour la voie non-génomique. La liaison avec ce récepteur a été rapportée dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et dans le hile du gyrus denté. On retrouve deux isoformes du récepteur aux œstrogènes : ERα et ERβ. ERβ est abondamment exprimé dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, alors que ERα se trouve dans les interneurones de CA1 et dans un sous-ensemble de cellules pyramidales et

granulaires). Les deux isoformes ER sont exprimées par les neurones et les cellules gliales telles que les astrocytes et les oligodendrocytes. Les plus hauts niveaux d'expression d'ER sont retrouvés dans le cerveau antérieur, l'aire préoptique, l'hypothalamus et l'amygdale. La densité d'ER est plus élevée dans l'hypothalamus que dans les régions extra-hypothalamique, telles que le cortex cérébral et l'hippocampe **(Figure 9)**. Dans certaines régions les deux sous-types d'ER sont exprimés dans les mêmes cellules (*Shughrue et al., 1997 ; Shughrue et al., 2000*)

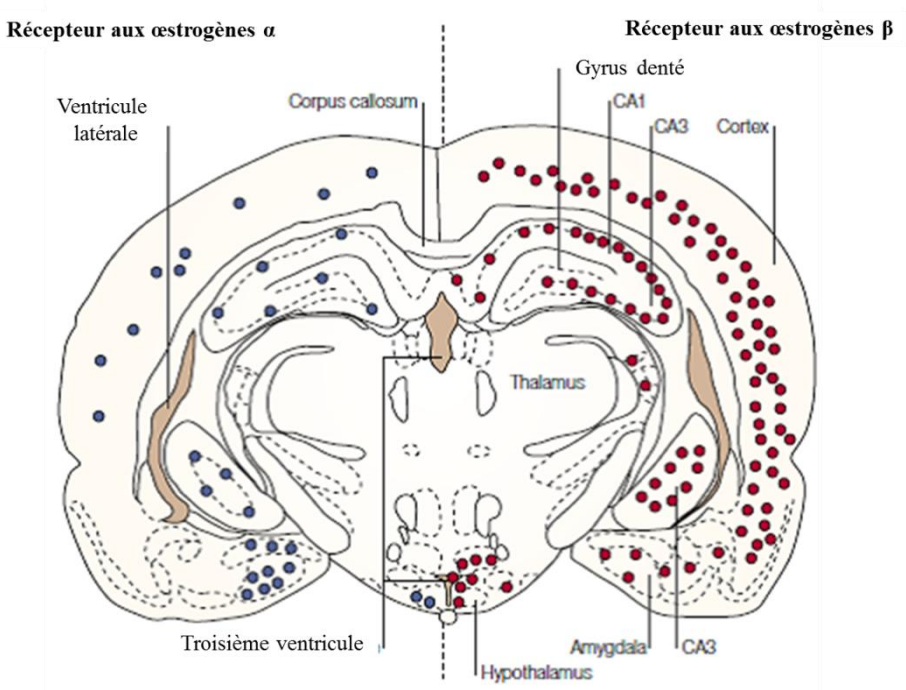


Figure 9 : Expression d'Erα (en bleu) et Erβ (en rouge) dans le cerveau de rongeurs (*d'après Behl, 2002*)

L'activation d'ERβ par des ligands naturels ou isoforme-spécifiques semble jouer un rôle important dans le vieillissement et la neurodégénérescence car cette isoforme régule la plasticité synaptique hippocampique et améliore la mémoire (*Liu et al., 2008*). Des études menées sur des souris KO montrent que les KO pour ERβ et non pour ERα présentent des déficits dans l'apprentissage et dans la signalisation chimique de l'hippocampe après traitement des animaux aux œstrogènes (*Liu et al., 2008*). Au niveau moléculaire, il a été suggéré que les effets cérébraux des œstrogènes sont médiés en partie par une « up-régulation » du gène anti-apoptotique *bcl-2* et par une interaction avec des facteurs de croissance tels qu'IGF-1 *(insulin like growth factor 1)* et BDNF *(brain-derived neurotrophic factor)* (*Garcia-Segura et al., 2006; Scharfman et Maclusky, 2005*). Les œstrogènes vont également activer les MAPK *(mitogen-activated protein kinase)*, ERK *(extracellular-regulated kinase)*, PI3K *(phosphatidylinositol-3-kinase)*, augmenter la phosphorylation de CREB *(cyclic AMP-response element binding protein)*, la voie Src (*Scharfman et Maclusky, 2005*) et améliorer l'activité des récepteurs NMDA et la potentialisation à long terme (*Liu et al., 2008*). Par conséquent, bien au-delà de leur fonction dans la reproduction, les œstrogènes sont d'importants neuromodulateurs **(Figure 10)**. Ces hormones sont également des facteurs protecteurs dans diverses pathologies neurologiques ou neurodégénératives. Une étude menée

sur des femmes ménopausées et supplémentées en œstrogène a montré une augmentation du débit sanguin cérébral, une augmentation du métabolisme du glucose ainsi qu'un hippocampe plus volumineux et une amélioration cognitive (*Sherwin et Henry, 2008*). Les œstrogènes augmenteraient les différentes étapes de la neurogenèse : prolifération, migration et différenciation. Ainsi, des travaux ont montré que l'incorporation de BrdU lors de la prolifération des cellules du gyrus denté était plus élevée dans la phase de proestrus chez la ratte que dans la période d'œstrus, suggérant la participation d'hormones endogènes. Les travaux complémentaires portant sur des rattes ovariectomisées supplémentées ou non avec des œstrogènes, ont montré une augmentation de cellules BrdU-positives chez les animaux traités à ces hormones (*Tanapat et al., 2005*). L'augmentation de la prolifération est transitoire et diminue chez les animaux à ovariectomie prolongée ou lors d'une administration chronique d'œstrogènes à concentration élevée. Chez les mâles, la réponse neurogénique dans l'hippocampe à la suite d'une administration d'œstrogènes est atténuée. La neurogenèse semble être médiée par ER puisque l'ARNm des deux isoformes de ce récepteur a été retrouvé dans 80% des cellules du gyrus denté en prolifération (*Isgor et Watson, 2005*). Enfin, en situation de déficience de prolifération cellulaire (AVC, diabète, vieillissement…), l'administration d'œstrogènes permet d'augmenter la neurogenèse (*Saravia et al., 2004, 2007 ; Pietranera et al., 2006*).

L'influence positive des œstrogènes sur la neurogenèse est principalement basée sur des données provenant de jeunes animaux, mais les données sur des animaux plus âgés sont moins abondantes. A partir de travaux portant sur des rats âgés de 22 mois ovariectomisés et recevant un traitement prolongé d'œstrogène valérianate ou des phyto-œstrogènes extraits du soja, les auteurs concluent que la prolifération cellulaire dans les cerveaux sénescents était sensible à l'administration d'œstrogène (*Perez-Martin et al., 2005*).

La neurogenèse hippocampique commence à baisser bien avant le début de la vieillesse. Par exemple, la prolifération et la migration à travers la couche des cellules granulaires du gyrus denté sont très élevées chez des ratons âgés de 2 semaines et tendent à décroître à partir d'un mois et demi, pour être fortement inhibées à partir de 12 mois (adulte) jusqu'à 24 mois (vieillissement). Compte tenu de ce déclin précoce, il est important d'élucider les effets oestrogéniques sur les différentes étapes menant à la maturation neuronale et au vieillissement des structures cérébrales comme l'hippocampe. Des essais cliniques confirment l'efficacité de la thérapie hormonale de remplacement dans la prévention plutôt que dans l'amélioration des troubles cognitifs (*Sherwin et Henry, 2008*). Comme les animaux d'âge moyen répondent pleinement aux œstrogènes, cette tranche d'âge semble la plus approprié pour lutter contre l'apparition des neuropathologies liées au vieillissement. Ainsi, l'âge moyen fournit une fenêtre temporelle attractive pour explorer le potentiel de modulation des changements liés à l'âge.

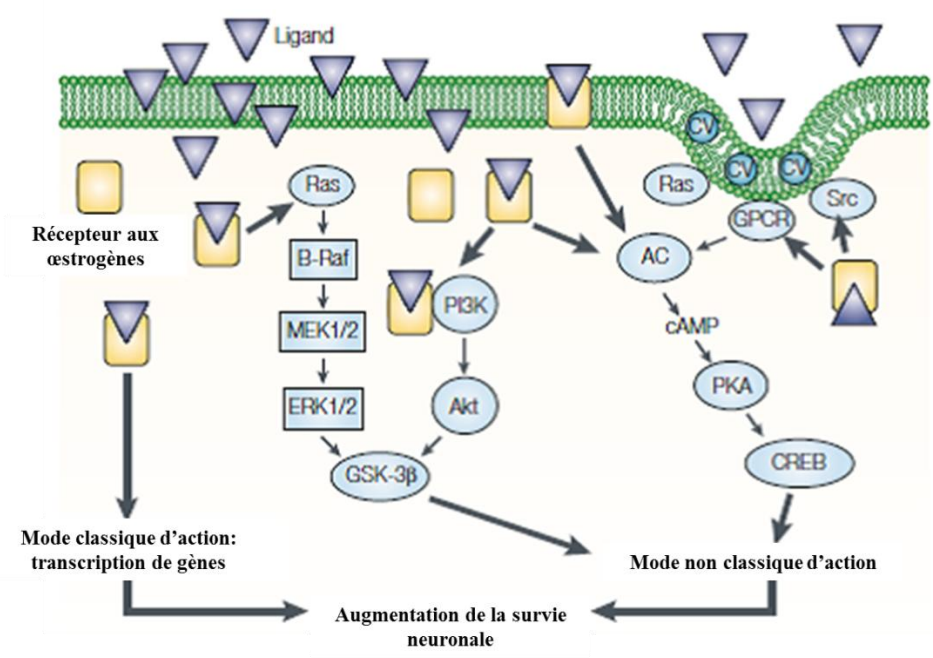


Figure 10 : Différents modes d'action possibles des œstrogènes dans la neuroprotection (*d'après Behl, 2002*)

4. La programmation fœtale

A la fin de années 80, une étude de Barker et collaborateurs a pu établir une corrélation entre le faible poids du bébé à la naissance, en lien avec une dénutrition, et un risque accrue de développer une maladie coronarienne à l'âge adulte (*Barker et al., 1986*). Ce type d'effet retardé par rapport à des événements développementaux a été par la suite confirmé dans de nombreuses études (*Barker et al.,1993 ; Frankel et al.,1996 ; Rich-Edwards et al.,1997*). L'observation princeps constitue ce qu'on apelle « l'hypothèse de Barker » ou « le phénomène de programmation fœtale ». Cette théorie stipule que les facteurs néfastes durant le développement, et particulièrement pendant la vie intra-utérine, peuvent entrainer des modifications persistantes au niveau physiologique et métaboliques qui conduisent à une augmentation du risque de survenue certaines pathologies à l'âge adulte **(Figure 11)**. Ainsi, le fœtus soumis à une malnutrition serait « reprogrammé » vers un phénotype économe afin de préserver ces organes vitaux au détriment de la croissance, phénomène qui serait plutôt bénéfique à court terme (*Erickson.,2005*). Ce concept fut par la suite élargi aux premiers mois de la vie (*Singhal et al.,2001 ;2004*). Plusieurs mécanismes seraient impliqués. Le premier mécanisme ferait intervenir la voie de régulation de la glycémie via l'insuline et l'IGF (insulin growth factor) dont l'implication dans la croissance fœtale et la programmation métabolique a été démontré (*Singhal et Lucas.,2004 ;Erickson.,2005*). Suite à une malnutrition, moins d'IGF-1 serait secrété par le fœtus du fait de sa régulation nutritionnelle dont la conséquence sera un ralentissement de croissance intra-utérine. Après la naissance, les tissus qui disposaient de taux réduits d'IGF-1 et d'insuline sont soudainement exposés à de plus fortes concentrations hormonales engendrant alors le développement d'une insulino-résistance afin de prévenir le risque d'hypoglycémie induit par cette hyperinsulinémie.

Un autre mécanisme mis en jeu ferait intervenir les voie de régulations épigénétiques (*Waterland et Michels.,2007 ;Gicquel et al.,2008 ;Hochberg et al.,2011*). Au cours de l'embryogenèse précoce, l'ADN subit une déméthylation et une reméthylation, processus durant lequel certains gènes sont « étiquetés » comme étant d'origine maternelle ou paternelle et permettant d'inactiver certains de ces gènes ultérieurement (*Feng et al.,2010*). Ces régulations épigénétiques soumis à l'empreinte parentale affectent particulièrement les nombreux gènes impliqués dans la régulation de la croissance fœtale et placentaire. Or, contrairement aux mutations génétiques, les modifications épigénétiques sont instables et réversibles. Chez la souris, des travaux ont montré que la méthylation de l'ADN chez leur progéniture était altérée par une baisse en donneurs de méthyles dans le régime alimentaire maternelle (*Wolf et al.,1998*). Cette implication de l'état nutritionnel sur les régulations épigénétiques ont été également mis en évidence chez l'homme (*Heijmans et al.,2008*). Ainsi l'hypothèse serait que des changements dans l'environnement intra-utérin pourraient conduire à une altération de l'expression des gènes via une modification de la méthylation de l'ADN et d'autres mécanismes épigénétiques (acétylation des histones) aboutissant finalement à une augmentation du risque de survenue de diverses pathologies chez l'adulte et au cours du vieillissement.

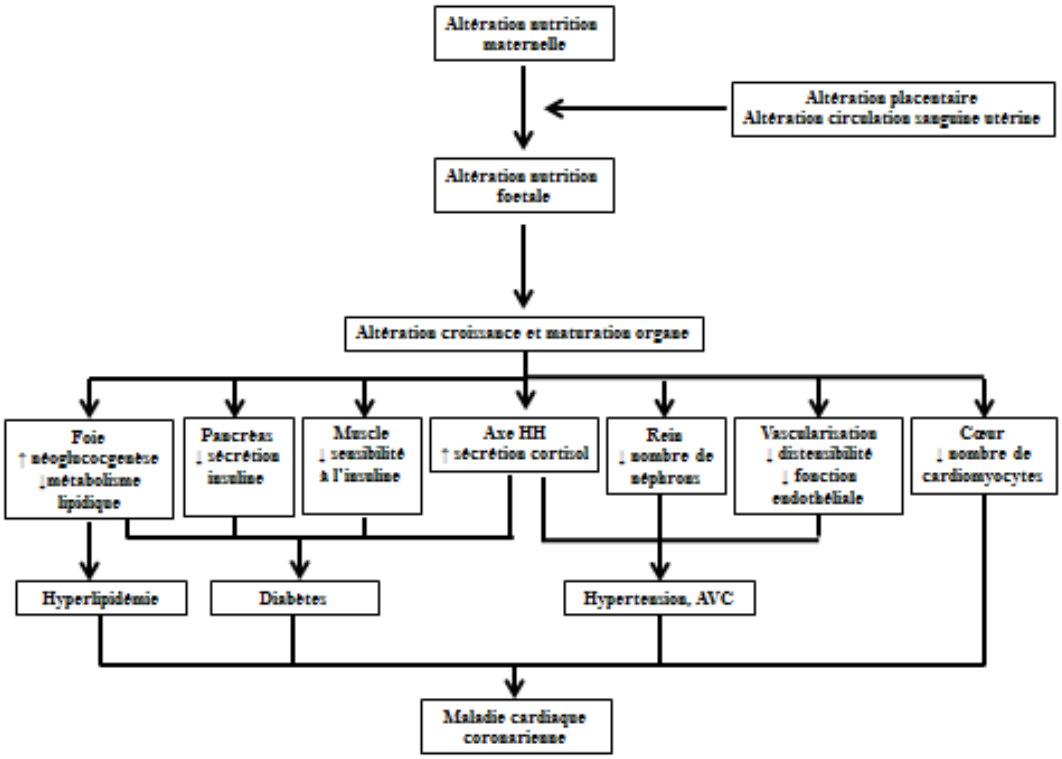


Figure 11 : Effets d'une altération nutritionnelle fœtale sur la croissance et la maturation des organes en lien avec des pathologies adultes. HH : hypothalamo-hypophysaire ; AVC : accident vasculaire cérébrale (D'après De Boo et Harding.,2006)

5. Mode de vie

Le maintien d'un régime alimentaire sain peut avoir un impact important sur le vieillissement. Celui qui paraît avoir cette qualité et qui a été souvent pris comme exemple est le régime « méditerranéen ». Il est caractérisé par la consommation importante d'aliments végétaux sous forme de fruits, de légumes, de pain, d'autres types de céréale, de noix et de graines. L'huile d'olive est la principale source d'acides gras monoinsaturés ; les produits laitiers sont principalement le fromage et le yogourt ; une consommation modérée de volaille et de poisson en fonction de la proximité de la mer ; moins de quatre œufs par semaine et une faible quantité de viande rouge et de vin (*Willett et al., 1995*). Cependant, il n'y a pas un régime méditerranéen unique, mais plusieurs car les habitudes alimentaires varient considérablement selon la situation géographique du pays par rapport à la mer (*Sofi, 2009*). De précédentes études observationnelles ont déjà montré que les aliments spécifiques ou les éléments nutritifs qui participent à la diète méditerranéenne traditionnelle (poissons, acides gras insaturés, antioxydants comme la vitamine E, la vitamine B12, les folates, les carotènes, les flavonoïdes, les polyphénoles du vin) peuvent avoir un effet potentiellement protecteur contre la démence ou le déclin cognitif lié au vieillissement (*Gomez-Pinilla, 2008*). Cependant, les résultats sur ces aliments isolés notamment l'effet des acides gras ω3 polyinsaturés semblent contradictoires à ce jour (*Van Dyk et Sano, 2007 ; Devore et al., 2009 ; Kroger et al., 2009*) sachant que les données ne prennent pas en compte les interactions possibles (effets additifs, synergiques ou antagonistes) entre les différents nutriments (*Kant, 2004*). Les différents mécanismes biologiques évoquant les effets neuroprotecteurs de ce type de régime tiennent à ses propriétés antioxydantes (*Dai et al., 2008*), anti-inflammatoires (*Giugliano et Esposito, 2008 ; Panagiotakos et al., 2009*) et protectrices vasculaires (*Renaud et al.,1995 ; Lichtenstein et al., 2006*). Il a été montré aussi que la prise de compléments alimentaires ne semble pas imiter les

effets d'une alimentation saine, probablement en raison de la variété des aliments qui sont consommés (*Donini et al., 2007*). Alors que plusieurs études montrent que la consommation modérée d'alcool a un effet protecteur, l'abstinence ou la consommation excessive semblent augmenter le risque d'un déclin cognitif (*Peters et al., 2008*). Enfin, le tabagisme est connu pour augmenter les risques cardio-vasculaires, de cancer et a été lié au développement de la démence (*Anstey et al., 2007*). Cependant, des études suggèrent que la nicotine elle-même peut avoir un impact positif à court terme via les systèmes cholinergiques sur la fonction cognitive mais des doutes subsistent sur les effets à long terme de l'utilisation de cette substance (*Swan et Lessov-Schlaggar, 2007*).

Dans un autre registre, l'activité physique (*Colcombe et al., 2003 ; Kramer et al., 2005 ; Archer, 2010*) et le niveau d'éducation (*Shenkin et al., 2003 ; Lustig et Buckner, 2004 ; Staff et al., 2004 ; McDowell et al., 2007*) apparaissent clairement comme apportant des effets neuroprotecteurs sur le fonctionnement cognitif et réduiraient le risque de survenue d'une démence. Mais le rôle de l'éducation dans cette neuroprotection est encore débattu car on ne sait pas encore si cela est dû au temps, au type ou à la difficulté de l'activité intellectuelle (*Shenkin et al., 2003 ; Lustig et Buckner, 2004; Gatz et al., 2007; McDowell et al., 2007*).

PARTIE 2 : CYCLE DES MONOCARBONES

I. Les folates (vitamine B9)

Dans les années 30, des chercheurs ont observé qu'une anémie macrocytaire chez la femme enceinte, consécutive à une carence alimentaire, était corrigée par des extraits de levure (*Wills et al., 1931*). Des anomalies sanguines voisines avaient été aussi rapportées chez des singes rhésus soumis à un régime carencé en folates, qui furent également corrigées par des extraits de levure, d'où le premier nom des folates qui fut la vitamine M (Monkey) (*Day et al., 1935*). Un peu plus tard, alors que les recherches s'efforçaient d'isoler une substance unique, il fut découvert qu'il s'agissait de composés multiples chimiquement et biologiquement très voisins dont le substrat fut dénommé acide folique parce qu'il se retrouvait en abondance dans les feuilles de certains végétaux, notamment les épinards (*Mitchell et al., 1941*). Ces composés sont aujourd'hui appelés folates ou vitamine B9.

1. Structure, sources, apports et besoins en folates

L'acide folique ou acide ptéroylglutamique est une vitamine hydrosoluble composée de trois éléments principaux : un noyau ptéridine, une molécule d'acide para-aminobenzoïque et une molécule d'acide glutamique. Les nombreux dérivés de l'acide folique sont regroupés sous le terme de folates. Plusieurs acides glutamiques peuvent s'enchaîner et former des polyglutamates (PG) qui constituent la majorité des folates présents dans l'alimentation et les milieux biologiques. Les dérivés réduits des polyglutamates (dihydrofolates ou DHF, tétrahydrofolates ou THF) constituent les formes biologiquement actives. Les dérivés THF peuvent porter différents radicaux carbonés sur les azotes N5 ou/et N10 qui constituent les sites actifs de la molécule de folate **(Figure 12)**

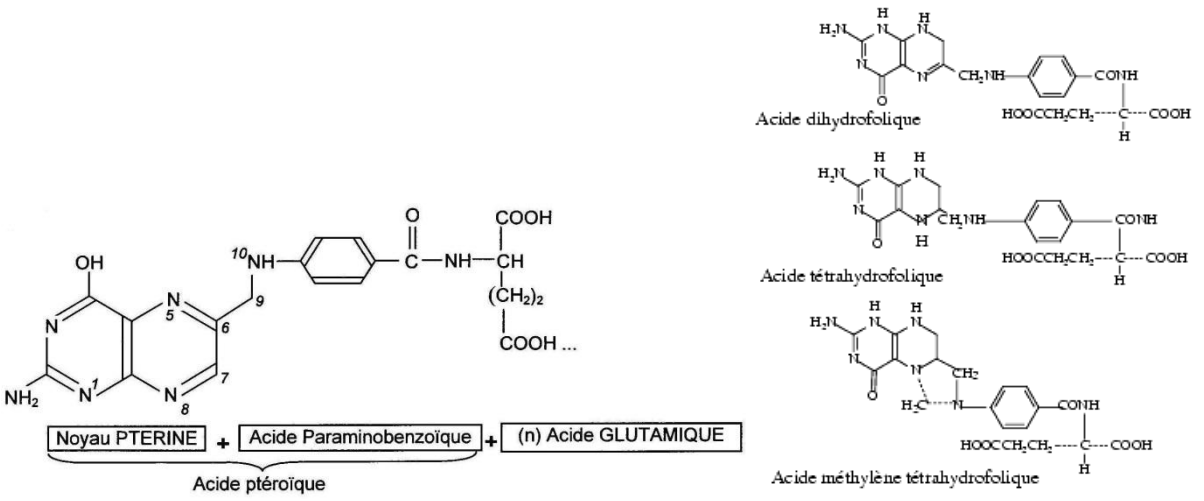


Figure 12 : Structure chimique de l'acide folique et ses dérivés

Les apports en folates sont exclusivement d'origine alimentaire car l'homme ne peut pas les synthétiser. Les folates présents dans l'alimentation (90%) sont essentiellement des PG liés à des protéines. Pour le reste (10%), les apports proviennent de la synthèse par les bactéries intestinales.
La teneur en folates est très variable selon les aliments. Parmi les aliments à très forte teneur en folates, se trouvent les légumes verts (épinards, laitues…), les fruits (orange sous forme de jus, pamplemousse…), les céréales de tous types, les fruits secs ainsi que certaines viandes animales (foie…). Les valeurs de l'apport nutritionnel conseillé (ANC) en France sont définies par tranche d'âge et en fonction de l'état physiologique :

Catégorie	ANC en µg/jour
Nourrissons	70
Enfant de 1 à 12 ans	100 à 250
Adolescents de 13 à 19 ans	300
Hommes adultes	330
Femmes adultes	300
Femme enceinte	400
Femme allaitante	400
Personnes âgées valides	400

Tableau 2 : ANC en folates pour la population française (recommandations de l'ANSES 2011)

2. Métabolisme et distribution des folates

Avant d'être absorbés au niveau du jéjunum proximal, les PG doivent être libérés des protéines alimentaires par les protéases digestives. Ils sont ensuite transformés en monoglutamates (MG) par des enzymes spécifiques, dont la γ glutamyl-hydrolase, présente dans la lumière intestinale et au niveau de la bordure en brosse des cellules intestinales. L'absorption dans la cellule se fait par un mécanisme de transport actif via un récepteur spécifique aux folates. Toutefois, à fortes doses, il existe une diffusion passive. A l'intérieur de la cellule intestinale, une partie des folates absorbés est méthylée et réduite en N5-méthyltétrahydrofolates (CH_3-THF) et passe dans le sang portal (*Rosenberg., 1990*). Ainsi, l'acide folique gagne le foie par la veine porte alors que le CH_3-THF rejoint la circulation générale et diffuse dans tous les tissus **(Figure 13)**.

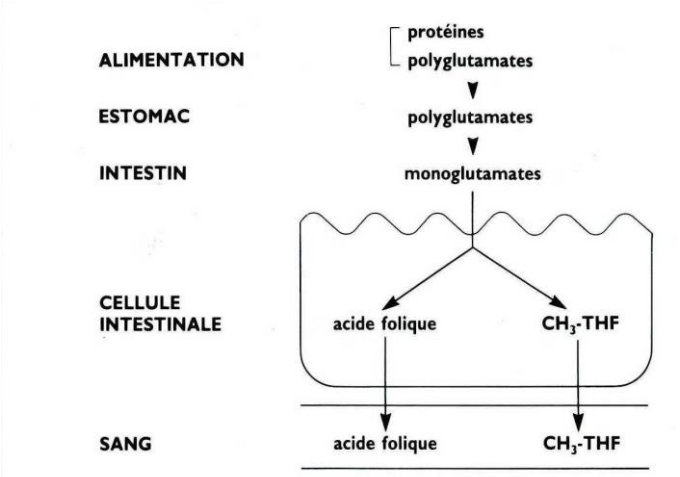


Figure 13 : Schéma d'absorption des folates au niveau intestinal.CH_3-THF : méthyltétrahydrofolate (*D'après les Vitamines ;1993*)

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme des folates. Il capte l'acide folique pour le transformer en CH_3-THF qui est remis en circulation et absorbé par les tissus périphériques. Il met également en réserve les folates sous forme de PG, principalement des pentaglutamates par une folylpolyglutamate synthétase **(Figure 14)**. Ces réserves sont relativement faibles (5 et 15 mg) et couvrent les besoins pour une durée de 4 mois.
Or, les besoins en folates sont d'autant plus importants lors de diverses périodes de la vie (grossesse croissance). En pathologie, toutes les situations d'érythropoïèse stimulée (hémolyse, hémorragie, leucémies ...) et d'éthylisme chronique entraîneront également une consommation plus importante de vitamine B9.
Par ailleurs, il existe un cycle entéro-hépatique majeur qui permet une redistribution tissulaire du CH_3-THF. Les folates circulants sont en majorité constitués de CH_3-THF. Dans le plasma, les folates circulent sous forme libre ou liée, et 2 types de protéines les lient :
- l'albumine et l'alpha2 macroglobuline qui sont des ligands de faible affinité transportant les folates préférentiellement vers certains tissus dont, le cas échéant, le placenta et le fœtus.
- les Folate Binding Proteins Solubles (S-FBP) qui sont des ligands de haute affinité.
La concentration sérique des S-FBP est faible et elle servirait à transporter les folates oxydés vers le foie. Le taux plasmatique des folates est de 5 à 15 µg/l, 10 à 30 fois moins que le taux érythrocytaire (150 à 450 µg/l) et 3 à 4 fois plus bas que le taux dans le liquide céphalo-rachidien. Les organes les plus riches sont le foie, qui contient la moitié des folates de l'organisme, et le cerveau. Au niveau des tissus périphériques, le CH_3-THF pénètre à l'intérieur de la cellule grâce à un mécanisme de potocytose (via la FBP membranaire, le récepteur des folates réduits) ; le CH_3-THF est ensuite transformé (déméthylation et ajout d'acide glutamique) en polyglutamates qui sont les formes coenzymatiques actives **(Figure 14)**. Quant à l'acide folique, il pénètre beaucoup moins facilement dans la cellule que le CH_3-THF et sa concentration cellulaire est 6 fois moindre. L'acide folique est ensuite transformé en THF par deux réactions successives catalysées par une dihydrofolate réductase. Une proportion importante de folates cellulaires, jusqu'à 50% en fonction du tissu et du type cellulaire, est associée à la mitochondrie. Le pool mitochondrial de folates est distinct du pool cytosolique et exerce des fonctions différentes dans le transfert de radicaux monocarbonés.

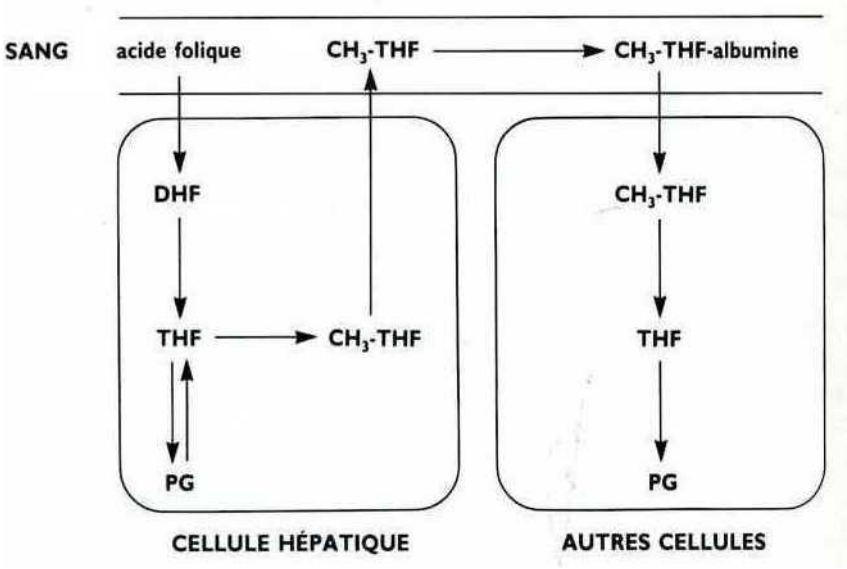


Figure 14 : Schéma de distribution des folates dans les hépatocytes et autres cellules des organes périphériques. DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate ; PG : polyglutamate ; CH3-THF : méthyltétrahydrofolate (*D'après les Vitamines ;1993*)

Les folates sont éliminés dans les selles et dans les urines. De faibles quantités (1 à 10 µg/jour) sont éliminées par voie urinaire sous forme de métabolites : ptéridine et acide benzoylglutamique qui proviennent de la rupture de la liaison C9-N10 de l'acide folique. Au niveau rénal, il existe une importante réabsorption tubulaire des folates filtrés. Les fèces contiennent des folates provenant de la fraction alimentaire non absorbée (20%), de l'excrétion biliaire et de la synthèse par les bactéries intestinales.

La principale fonction des coenzymes foliques est le transfert de radicaux monocarbonés (*Wagner.,1995*). Chez l'homme, les folates sont impliqués dans quelques réactions essentielles, la synthèse de thymidylate (ADN), du noyau purine, de la méthionine, du métabolisme de l'histidine et de l'interconversion de la sérine en glycine. Dans la synthèse de la méthionine, l'acide folique subit une réduction en DHF puis en THF. Une fois dans sa forme active, le THF reçoit un méthylène par une sérine hydroxyméthylase (SHMT) à partir de résidus sérine formant le 5,10 méthylènetétrahydrofolate. Le 5,10 méthylèneTHF subit alors une réduction catalysée par la 5,10 méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) pour former le 5 méthyltétrahydrofolate (5MTHF). Enfin, sous cette dernière forme, le 5MTHF joue le rôle de donneurs de méthyles pour transformer l'homocystéine en méthionine **(Figure 15)**

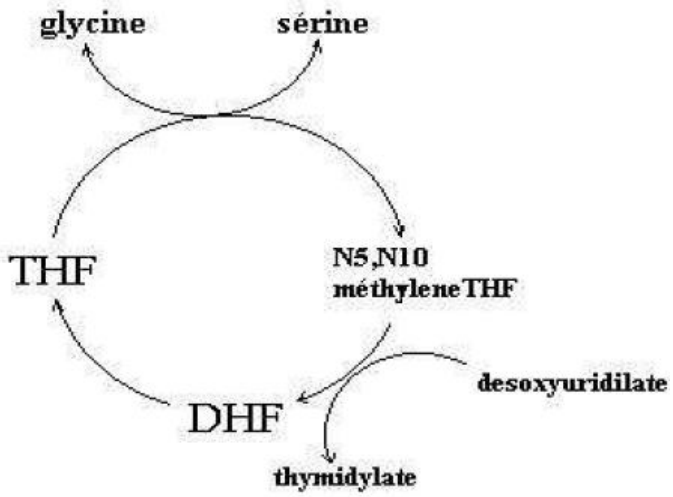


Figure 15 : Cycle des folates (vitamine B9).THF : tétrahydrofolate ; DHF : dihydrofolate

3. Principales causes des carences en vitamine B9

Une carence en vitamine B9 se rencontre aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés mais pour différentes raisons (10% de la population mondiale carencée). De plus afin d'éviter de développer des troubles du développement de type anomalies de fermeture du tube neural (spina bifida) lié à une carence en folates, les autorités publiques de santé conseillent une supplémentation en folates. Les recommandations sont les suivantes (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé, 2007) :

-Femmes en âge de procréer : il est nécessaire de consommer des aliments riches en folates (légumes verts, agrumes, œufs, fromages)

- Femmes sans antécédent particulier et qui désirent concevoir : une supplémentation systématique est préconisée, à une dose de 0,4 mg/jour, pendant les 3 mois entourant la conception.

- Femmes à risque élevé (grossesse antérieure présentant ce type d'anomalie, prise d'un traitement antiépileptique) : une supplémentation en acide folique à la dose de 5 mg/jour doit être prescrite dès qu'une grossesse est envisagée.

Les causes de carences sont diverses :

- En cas d'apport alimentaire insuffisant ou à une cuisson excessive des aliments

-d'une toxicologie médicamenteuse (chimiothérapies→ 5 Fluoro-uracile, Méthotrexate, hydroxyurée ou autres→ anticonvulsivants par exemple).

- le vieillissement

-des résections intestinales

-une malabsorption

-une augmentation des pertes ou des besoins

II. Les cobalamines (vitamine B12)

En 1925, Whipple met en évidence expérimentalement l'action antianémique du foie de veau, qui sera confirmée un an plus tard lorsque Minot et Murphy (1926) établissent que cette thérapeutique est capable d'interrompre l'évolution progressive de l'anémie pernicieuse de Biermer. Deux ans plus tard, Castle formule l'hypothèse que cette substance antipernicieuse est composée d'un facteur extrinsèque fourni par l'alimentation, notamment le foie, et d'un facteur intrinsèque présent dans la muqueuse gastrique. Entre 1940 et 1945, l'acide folique est isolé et assimilé, à tort, au facteur antipernicieux. C'est seulement en 1948 qu'est isolée à partir du foie la vitamine B12 à l'état de cyanocobalamine. Par la suite, cette substance s'est révélée être le facteur intrinsèque de Castle.

1. Structure, sources, apports et besoins de la vitamine B12

La vitamine B12, ou cobalamine (Cbl), est une molécule organométallique présentant une liaison carbone-cobalt rarement rencontrée par ailleurs dans la nature. Les cobalamines appartiennent à la famille des corrinoïdes. Ces corrinoïdes sont des macromolécules composées d'un noyau tétrapyrrolique qui referme en son centre un atome de cobalt relié à 4 atomes d'azote. Cette structure plane comporte au-dessous d'elle un groupement pseudo-nucléotidique (diméthylbenzimidole-ribose-phosphate) dont le groupe imidazole est relié au cobalt et le phosphate à l'un des noyaux pyrroles. Enfin, au-dessus de cette structure se trouve un groupement R relié à l'atome de cobalt, qui permet de caractériser les différents facteurs présentant une activité vitaminique B12 **(Figure 16)** :

-CN (cyanure): cyanocobalamine (forme circulante)

-OH (hydroxyle): hydroxocobalamine (forme circulante)

-CH3 (méthyle): méthylcobalamine (coenzyme actif) → cofacteur de réactions de reméthylation en particulier dans la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine

-5'dAd (5'deoxyadenosyle): adenosylcobalamine (coenzyme actif) → cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'hydrogène

-Glutathionylcobalamine (forme intermédiaire)

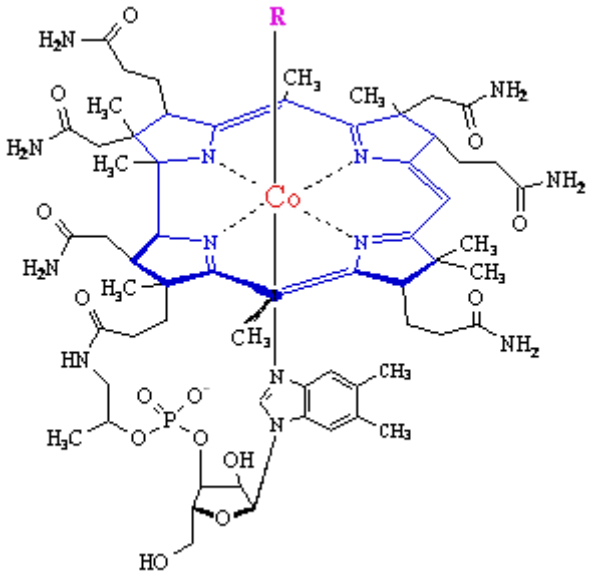


Figure 16 : Structure de la vitamine B12 ou cobalamine

L'homme est incapable de synthétiser de *novo* les formes actives qui sont l'adénosylcobalamine (AdoCbl) et la méthylcobalamine (MeCbl) et il dépend donc des sources alimentaires en précurseurs de cobalamine.
La vitamine B12 est exclusivement synthétisée par les micro-organismes dont la production par les bactéries intestinales est importante chez les ruminants. Cet exemple illustre la dépendance du règne animal par rapport à l'activité de synthèse bactérienne. Les cobalamines se trouvent exclusivement dans les produits animaux. Les principales sources alimentaires sont les abats (foie, rognons), le poisson, la viande, les œufs et les produits laitiers. Il est à noter également que les apports sont environs deux à cinq fois plus élevés dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement, conséquence d'un régime plus riche en produits animaux dans les pays industrialisés et de carence donc plus fréquente dans les pays en voie de développement. Une alimentation dépourvue de nutriments d'origine animale (régime végétalien) peut conduire à une carence. Les besoins sont variables selon les périodes de la vie. Ils sont considérés comme particulièrement importants chez les enfants et chez les femmes en période gestationnelle ou d'allaitement.

Catégorie	ANC (2009) µg/jour
Nourrisson	0.5
Enfant de 1 à 12 ans	0.8 à 1.9
Adolescent de 13 à 19 ans	2.4
Homme adulte	2.4
Femme adulte	2.4
Femme enceinte	2.6
Femme allaitante	2.8
Personnes âgées	3

Tableau 3 : Apports nutritionnels conseillés en vitamine B12 pour la population française (recommandations ANSES 2011)

2. Métabolisme et distribution des cobalamines

Les cobalamines contenues dans les aliments ne sont pas à l'état libre. Elles sont combinées à des transporteurs protéiques. La cuisson des aliments favorise la libération des cobalamines et donc leur assimilation. Elle dénature également la vitamine B12, et peut la détruire (exemple : la pasteurisation). Les cobalamines ingérées sont libérées des protéines alimentaires dans l'estomac sous l'effet de l'acidité gastrique et de la pepsine (*Schade et Schilling.,1967*) pour se lier aux deux glycoprotéines : le facteur intrinsèque (FI) et les haptocorrines. L'affinité des cobalamines pour les haptocorrines in vitro est 50 fois plus élevée que pour le facteur intrinsèque à pH acide (*Allen et al., 1978*) assurant ainsi le transport des cobalamines de l'estomac jusqu'au duodénum.
Au niveau du duodénum, les cobalamines sont transférées des haptocorrines au FI issu des cellules pariétales gastriques. Ce transfert est assuré par une digestion partielle des haptocorrines par des protéases pancréatiques (*Marcoullis et al., 1986*) ainsi que par une résistance du FI à la protéolyse (ex :trypsine) et à une neutralisation du chyme acide à pH 8 qui réduit considérablement l'affinité des haptocorrines pour les cobalamines (*Allen et al.,1978*). Le complexe cobalamine-FI migre jusqu'à l'iléon terminal grâce au péristaltisme intestinal et se fixe par sa partie protéique à un récepteur cellulaire spécifique nommé la cubiline ou récepteur cobalamine-facteur intrinsèque (*Seetharam et al.,1988*). Après une endocytose récepteur-dépendante du complexe dans les entérocytes de l'iléon distal, la cobalamine est dissociée du FI (*Seetharam et al., 1982*) et ce dernier est dégradé par des glycosidases et des protéases. La vitamine B12 est majoritairement transférée sur une protéine synthétisée par l'entérocyte, la transcobalamine (TC) mais elle peut être également métabolisé par les entérocytes en méthylcobalamine dans le cytosol ou en adénosylcobalamine dans les mitochondries **(Figure 17)**. Ce complexe est ensuite relargué au pôle baso-latéral de la cellule, passe dans la circulation sanguine et gagne le foie par la veine porte. L'absorption est lente puisqu'il faut 8 à 12 heures avant que la vitamine B12 fixée au niveau de l'iléon n'apparaisse dans la circulation sanguine. La TC est le transporteur plasmatique de la vitamine B12 et permet son internalisation récepteur-dépendante dans les tissus cibles.
Il existe trois types de transcobalamine :
- La TC I et son isoprotéine la TC III font partie de la famille des glycoprotéines liant les cobalamines et dénommées haptocorrines, produites essentiellement par les granulocytes, surtout les promyélocytes et myélocytes. Ces protéines sont très ubiquitaires puisqu'on les retrouve dans les sécrétions digestives, salive, suc gastrique, suc intestinal, bile, dans le liquide céphalo-rachidien, le liquide amniotique, les larmes, le lait, l'urine, le liquide séminal et enfin dans le sérum où elles sont dénommées transcobalamines I et III. Il est possible que les haptocorrines aient une fonction pour la vitamine B12 analogue à celle de la ferritine pour le fer, c'est-à-dire qu'elles constitueraient une forme circulante de stockage.
- La TC II est un transporteur spécifique des cobalamines de 43 kDa. Elle est reconnue comme une protéine essentielle dans la délivrance des cobalamines aux tissus et aux cellules. Cette protéine de durée de vie courte dans le plasma, n'excédant pas quelques heures et fixe plus de 80 % de la vitamine B12 absorbée. La fraction liée aux cobalamines circulantes est

désignée holo-TCII tandis que la fraction libre est nommée apo-TCII. Les sites de production de la TCII sont nombreux : hépatocytes, macrophages, fibroblastes, cellules médullaires, intestinales, amniocytes, cellules endothéliales (*Jacobsen et al., 1994*). La TCII permet la capture cellulaire des cobalamines par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant (*Jacobsen et al., 1994*). Toutes les cellules synthétisant de l'ADN sont supposées posséder un récepteur spécifique de ce complexe (*Benson et al., 1972*).

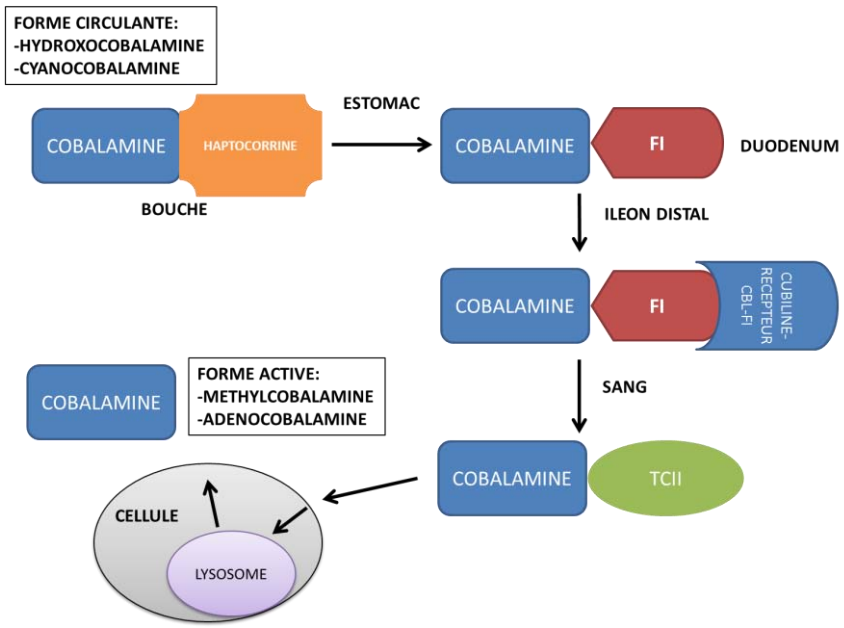


Figure 17: Voie d'assimilation et distribution de la vitamine B12 (*modifié d'après Petrus et al., 2008*). FI : facteur intrinsèque ; CBL : cobalamine ; TCII : transcobalamine II

Les réserves de vitamine B12 sont essentiellement hépatiques. Le foie contient environ 1,5 mg de cobalamines.

Physiologiquement, les besoins journaliers en vitamine B12 (2 à 5 mg) sont en général assurés car :

1 - les apports quotidiens moyens sont importants (~ 100 mg),

2 - les pertes sont très faibles,

3 - les réserves totales (2 à 4 mg) sont très importantes.

Toutefois, les besoins en cobalamine sont plus importants au cours de certaines périodes de la vie (grossesse, enfance). En pathologie, toutes les situations d'érythropoïèse accélérées (hémolyse, hémorragie ...) entraîneront également une consommation plus importante de vitamine B12.

La majorité de la vitamine B12 circulante se trouve dans le plasma sous forme d'hydroxocobalamine. Son taux plasmatique moyen est de 200 à 1000 pg/ml. L'organisme contient au total 2 à 5 mg de vitamine B12 et, chez l'adulte, les réserves sont suffisantes pour plusieurs années (2 à 5 ans). Le foie est l'organe le plus riche (réserve) et il existe un cycle entéro-hépatique très important car l'excédent de vitamine B12 est excrété dans la bile puis réabsorbé au niveau de l'iléon.

Au niveau des cellules cibles, le complexe vitamine B12-TC subit une endocytose récepteur-dépendante comme pour son absorption iléale. Une fois à l'intérieur de la cellule, la TC II est dégradée par des enzymes lysosomales et la vitamine B12 est libérée sous forme d'hydroxocobalamine ou de cyanocobalamine. Par la suite, elle est transformée en coenzymes actifs : méthylcobalamine au niveau du cytoplasme ou adénosylcobalamine au niveau de la mitochondrie **(Figure 17)**. Les cobalamines sont les coenzymes de deux mécanismes réactionnels correspondant à des réactions de transfert. Le premier consiste en un transfert intra-chaîne d'hydrogène catalysé par les enzymes adénosylcobalamine-dépendantes. L'exemple type est la conversion du méthylmalonyl-CoA en méthylsuccinyl-CoA où l'adénosylcobalamine se comporte comme un accepteur ou un donneur d'hydrogène et devient le cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase (*Beck and Ochoa, 1958 ; Valencia et al., 1974*) **(Figure 18)**. Le méthylsuccinyl-CoA est ensuite métabolisé en acide succinique et intégré dans le cycle de Krebs.

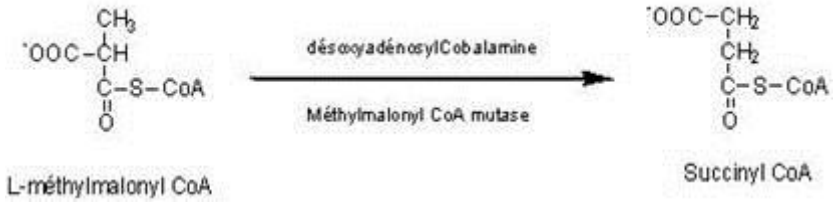


Figure 18 : Réaction de la conversion du méthylmalonyl-CoA en méthylsuccinyl-CoA

Le deuxième type de mécanisme réactionnel qui met en jeu les coenzymes B12 est le transfert intermoléculaire du groupement méthyle. La méthylcobalamine se comporte comme un donneur de groupement méthyle et devient le cofacteur de la méthionine synthase (MTR) qui catalyse la méthylation de l'homocystéine en méthionine, tout en permettant conjointement de régénérer le tétrahydrofolate (*Hogenkamp et al., 1968 ; Mangum et al.,1969*) **(Figure 19)**

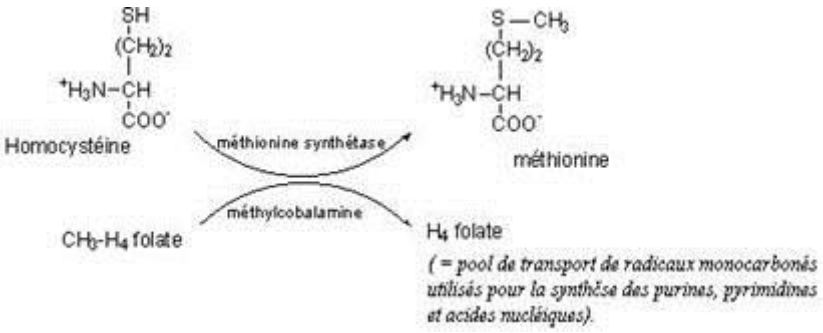


Figure 19 : Réaction de la reméthylation de l'homocystéine en méthionine

La vitamine B12 est éliminée principalement dans la bile par voie fécale mais les selles contiennent également de la vitamine B12 produite par la flore intestinale. L'excrétion urinaire est faible, inférieure à 0.25 µg/jour. Au total, l'élimination quotidienne est de 2 à 5 µg.

3. Principales causes de carence en vitamine B12

Une carence en vitamine B12 peut donc se rencontrer dans les pays en voie de développement en raison d'une malnutrition mais également dans les pays industrialisés pour des raisons diverses :
- En cas d'apport alimentaire insuffisant, comme c'est le cas pour les régimes végétaliens,
- Suite à une pullulation bactérienne de l'intestin grêle qui entraîne un défaut d'absorption de la vitamine B12,
- Suite à une infection bactérienne chronique de l'estomac (*Helicobacter Pylori*) (*Carmel et al., 2001*),
- Suite à un déficit de sécrétion en facteur intrinsèque et une destruction des cellules pariétales gastrique par des auto-anticorps en association avec une gastrite atrophique (maladie de Biermer),
- Suite à un alcoolisme chronique (*Cylwik et Chrostek, 2011*)
- A cause d'une maladie héréditaire se caractérisant par un déficit congénital en facteur intrinsèque, en transcobalamine II ou en cubiline (maladie d'Imerslund-Gräsbeck),
- Secondairement à une ablation de la partie terminale de l'intestin grêle (*Markle, 1996 ; Carmel, 2000*),
- Après une gastrectomie non supplémentée en vitamine B12 injectable (*Markle, 1996 ; Carmel, 2000*),
- Dans les suites d'une maladie chronique intestinale (maladie de Crohn, colite ulcéreuse maladie cœliaque) (*Murray,1999 ; Headstrom et al., 2008 ; Akbulut et al., 2010*),
- Lors d'hypochlorhydrie ou d'achlorhydrie (vieillissement, traitement prolongé par un médicament antiacide) (*Howden, 2000 ; Andrès et al., 2004*)

Les manifestations cliniques couramment observées lors cette avitaminose sont essentiellement des troubles neurologiques (polynévrites sensitives, ataxie, sclérose combinée de la moelle), hématologiques (macrocytose, anémie mégaloblastique) et digestifs (glossite de Hunter). Il faut noter que la plupart de ces pathologies peuvent être associées également à des carences en folates combinées ou non avec une carence en vitamine B12.

III. L'homocystéine

L'homocystéine a été identifiée pour la première fois par Butz et Du Vigneaud en 1932 (*Selhub.,1999*). Cependant, ce n'est qu'en 1962 qu'a été évoquée une implication de l'homocystéine dans certaines maladies humaines. Par la suite, Carson et al (1963) ont découvert des concentrations élevées d'homocystéine dans l'urine de plusieurs enfants handicapés mentaux. Le taux élevé d'homocystéine chez ces patients résultait d'anomalies enzymatiques bloquant le métabolisme de l'homocystéine. Cette pathologie est connue sous le nom d'homocystinurie.

1. Les différentes formes d'homocystéine circulante

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré qui n'entre pas dans la synthèse protéique et qui provient de la déméthylation de la méthionine, elle-même apportée par les protéines alimentaires. L'homocystéine existe dans l'organisme sous différentes formes. Dans la circulation sanguine, la fonction sulfhydrile libre de l'homocystéine s'échange rapidement avec d'autres thiols. Elle se combine par l'intermédiaire d'un pont disulfure avec un groupe sulfhydrile d'une autre molécule d'homocystéine donnant naissance à un bisulfure nommé l'homocystine ou avec les groupements sulfhydriles de protéines ou d'autres composés tels que la cystéine pour donner des disulfures mixtes (*Jacobsen., 1998 ; Refsum et al., 1998*). La fixation de l'homocystéine sur les thiols protéiques se fait en compétition avec la cystéine plasmatique. Une partie importante de l'homocystéine est métabolisée en cystathionine et transformée en cystéine puis en sulfates. Une autre partie de l'homocystéine est oxydée en acide homocystéique et acide homocystéine sulfinique **(Figure 20)**. Une très faible partie est transaminée en un acide cétonique, l'acide α-céto γ méthylthiobutyrique (*Favier et al., 1977*). Le terme d' « homocystéine totale » (tHcy) est habituellement utilisé pour désigner l'ensemble de ces composés. Alors que l'homocystéine libre ne compose que 1 à 2 % de l'tHcy, l'homocystine représente 98 à 99% dont 80 à 90% sont sous la forme de disulfures mixtes liés à des protéines (*McCully et al., 1975 ; Mudd et al., 2000*). Des autres formes dérivées de l'homocystéine sont également présentes comme l'homocystéine thiolactone (thioester cyclique) représentant 0,3% et 28% de l'tHcy, respectivement dans le plasma et l'urine, et l'homocystéine liée par une liaison amide aux protéines (N-Hcy-protéine) qui constitue la N-Hcy-hémoglobine et la N-Hcy-albumine (75% et 22% de N-Hcy-protéine totale) (*Jakubowski et al., 2006*).

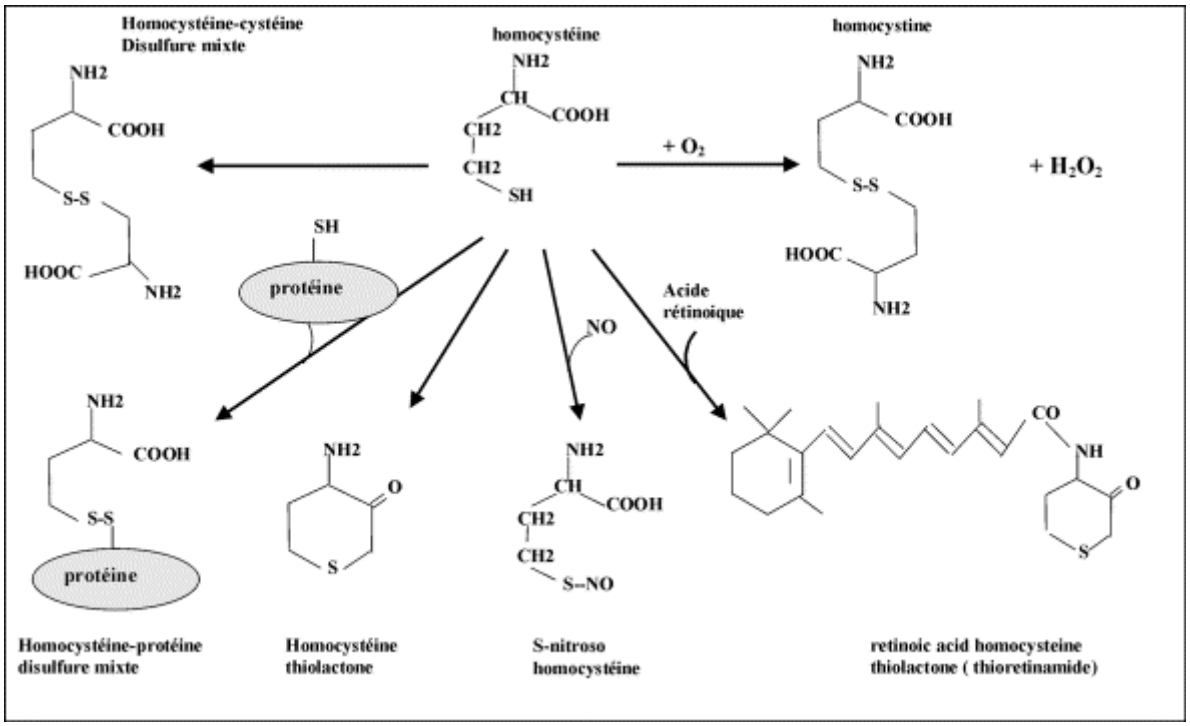


Figure 20 : Formules chimiques de l'homocystéine, de ses formes circulantes et de ses dérivés (*d'après Guilland et al., 2002*)

À partir du dosage de tHcy, dont la concentration physiologique est comprise entre 5 et 15 µmol/l, on définit les hyperhomocystéinémies modérées (de 16 à 25 µmol/l), intermédiaires (26 à 50 µmol/l) et sévères (> 50 µmol/l) (tableau 4). Lors de ce dosage, un agent réducteur réduit tous les ponts disulfures et toutes les homocystéines sous la forme de ponts disulfures passeront sous forme libre. Dans ce contexte, lorsqu'on emploie le terme d'homocystéine totale, cela désigne la somme de l'homocystéine libre et liée par un pont disulfure. De ce fait, l'homocystéine thiolactone et les N-Hcy-protéines n'intègrent pas ce dosage car le réactif réducteur ne permet pas leur réduction en homocystéine libre.

	Homocystéine (µmol/L)
Normal	5 à 15
Souhaitable	10
Hyperhomocystéinémie modérée	16 à 25
Hyperhomocystéinémie intermédiaire	26 à 50
Hyperhomocystéinémie sévère	> 50

Tableau 4 : Valeurs normales et pathologiques du taux d'homocystéine plasmatique

2. Voie de synthèse et de dégradation

La première étape du métabolisme de la méthionine consiste en sa conversion par la méthionine-adénosyl-transferase, et en présence d'ATP, en S-adénosyl-méthionine (SAM) qui est considérée comme donneur universel de groupements méthyles. Les transméthylations aboutissent à la formation de S-adénosyl-homocystéine (SAH) qui est ensuite hydrolysée en homocystéine et adénosine grâce à l'action catalytique de la SAH hydrolase. La SAM intervient dans de très nombreuses réactions catalysées par des enzymes de la famille des méthyltransférases et qui affectent les protéines, les acides nucléiques ou diverses molécules organiques. La transméthylation intervient notamment sur l'ADN où la cytosine est méthylée en 5-méthylcytosine dans les ilots CpG, conduisant ainsi à des mécanismes épigénétiques, ou sur la phosphatidyléthanolamine, constituant majeur des membranes plasmiques.
La SAH est ensuite hydrolysée en homocystéine, qui devient disponible pour un cycle de transfert de méthyle ou pour être catabolisée. L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible, préférentiellement orientée vers la synthèse de SAH, et des concentrations cellulaires élevées de SAH précèdent et accompagnent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie.
L'homocystéine est ensuite reméthylée en méthionine par la voie de la reméthylation ou transformée en cystéine par la voie de la transsulfuration. La reméthylation de l'homocystéine est catalysée par la méthionine synthase (MTR ou MS) qui requiert le 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH3 THF) comme donneur de méthyles et la vitamine B12 comme cofacteur.
Si la MTR est une enzyme ubiquitaire chez les mammifères, son expression n'est pas égale dans tous les tissus. En effet, des analyses par Northern blot (*Chen et al. 1997a, Matthews et al. 2001*) ont montré que la MTR est exprimée principalement dans le cœur, le pancréas, le

muscle squelettique, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires et l'intestin grêle. Elle est exprimée moyennement au niveau de la rate, du placenta et du cerveau, et faiblement dans les poumons, le foie, les reins et le colon.
Une voie parallèle de reméthylation indépendante des folates et de la cobalamine utilise la conversion de la bétaïne en N-diméthylglycine sous l'action de la bétaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT), principalement dans le foie. Cette voie permet de maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de la SAM en cas d'une déficience en folates. Cette voie intermédiaire n'est pas présente dans le cerveau.
Dans des contextes nutritionnels particuliers (excédent de protéines alimentaires, déficience en folates ou vitamine B12), le recyclage de l'homocystéine en méthionine n'est plus assuré. L'homocystéine est exportée dans le sang mais a tendance à s'accumuler. L'élimination par les urines n'est pas suffisante et il est donc nécessaire de dégrader cet acide aminé via une réaction catabolique irréversible.
Dans la voie de transsulfuration, l'homocystéine se condense avec la sérine pour donner la cystathionine sous l'action de la cystathionine β-synthase (CBS), dépendante du pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la forme active de la vitamine B6. La cystathionine est ensuite hydrolysée en cystéine et α-cétobutyrate par une enzyme dépendant du PLP, la γ-cystathionase. La cystéine par la suite donnera notamment le glutathion qui est un important anti-oxydant. L'activité de cette voie de transsulfuration se distribue de façon hétérogène dans l'organisme et est présente dans les tissus nécessitant une forte concentration en glutathion (régulateur intracellulaire du statut redox), comme le foie ou les neurones **(Figure 21)**.
Ainsi, l'importance relative des deux voies de transformation de l'homocystéine varie en fonction du tissu considéré et du statut protéique.

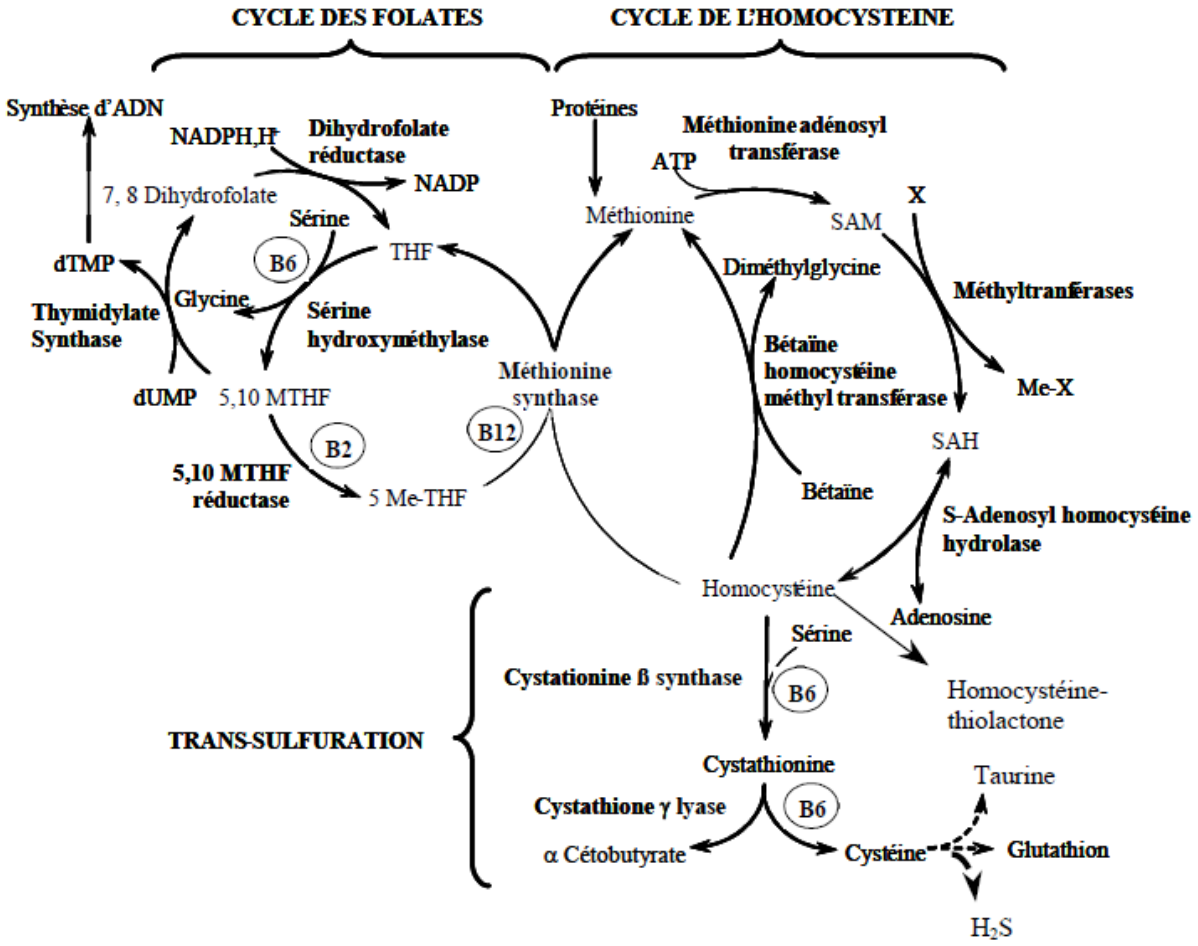


Figure 21 : Représentation du métabolisme de l'homocystéine. FAD : Flavine-adénosine dinucléotide ; DHF : Dihydrofolate ; dUMP : désoxyuracile monophosphate ; dTMP : désoxythymidine monophosphate ; THF : Tétrahydrofolate ; MTHF : Méthylène-THF ; Me-THF : Méthyl-THF ; NADP : Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate ; SAM : S-adénosylméthionine ; SAH : S-adénosylhomocystéine

3. Régulation nutritionnelle du métabolisme de l'homocystéine

La régulation du métabolisme de l'homocystéine est sous le contrôle de la disponibilité en méthionine et en SAM **(Figure 22)**. La synthèse cellulaire de la méthionine dépend de la teneur en groupements méthyles disponible qui généralement se réfère aux taux de méthionine et de choline qui est le précurseur réduit de la bétaïne utilisée dans la voie intermédiaire de la méthylation de l'homocystéine. Lorsque la cellule possède un apport suffisant en méthionine, la molécule d'homocystéine est recyclée environ deux fois par la voie de reméthylation avant d'être détruite par sa voie catabolique. Dans le cas où l'apport de méthionine est insuffisant (diminué de moitié), le nombre de cycles par molécule d'homocystéine est doublé. Au contraire, quand l'apport est trop important, la voie de transsulfuration sera privilégiée. La capacité de la cellule à adapter son utilisation de l'homocystéine implique l'existence d'une régulation des deux principales voies mettant en jeu deux mécanismes importants. Le premier dépend de la capacité de la SAM à inhiber la

MTHFR et, parallèlement, à activer la CBS. De ce fait, la SAM empêche la synthèse du 5-CH_3-THF et favorise ainsi la réaction catalysé par la CBS.
Le second mécanisme dépend de la régulation de la concentration intracellulaire en SAM. Les trois enzymes qui catalysent la synthèse de SAM présentent une affinité différente pour la méthionine. Les premières enzymes de poids moléculaire élevé, la méthionine adénosyl transférase 1 et 3, possèdent une haute affinité pour la méthionine et fonctionnent dans des conditions physiologiques. La seconde enzyme de poids moléculaire plus bas, la méthionine adénosyl transférase 2, a une faible affinité pour la méthionine et ne catalyse qu'en présence d'apports importants en méthionine. De ce fait, la synthèse de SAM est fonction de la teneur intracellulaire en méthionine. L'utilisation de la SAM est régulée spécifiquement par une réaction dans laquelle son groupement méthyle est transféré sur le groupement aminé de la glycine pour donner la méthylglycine ou sarcosine. L'enzyme impliquée dans cette réaction est la glycine-N-méthyltransférase (GNMT) qui est présente abondamment dans le foie et inhibée par le 5-CH_3-THF, de telle sorte que les folates régulent la teneur intracellulaire de la SAM. Ainsi, lorsque l'apport de méthionine est élevé, la méthionine-adénosyl-transférase de faible poids moléculaire va catalyser rapidement la transformation de la méthionine en SAM. Cette augmentation aura pour conséquence une inhibition de la MTHFR et un blocage de la synthèse du 5-CH_3-THF, entraînant l'activation de la GNMT et, parallèlement, l'activation de la CBS. Dans le cas où l'apport en méthionine est faible, la concentration intracellulaire de SAM est insuffisante pour inhiber la MTHFR et, par conséquence, la concentration du 5-CH_3-THF augmente de telle sorte que la GNMT est inhibée. La voie de reméthylation est donc favorisée, d'autant plus que la concentration de la SAM est trop basse pour stimuler la CBS.

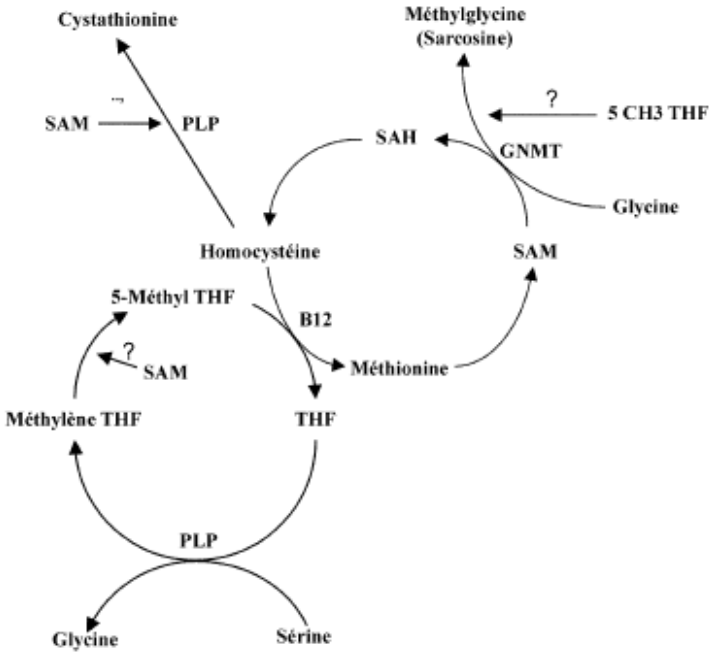


Figure 22 : Régulation nutritionnelle de l'homocystéine. (*D'après Guilland et al., 2003*) SAM : S-adenosylméthionine; SAH : S-adenosylhomocysteine ; PLP : pyridoxal 5'-phosphate (vitamine B6) ; GNMT : glycine-N-méthyltransfèrase ; THF : Tétrahydrofolate (*d'après Guilland et al.,2003*)

4. Mécanismes de l'hyperhomocystéinémie

a. Altération de la synthèse du N5-méthyltétrahydrofolate

La synthèse de la méthionine dépend directement de la disponibilité en N5-méthyltétrahydrofolate. Une altération de la synthèse de ce vitamère dont l'origine est un apport insuffisant en folates ou une diminution de l'activité de la MTHFR freine la synthèse de la méthionine. L'homocystéine ne pouvant plus être reméthylée est réorientée vers sa voie catabolique. Or, la CBS ne peut prendre en charge la totalité de l'homocystéine, essentiellement pour deux raisons :
-la première est la chute de la concentration intracellulaire de la SAM due à l'inhibition de synthèse de la méthionine
-la deuxième est la conséquence du manque de N5-CH3THF entraînant une sur-activation de la GNMT qui accentue la diminution de la concentration de SAM et une stimulation de la synthèse d'homocystéine
La voie de transsulfuration devient alors inefficace du fait de la faible concentration de SAM et de l'accumulation d'homocystéine dans les cellules. Ainsi, l'homocystéine non métabolisée diffuse dans le compartiment plasmatique et s'accumule.

b. Altération de la reméthylation de l'homocystéine

Dans le cas d'un défaut de reméthylation de l'homocystéine, les principales causes sont une carence en vitamine B12 ou une altération des enzymes synthétisant la méthylcobalamine. Les conséquences observées sont différentes d'une altération de la synthèse du N5-CH3THF. En effet, lors du blocage de la voie de reméthylation, le N5-CH3THF s'accumule dans la cellule. De ce fait, alors que la synthèse de la SAM diminue, sa concentration intracellulaire est peu affectée car l'augmentation intracellulaire du N5-CH3THF entraîne une réduction de l'utilisation de la SAM dans la voie de méthylation de la glycine. En conséquence, une plus faible quantité d'homocystéine sera synthétisée et la CBS sera activée. Etant donné que la voie de transsulfuration est plus active que dans l'altération de la synthèse du N5-CH3THF, on retrouve une hyperhomocystéinémie moins sévère.

c. Altération de la voie catabolique de l'homocystéine

Lors d'un déficit sévère de CBS, une grande proportion de l'homocystéine est reméthylée entraînant par conséquence une augmentation des concentrations de méthionine et de SAM. Cette augmentation est suffisamment élevée pour inhiber la MTHFR et ainsi bloquer la voie de reméthylation aboutissant à une accumulation de l'homocystéine caractérisant une hyperhomocystéinémie sévère. Lors d'un déficit partiel de la voie de transsulfuration, l'homocystéine est métabolisée normalement tant que sa quantité reste faible, lorsque par exemple l'entrée de la méthionine dans la cellule est limitée. En revanche, lors d'un apport important de méthionine, on observe une augmentation de la concentration intracellulaire de SAM accompagnée d'une inhibition du N5-CH3THF, entraînant ainsi le blocage de la voie de

reméthylation. Parallèlement, l'activité de la GNMT devient maximale ; il en résulte une production accrue d'homocystéine par méthylation de la glycine.

5. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

a. Facteurs génétiques

Tout défaut affectant l'expression des gènes codant les enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine peut générer une homocystéinémie. Les principales anomalies concernent le gène de la MTHFR (*Selhub., 1999*). Le gène humain *MTHFR* est localisé sur le chromosome 1 en position p36.3 et est constitué de 11 exons (*Goyette et al., 1998*). Une soixantaine de polymorphismes ont été identifiés (*Martin et al., 2006*). Le polymorphisme le plus commun, associé à une hyperhomocystéinémie modérée, est la substitution d'une cytidine par une thymidine en position 677 (*MTHFR C677T*) sur l'exon 4. Cet exon du gène code pour une partie du domaine catalytique engendrant une enzyme dite thermolabile. Du point de vue protéique, cette mutation autosomique récessive a pour conséquence le changement d'une valine par une alanine (*Frosst et al., 1995*) entraînant une diminution de l'activité enzymatique (*Weisberg et al.,1998*). Cette baisse d'activité varie en fonction du statut allèlique qui représente respectivement une perte de 30-40% pour les hétérozygotes et 60-70% chez les homozygotes (*Frosst et al., 1995 ;Weisberg et al., 2001 ; Sohn et al., 2004*). Ce polymorphisme possède une prévalence variable suivant la population, avec 10-13% d'homozygotes (T/T) et 50% d'hétérozygotes (C/T) dans les populations caucasienne et asiatique (*Frosst et al. 1995 ; Brattstrom et al. 1998 ; Gudnason et al. 1998*), alors que dans les populations africaine et américaine, il a une faible incidence (*McAndrew et al., 1996 ; Stevenson et al., 1997 ; Franco et al., 1998*). L'impact de ce polymorphisme dépend du statut en folates. Lorsque la folatémie est élevée, aucune interaction entre la mutation de la MTHFR et l'homocystéinémie n'est observée (*Jacques et al., 1996*). Au contraire, quand les taux de folates sont faibles, on observe une homocystéinémie plus sévère chez les homozygotes (T/T) que chez les sujets avec un génotype normal (*Jacques et al., 1996*). Le second polymorphisme de la MTHFR le plus répandu est la substitution d'une adénosine par une cytidine en position 1298 (*MTHFR A1298C*) sur l'exon 7 du gène codant pour une partie du domaine régulateur. Au niveau de la protéine, on retrouve une alanine à la place d'un glutamate. De fréquence allélique similaire à celui du 677 C→T, ce polymorphisme n'engendrerait pas d'élévation d'homocystéine.

D'autre anomalies concernant les enzymes impliquées dans la reméthylation de l'homocystéine ont été documentées, notamment au niveau de la méthionine synthase (gène *MTR*) et la méthionine synthase réductase (gène *MTRR*). Le gène humain *MTR* est localisé sur le chromosome 1q43 (*Li et al., 1996*) et est constitué de 33 exons (*Watkins et al., 2002*). Le polymorphisme le plus souvent rencontré est la substitution d'une adénosine par une guanosine en position 2756 (*MTR A2756G*) sur l'exon 8 entraînant au niveau traductionnel la conversion d'un acide aspartique en glycine. Il en résulte un changement de la protéine situé dans la région soupçonnée d'être impliquée dans la liaison de protéine exerçant un rôle dans le réduction accessoire de son cofacteur (*Chen et al., 1997b*). Les données relatives à l'association entre cette mutation et les taux d'homocystéine plasmatique sont discutées. En

effet, plusieurs études ne montrent pas de corrélation (*Wang et al., 1999 ; Jacques et al., 2003*) contrairement à d'autres (*Yates et al., 2003 ; Laraqui et al., 2007*). Mais ce polymorphisme serait décrit comme étant un facteur de risque d'avoir un enfant souffrant d'un syndrome de Down dans la cas où la mère serait hétéro ou homozygote pour cette mutation (*Bosco et al., 2003*). Concernant la méthionine synthase réductase, son gène de 15 exons est localisé sur le chromosome 5p15. Son polymorphisme le plus répandu est la substitution d'une adénosine par une guanosine en position 66 sur l'exon 2 résultant le remplacement d'une isoleucine par une méthionine (*Wilson et al., 1999*). Ce changement d'acide aminé est localisé sur le site de fixation de la flavine mononucléotide (*Laraqui et al., 2007*) qui, de concert avec le cytochrome P450, est responsable du transfert d'électrons pendant le réduction de la vitamine B12. Ce polymorphisme est associé à des maladies coronariennes artérielles (*Guéant-Rodriguez et al., 2005*) et à des défauts de fermeture du tube neural (*Guéant-Rodriguez et al., 2003*).
Outre la voie de reméthylation, des anomalies génétiques concernent également la voie de la transsulfuration. En effet, il a été décrit 92 mutations différentes de la CBS associés à des pathologies ; les plus communes sont les polymorphismes 833T→C (vitamine B6 répondant) et la 919G→A (vitamine B6 non-répondant) résultant respectivement de la substitution d'une isoleucine par une thréonine et d'une glycine par une sérine (*Kraus et al., 1999*). Ces mutations favorisent l'apparition d'une homocystinurie qui est souvent associé à un retard mental, à une luxation du cristallin, des anomalies squelettiques et des thromboses (*Mudd, 1985*).
Concernant la transcobalamine II, son gène, le *TCN*, présente plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en homocystéine. La mutation la plus fréquente est la substitution d'une cystidine par une guanosine en position 776 qui, au niveau protéique, a pour conséquence le changement d'une arginine par une proline (*Namour et al., 2001*). Dans le cas où la mère et le fœtus sont tous deux homozygotes pour cet allèle muté, il existe un risque élevé de spina-bifida par comparaison avec une homozygotie présente exclusivement chez la mère ou chez l'enfant (*Christensen et al., 1999*). Par ailleurs, l'association de polymorphismes mutés de la MTHFR et de la TC favorise l'apparition d'une hyperhomocystéinémie sévère chez le fœtus et augmente le risque d'avortement spontané (*Zetterberg, 2004*).

b. Facteurs nutritionnels

Le taux des folates sériques, de la vitamine B12 et, à un moindre degré, de la vitamine B6 sont inversement corrélés à l'homocystéine totale. Des déficits vitaminiques entraînent une hyperhomocystéinémie modérée. Environ deux tiers des hyperhomocystéinémies modérées sont dues à des déficits vitaminiques, principalement chez les sujets âgés (*Selhub et al., 1993*) :

• carence en folates (vitamine B9) : elle est fréquente. Elle concernerait 16 à 22 % de la population générale aux États-Unis avant 1998, et a justifié la mise en place d'une supplémentation systématique des farines alimentaires en acide folique ;
• carence en vitamine B12 : elle concerne essentiellement le sujet âgé (5 % des personnes âgées de 65 ans, 20 % des plus de 80 ans), et devient de fait plus déterminante au niveau du taux d'homocystéine plasmatique que l'acide folique chez le sujet âgé (*Clarke et al., 2004*) ;
• déficit en vitamine B6 : le mécanisme impliquant un déficit en vitamine B6 est encore mal connu. Quelques études sur l'animal ont montré que cette carence était responsable d'une hyperhomocystéinémie ainsi qu'une augmentation du taux de cystéine plasmatique. Ce phénomène a été interprété comme étant en lien avec une altération de la voie de transsulfuration (*Smolin et Benevenga 1982 ; Smolin et al. 1983*).

c. Facteurs environnementaux et inhérents au mode de vie

Il a été constaté que des facteurs physiologiques comme l'âge et le sexe influençaient les taux d'homocystéine (*Andersson et al., 1992*). Ces facteurs sont non spécifiques et ne sont pas mutuellement exclusifs. On considère bien souvent que leurs effets peuvent être additifs ou potentialisés chez certains sujets comme par exemple les individus porteurs de mutations génétiques des voies de méthylation ou de transsulfuration. En outre, on retrouve une élévation du taux d'homocystéine dans certaines conditions médicales comme l'insuffisance rénale chronique (*Bostom et al., 1997*), le diabète de type II, l'hypothyroïdie *(Hussein et al., 1999*), le psoriasis sévère, l'arthrite rhumatoïde, dans certaines affections plus rares associées à des déficits vitaminiques comme l'anémie de Biermer et une atrophie gastrique et enfin dans certains cancers comme la leucémie aigue lymphoblastique, les cancers du sein, de l'ovaire et du pancréas (*De Bree et al., 2002*). Il a été également observé une augmentation du taux d'homocystéine dû à l'iatrogénie de certains médicaments « antifoliques » (methrotexate et anticonvulsants tels que la carbamazépine et la phénytoïne), « anti vitamine B6 » (isoniazide, cyclosérine, azaurinidine et procarbazine) et « anti vitamine B12 » (oxyde nitreux). De même, il a été montré qu'une interaction gène-médicament pouvait aggraver l'hyperhomocystéinémie comme par exemple dans le cas de sujets homozygotes pour la mutation TT vs CC de *MTHFR*, traités pour des pathologies rhumatologiques ou convulsives évoquant un facteur pharmacogénétique. Par ailleurs, la consommation chronique d'acide nicotinique (tabac), de café (> 6 tasses / j) ou d'alcool favoriserait l'hyperhomocystéinémie. Ainsi, il a été décrit pour la première fois en 1993, chez les sujets alcoolo-dépendants, une hyperhomocystéinémie (*Hultberg et al., 1993*). Ces travaux montrent une altération du métabolisme de l'homocystéine par l'alcool ayant pour conséquence une augmentation du risque de survenue d'un accident vasculaire cérébral. De plus, il existe chez ces sujets une corrélation entre l'hyperhomocystéinémie et le statut vitaminique en B12, B6 et folates (*Cravo et al., 2000*). Les mécanisme sous-jacents de cette altération serait une modification de la voie de reméthylation de l'homocystéine (réduction significative de l'activité de la méthionine synthase) par la consommation chronique d'éthanol (*Barak et al., 1988*). Le mécanisme de la consommation d'éthanol sur l'inhibition de la méthionine synthase n'est pas tout à fait clair, néanmoins, en regard de l'étude de Cravo et collaborateurs (1996), il est possible que cette baisse soit associée à la baisse de la vitamine B12 ou en folates modifiant

ainsi le taux d'ARNm de la méthionine synthase (*Kenyon et al., 1998*). Une étude récente a montré que l'administration chronique d'éthanol chez le rat avait pour conséquence une diminution du taux d'hydroxocobalamine et de l'activité de la MTR qui était secondaire à une diminution de glutathion et à la capacité de synthétiser la méthylcobalamine (*Waly et al., 2011*).

Etiologie	Hyperhomocystéinémie modérée	Hyperhomocystéinémie élevée	Hyperhomocystéinémie sévère
Anomalies génétiques	-Mutation hétérozygote de la MTHFR -Mutation hétérozygote de la CBS -Polymorphisme de la transcobalamine	-Carence en vitamine B12 due à un défaut génétique -Mutation hétérozygote de la MTHFR	-Mutation homozygote de la CBS -Mutation homozygote de la MTHFR
Anomalies acquises	-Déficience nutritionnelle en folates, vitamine B12, B6, choline, sérine -Apport élevé de méthionine - Insuffisance rénale -Cancer -Psoriasis -Hypothyroïdie -Diabète T2 -Iatrogénie	-Déficience nutritionnelle en cofacteurs -Autres pathologies -Traitement par des médicaments (methotrexate, L-dopa, phénytoïne…)	Déficience nutritionnelle en cofacteurs
Mode de vie	-Consommation de tabac -Consommation d'alcool -Consommation de café -Activité physique		
Physiologie	-Age -Sexe -Masse musculaire		

Tableau 5 : Principaux déterminants du niveau d'hyperhomocystéinémie

PARTIE 3 : PATHOLOGIES NEUROLOGIQUES EN LIEN AVEC UNE HYPERHOMOCYSTEINEMIE

I. Aspects cellulaires de la neurotoxicité de l'homocystéine

De nombreux travaux ont montré qu'une concentration élevée d'homocystéine était toxique pour les cellules neuronales (*Lipton et al., 1997 ; Parsons et al., 1998 ; Kruman et al., 2000*). En effet, des lésions neurologiques ont été rapportées chez des souris KO CBS (CBS+/- ou CBS -/-) en lien avec une augmentation des taux d'homocystéine, 2 à 50 fois supérieurs selon le génotype ou le type de régime utilisé comparé aux taux observés chez des souris sauvages (*Vitvitsky et al., 2004 ; Troen, 2005 ; Kamath et al., 2006*). De plus, ces animaux ont montré des altérations de neuroplasticité à l'origine de déficiences cognitives et étaient enclins à une mort précoce (*Watanabe et al., 1995*). D'autres études (*Streck et al., 2003, 2004 ; Algaidi et al., 2006*) ont rapporté que des animaux présentant une hyperhomocystéinémie accumulaient ce composé dans le cerveau et souffraient également d'un retard de croissance corporelle, neuronale, avec un retard cognitif ainsi qu'une altération du métabolisme énergétique cérébral. En outre, l'hyperhomocystéinémie a été impliquée dans diverses pathologies neurodégénératives et des altérations de la neuroplasticité chez l'homme (*Mattson et al., 2003*).

1. Homocystéine, phénomène d'excitotoxicité et récepteurs au glutamate

a. Phénomène d'excitotoxicité et récepteurs au glutamate

Depuis les premiers travaux chez la souris et le rat nouveau-né démontrant la vulnérabilité des régions cérébrales lors d'une administration de glutamate de sodium (*Young, 1983*), il a été établi que les agents neurotoxiques aux propriétés excitatrices développaient des effets similaires. Le pouvoir cytotoxique a ainsi été mis en relation avec la capacité à dépolariser les neurones. Dans ce contexte, les données de la littérature montrent que l'acide kaïnique (kaïnate) représente l'agent le plus efficace, suivi, par ordre d'activité décroissante, du quisqualate, de l'iboténate, du NMDA, de l'acide homocystéique, de l'aspartate et du glutamate. La cytotoxicité pourrait dès lors être mise en relation avec les différents sous-types de récepteurs aux acides aminés excitateurs (AAE) de type ionotrope. L'administration de ces agents cytotoxiques est d'ailleurs fréquemment utilisée comme outil pour créer des lésions localisées du système nerveux, par injection locale.
In vitro, les AAE présentent également des effets cytotoxiques, que ce soit sur des rétines embryonnaires de poulet, des coupes de cerveau de rongeur ou des cellules en culture. Ces effets sont produits tant par le NMDA que le quisqualate ou le quinolinate (*Kim et Choi, 1987*). Sur les coupes de cerveau, les AAE provoquent notamment la dégénérescence des cellules granulaires de l'hippocampe (*Garthwaite et al., 1986*), la toxicité étant réduite par le MK801, les phencyclidines et autres antagonistes des récepteurs NMDA (*Goldberg et al., 1988; Rondouin et al., 1988*). Comme in vivo, les récepteurs de type non-NMDA paraissent

également contribuer aux effets cytotoxiques. Ainsi l'AMPA et le kaïnate ont des effets cytotoxiques sur les cultures cellulaires (*Frandsen et Schousboe, 1987*).
L'analyse du rôle des AAE dans les effets cytotoxiques de l'ischémie cérébrale utilise des modèles expérimentaux très divers comme la gerbille ou le jeune rat, par occlusion transitoire unilatérale ou bilatérale des carotides. Cette manipulation est suivie de lésions cérébrales très caractéristiques, notamment au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe (*Levine et Payan, 1966*). Ces lésions sont réduites par prétraitement au MK801, aux phencyclidines ou d'autres anti-glutamates comme le riluzole (*Pratt et al., 1992*). L'effet de l'ischémie passerait par un excès de glutamate extracellulaire comme le montre l'effet protecteur de la lésion préalable des afférences glutamatergiques à l'hippocampe (*Wieloch et al., 1985*).
L'ensemble de ces données renforce l'idée que, chez l'homme, lors d'accidents vasculaires cérébraux, d'arrêt cardiaque ou encore d'asphyxie néonatale par exemple, les lésions irréversibles du système nerveux sont produites, au moins en partie, par les AAE. De même, les lésions de caractère traumatique paraissent s'accompagner d'une augmentation de la libération extracellulaire de glutamate dont les effets sont également réduits par les antagonistes NMDA (*Faden et al., 1989*).

Au niveau cellulaire, l'anoxie s'accompagne d'une forte augmentation des taux extracellulaires de glutamate résultant d'une mobilisation du compartiment métabolique, mais aussi d'un « relargage » à partir des neurones et sans doute des astrocytes. Il est intéressant de noter que cet état s'accompagne d'une forte réduction du transport des AAE au niveau neuronal et glial (*Benveniste et al., 1984; Hagberg et al., 1985 ; Bradford et al., 1987*). Le résultat est une augmentation considérable des taux de glutamate extracellulaire provoquant une activation prolongée de ses récepteurs. Au-delà de la relation existant entre l'excitotoxicité et le pouvoir dépolarisant des AAE, les données de la littérature suggèrent que les mécanismes de l'excitotoxicité présentent deux composantes : l'une, rapide, intervenant immédiatement lors de l'administration de l'agent cytotoxique, lorsque les AAE stimulent massivement et brutalement les récepteurs, serait indépendante du calcium et dépendante des ions sodium voire du chlore et résulterait d'une entrée d'eau dans la cellule qui entraînerait le phénomène de " *swelling* " (gonflement), suivi de l'éclatement cellulaire. L'autre, plus lente, ferait intervenir les ions calcium (*Choi, 1987*). Dans ce cas, l'excitotoxicité serait liée à une trop forte augmentation de la concentration de calcium ionisé intracellulaire qui activerait une cascade de réactions enzymatiques impliquant des caspases et une production accrue de radicaux libres qui détruiraient, in fine, la cellule nerveuse. Compte tenu du caractère voltage-dépendant de l'activation des récepteurs NMDA, il est alors envisagé que l'action cytotoxique des AAE implique initialement une stimulation des récepteurs ionotropes AMPA/kaïnate qui induirait une dépolarisation à l'origine de l'activation secondaire des récepteurs NMDA et de l'entrée massive de calcium. Dans ces conditions, la capacité de la cellule à réguler son taux de calcium intracellulaire serait un élément critique du déterminisme de la mort cellulaire.

Ces données font ainsi apparaître que la vitesse d'élimination synaptique des AAE constitue objectivement l'un des éléments essentiels de l'excitotoxicité. Au-delà des processus liés à une activation supranormale de la libération de ces neurotransmetteurs par des mécanismes pré-synaptiques qui, en tout état de cause, ne seraient pas suffisants pour « saturer » les

synapses, c'est donc bien le mécanisme de l'élimination synaptique de ces AAE par transport actif dans les neurones et surtout dans les astrocytes qui apparaît comme le point critique de l'excitotoxicité. Dès lors, toutes altérations de ces transports, par exemple par déficit énergétique dans les conditions aigues, de façon constitutive par défaut d'un processus transcriptionnel ou traductionnel, voire par des atteintes des processus de régulation post-traductionnels, peuvent logiquement se traduire par un défaut d'élimination des AAE de la synapse et, par voie de conséquence, être à l'origine d'un processus excitotoxique.

b. L'acide homocystéique : antagoniste des récepteurs au glutamate

L'homocystéine, sous sa forme oxydée (acide homocystéique), est un agoniste endogène des récepteurs au glutamate (*Do et al., 1986 ; Olney et al., 1987 ; Ito et al., 1991 ; Lipton et al., 1997*) et plus spécifiquement du sous-type N-methyl-D-aspartate (NMDA) (*Zhang et al.,1992 ; Lipton et al., 1997*). En effet, l'acide homocystéique est produit par les cellules neuronales et est libéré en réponse à des stimulations excitatrices (*Klancnik et al., 1992*). Il agit ensuite comme un neurotransmetteur excitateur en activant les récepteurs NMDA (*Cuenod, 1990*). La neurotoxicité de l'acide homocystéique peut être bloqué par l'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteurs NMDA (*Olney et al., 1987 ; Kim et al., 1987*). En se fixant sur le récepteur NMDA (*Zeis, 1988*), l'homocystéine augmente indirectement l'influx calcique (*Kim et al., 1987 ; Lipton et al., 1997 ; Kruman et al., 2000 ; Robert et al., 2005*). De façon intéressante, en présence d'une faible concentration de glycine (i.e., 10 µmol/L), l'homocystéine agit comme un antagoniste partiel sur les sites de liaison de la glycine des récepteurs NMDA, et inhibe ainsi l'action inhibitrice de l'acide aminoacétique (l'homocystéine joue alors le rôle de neuroprotecteur) (*Lipton et al., 1997*). Dans le cas d'une concentration normale de glycine, la toxicité de l'homocystéine peut être observée quand celle-ci est présente en grande concentration (i.e., 100 µmol/L). En revanche, quand le taux de glycine augmente dans le système nerveux (après un accident vasculaire cérébral, un traumatisme crânien ou lors de migraine) (*Alam et al., 1998*), une concentration relativement faible d'homocystéine (i.e., 10 µmol/L) peut entraîner une excitotoxicité en se fixant et en activant excessivement les récepteurs NMDA (*Lipton et al., 1997 ; Zieminska et al., 2003 ; Shi et al., 2003*). Ces résultats suggèrent que l'homocystéine peut contribuer à des lésions cérébrales chez des patients migraineux, après un accident vasculaire cérébral ou une ischémie cérébrale. Par conséquent, en fonction de la concentration de glycine, l'homocystéine peut bloquer les sites de liaison de la glycine sur les récepteurs NMDA ou peut jouer le rôle d'agoniste du glutamate sur ces mêmes récepteurs (*Lipton et al., 1997*).
D'autres études suggèrent que l'homocystéine peut agir par l'intermédiaire de récepteurs non-NMDA (récepteurs quisqualate et récepteurs kaïnate) ou par l'activation des récepteurs métabotropes au glutamate du groupe I (*Zieminska, 2003*). Il a été démontré que l'homocystéine induisait un signal extracellulaire régulé via ERK1/2 dépendamment de l'influx calcique intracellulaire via l'activation des récepteurs au glutamate, de la calmoduline et des protéines kinases A et C.

2. Homocystéine et stress oxydant

Le métabolisme de l'homocystéine est régulé par le potentiel redox dans la cellule (*Zou et al., 2005 ; Banerjee et al., 2005*). En effet, les activités de nombreuses enzymes qui interviennent dans la clairance de l'homocystéine sont régulées par le statut oxydatif (méthionine synthase, CBS et BHMT) (*Mosharov et al., 2000 ; Maclean et al., 2002 ; Zou et al., 2005*). Par exemple, l'activité de la CBS est augmentée dans des conditions de stress oxydant, catabolisant ainsi plus d'homocystéine en cystéine et glutathion. Une altération de la voie de transsulfuration (souris KO CBS +/-) perturbe l'homéostasie redox, ce qui conduit à une diminution de la production de cystéine (*Vitvitsky et al., 2004*) et contribue ainsi à des lésions neuronales. En revanche, l'activité de la méthionine synthase est plus faible dans le cas où il y a une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). D'autres travaux ont montré que des rats nourris avec un régime riche en méthionine avaient des concentrations élevées d'homocystéine dans le sang (20 vs 7 µM chez les rats témoins) et que l'activité de la glutathion peroxydase diminuait (*Baydas et al., 2005*).

Dans certains types cellulaires, notamment dans les cellules neuronales et vasculaires, l'homocystéine peut subir une auto-oxydation (homocystine) provoquant une rupture de l'homéostasie redox dans la voie de signalisation redox (*Perna et al., 2003 ; Weiss et al., 2003 ; Zou et al., 2005*). L'homocystéine peut également induire un dysfonctionnement neurologique via le stress oxydant (*Ho et al., 2001 ; James et al., 2004*). Cet effet peut être expliqué par l'augmentation de la production des EROs et la désactivation de l'oxyde nitrique. En outre, l'homocystéine cause la peroxydation des lipides du cerveau en bloquant les récepteurs NMDA (*Jara-Prado et al., 2003*). Le rôle du stress oxydant a été beaucoup étudié dans les phénomènes de neurodégénérescence impliquant les effets toxiques de l'homocystéine dans les cellules neuronales. Par exemple, l'homocystéine augmente directement la neurotoxicité de la protéine β-amyloïde par induction du stress oxydant (*Ho et al., 2003*). La cytotoxicité de l'homocystéine peut être atténuée par l'action d'antioxydants comme la N-acétyl cystéine, les vitamines E et C (*Ho et al., 2001 ; Reis et al., 2002 ; Wyse et al., 2002*). En effet, les antioxydants tels que les vitamines E et C préviendraient des troubles de la mémoire et une diminution de l'activité ATPase causée par l'homocystéine dans l'hippocampe de rat. D'autres études ont montré les conséquences d'une carence en folates sur le système nerveux central (*Ho et al., 2003 ; Kruman et al., 2005*). Une privation de folates induirait, en plus de l'augmentation d'homocystéine, une augmentation importante d'EROs et de peptide β-amyloïde alors qu'une supplémentation en folates préviendrait la production d'EROs par la protéine β-amyloïde (*Ho et al., 2003*), suggérant que les folates moduleraient l'effet neurotoxique de cette protéine fibrillaire. Des traitements par supplémentation en 3-deaza adénosine (un inhibiteur de SAH hydrolase), N-acetyl cystéine, et S-adénosyl methionine fournirait une protection neuronale dans des conditions normales et chez des souris KO en ApoE. Cette protection est également observée dans des cultures de neurones dépourvus de folates, de vitamine E et soumis à un stress oxydant (*Tchantchou et al., 2004*). La voie de transsulfuration qui est le siège de la conversion de l'homocystéine en cystéine représente le lien entre le métabolisme antioxydant et la voie de transméthylation (*Prudova et al., 2006*). Certains travaux suggèrent un rôle antioxydant de la S-adénosyl méthionine. En effet, la SAM entraînerait une augmentation de la production de glutathion,

une diminution de la peroxydation des lipides d'environ 65% (*Villalobos et al., 2000*) et préviendrait la mort neuronale dans un modèle expérimental d'ischémie (stress oxydant) (*Matsui et al., 1987*). Des études in vivo ont démontré une conservation de la barrière hémato-encéphalique après une ischémie cérébrale transitoire en présence de SAM (*Rao et al., 1997*). En outre, un traitement chronique par la SAM (22 mois) augmenterait la concentration en glutathion et diminuerait la peroxydation des lipides dans le cerveau de rat (*De La Cruz et al., 2000*). D'autres preuves ont été fournies par des études cliniques où les vitamines du groupe B (B9, B2, B6, B12) atténuaient les dommages oxydatifs lorsqu'elles étaient administrées immédiatement après un accident ischémique cérébral aigu (*Ullegaddi et al., 2002*). Les effets neuroprotecteurs de la SAM, via la formation de la mélatonine par méthylation de la sérotonine, semblent être plus évidents chez les jeunes animaux que chez les animaux sénescents (*Bondy et al., 2004*).
Ces données indiqueraient que l'accumulation du peptide Aβ ne serait probablement pas réversible à partir d'un certain stade du vieillissement. L'homocystéine associée au stress oxydant peut causer des dommages neuronaux par un autre mécanisme car il permet via le peptide Aβ d'augmenter l'hyperphosphorylation de la protéine Tau et donc induire son accumulation dans la cellule.
Des travaux récents ont montré que les vitamines du groupe B modulaient l'impact de facteurs génétiques sur la neurodégénérescence. Ainsi, il a été rapporté dans des souris KO ApoE une augmentation des dommages oxydatifs dans le cerveau accompagnés de déficits cognitifs quand ces souris étaient carencées en folates (*Shea et al., 2002* ; *Tchantchou et al., 2005*). Cela montrerait que les patients ayant certains facteurs de risque pour les maladies neurodégénératives (ApoE4, APP) seraient plus sensibles au stress oxydant en réponse à une carence en folates.

3. Homocystéine et hypométhylation

Une hyperhomocystéinémie, une carence en folates ou B12 peuvent provoquer une diminution de la S-adénosyl méthionine et une augmentation de la S-adénosyl homocystéine qui est un puissant inhibiteur compétitif des méthyltransférases. Des études impliquant des hyperhomocystéinémies expérimentales ont montré une augmentation des taux tissulaires d'homocystéine et de SAH dans le cerveau (*Gharib et al., 1983, Blaise et al., 2007*). De nombreux travaux ont montré l'importance de la méthylation dans le système nerveux central (*Mattson et al., 2003*). En effet, la synthèse, le catabolisme de nombreux neurotransmetteurs et le maintien de la méthylation de l'ADN sont des réactions biologiques importantes qui nécessitent la présence de donneurs de méthyles.
Une carence en folates et/ou B12 entraîne une diminution de la SAM. D'autre part, une augmentation du taux cellulaire d'homocystéine est associée à une production accrue de la SAH via une réaction réversible médiée par l'enzyme SAH-hydrolase. De plus, un faible ratio SAM/SAH entraîne des altérations de l'ADN conduisant ainsi à l'apoptose des cellules (*Kruman et al., 2000*). Ainsi, une supplémentation en SAM dans un milieu de culture de cellules neuronales corticales réduirait de 50% le taux d'apoptose, reflétant l'importance de la voie de transméthylation de l'ADN afin de prévenir l'induction de l'apoptose par

l'homocystéine. De même, une supplémentation en SAM après un épisode ischémique aurait une action bénéfique sur la préservation de la barrière hémato-encéphalique, la survie neuronale (*Rao et al., 1997*) et protégerait contre des altérations des membranes phospholipidiques dans le cerveau (*Trovarelli et al., 1983*).
L'homocystéine peut augmenter la mort neuronale et les altérations de l'ADN (*Kruman et al., 2000*). En effet, l'hypométhylation de l'ADN (source de misincorporation où la thymidine est remplacé par l'uridine) et l'altération de l'expression des gènes sont des mécanismes conduisant à des lésions neuronales à la suite d'un taux élevé d'homocystéine dans les cellules. Cela a été confirmé dans des cultures de neuroblastomes où une carence en folate ou vitamine B12 entraînerait une diminution de la concentration de SAM ainsi qu'une hypométhylation de l'ADN, les effets étant compensés par une supplémentation en SAM (*Fuso et al., 2005*). Dans ce contexte, de nombreux travaux se sont intéressés à la méthylation du gène de la présiniline 1 (PS1), une γ-secrétase intervenant dans la formation du peptide β-amyloide à partir de la protéine APP *(Amyloid precursor protein)* (*Selkoe., 2001 ; Scarpa et al., 2003 ; Fuso et al., 2005*). En effet, l'hypométhylation du gène de la PS1 entraînerait sa suractivation provoquant ainsi une accélération du clivage de l'APP et donc une hausse de la production du peptide Aβ. En outre, l'apport de SAM exogène conduirait à une diminution de l'expression de la présiniline 1, conséquence d'une moindre production de l'Aβ, et pourrait être une cible thérapeutique chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*Selkoe, 2001 ; Scarpa et al., 2003*). Ces résultats suggèreraient qu'une supplémentation en donneurs de groupements méthyles permettrait de prévenir une accumulation de peptide β-amyloïde. Un autre mécanisme biologique important en lien avec la maladie d'Alzheimer mettrait en jeu la protéine phosphatase 1 (PPM1) qui est impliquée dans la régulation de la phosphatase 2A, enzyme responsable de la déphosphorylation de la protéine Tau (*Leulliot et al., 2004*). La méthylation de PPM1 est SAM-dépendante et dans le cas où son gène serait hypométhylé, cela entraînerait une augmentation des protéines Tau phosphorylées.

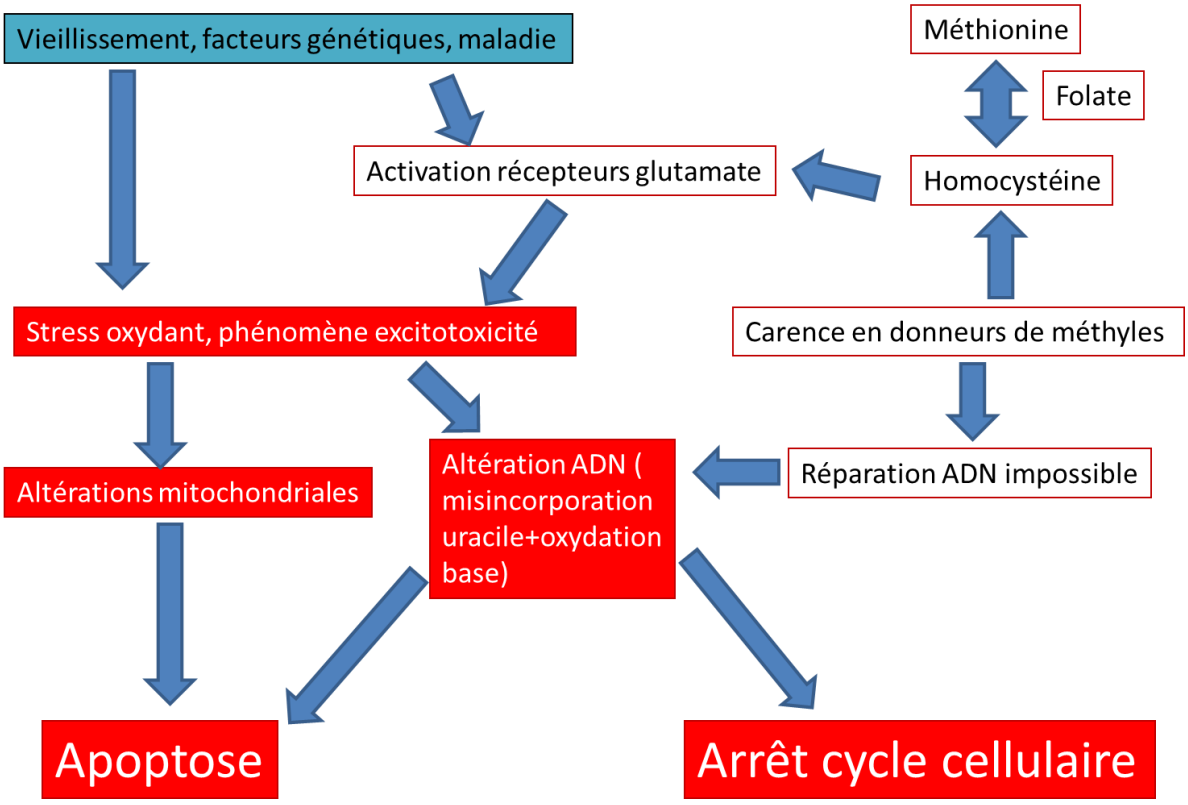


Figure 23 : Résumé des effets neurotoxiques de l'homocystéine (*Modifié d'après Mattson et Shea.,2003*)

II. Pathologies neurologiques développementales, adultes et au cours du vieillissement

1. Pathologies développementales

L'importance de l'apport des folates alimentaires pour le développement du système nerveux a été montrée dans des études portant sur des femmes enceintes carencées en vitamine B9 où le risque d'un défaut de fermeture du tube neural était fortement augmenté chez leurs enfants (*Smithells et al., 1976*). Ces altérations développementales, comprenant le spina bifida, le meningocèle, l'encéphalocèle et l'anencéphalie, résultent d'anomalies de la prolifération, de la différenciation et de la mort des cellules neurales. La fermeture du tube neural a lieu chez l'Homme entre les troisième et quatrième semaines après la conception (entre 15 et 28 jours) ; elle est conditionnée par l'interaction entre la susceptibilité polygénique du fœtus et de la mère ainsi que les facteurs environnementaux extra-embryonnaires (*Carter, 1974*). C'est dans les années 60 qu'ont été publiés les premiers travaux associant folate et défauts de fermeture du tube neural (*Hibbard, 1964 ; Hibbard et Hibbard, 1965*). Quelques années plus tard, deux études ont démontré que la supplémentation péri-conceptionnelle en acide folique et autres vitamines chez des patientes à risque réduisait la récurrence de ces anomalies (*Smithells et al., 1980 ; Laurence et al., 1981*). Dans les années 90, une étude portant sur une cohorte de 1 817 femmes à grossesse à risque conclut que ce sont seulement les folates qui exerceraient un effet protecteur contre l'apparition d'un défaut de fermeture de tube neural (*MRC Vitamin Study Research Gro., 1991*). Plus tard, d'autres études ont également montré

une réduction des taux plasmatiques d'acide folique chez des nouveau-nés porteurs d'une altération du tube neural (*Czeizel et al., 1992 ; Steegers-Theunissen et al., 1994 ; Mills et al. , 1995 ; Brouwer et al., 2000*) ; l'agent tératogène incriminé était l'homocystéine (*Ubbink et al., 1995 ; Steegers-Theunissen et al., 1995 ; Dawson et al., 1999a ; Molloy et al., 1999*). D'autres auteurs rapportent que les défauts de fermeture du tube neural, en lien avec une hyperhomocystéinémie, seraient dus à un déficit de certaines enzymes comme la CBS ou la MTHFR. En effet, la mutation C667T du gène de la MTHFR a été associée à une réduction de son activité enzymatique et à une augmentation d'homocystéine (*Kirke et al., 1993*). De plus, un taux élevé d'homocystéine a également été détecté dans le liquide amniotique d'individus porteurs de la mutation C667T et de défauts concomitants du tube neural au niveau cervical, lombosacré et un encéphalocèle occipital (*Wenstrom et al., 2000b*). L'association entre la présence d'une homozygotie pour la mutation C677T et l'apparition d'un défaut de fermeture du tube neural pourrait expliquer 40 à 50% de ces altérations susceptibles d'être évitées grâce à une supplémentation en folates (*Wenstrom et al., 2000b ; Lopez-Quesada et al., 2000*). Néanmoins, il est nécessaire de trouver d'autres mutations du gène de la MTHFR, comme la A1298C ou d'autres pour justifier l'efficacité de l'acide folique dans la prévention des défauts de fermeture du tube neural qui ne seraient pas liés à la mutation C677T (*Wenstrom et al., 2000a ; Wenstrom et al., 2000b*). La présence d'un polymorphisme de la méthionine synthase réductase a également été rapportée pour être impliquée dans la genèse des défauts de fermeture du tube neural, en particulier lorsque les taux de vitamine B12 sont faibles (*Wilson et al., 1999*). Ainsi depuis plusieurs années, les gynécologues-obstétriciens préconisent une supplémentation préventive d'acide folique (4-5 mg par jour), au moins 4 semaines avant la conception jusqu'à 12 semaines de grossesse (*Laurence et al., 1981 ; Czeizel et al., 1992*). En dehors de l'acide folique, la carence en vitamine B6 et vitamine B12 est également associée à une hyperhomocystéinémie. Par conséquent, tout programme de prévention de la lutte contre les défauts de fermeture du tube neural devrait inclure, selon de nombreux auteurs, non seulement l'administration d'acide folique, mais aussi celle de la vitamine B12 (*Czeizel et al., 1992 ; Mills et al., 1996 ; Brouwer, 2000 ; Nelen et al., 2000*) car même si les concentrations d'acide folique sont normales, une carence en vitamine B12 pourrait également accroître le risque de défaut de fermeture du tube neural (*Smithells et al., 1983 ;Czeizel et al., 1992 ; Steegers-Theunissen et al., 1995 Mills et al., 1996 ; de Bree et al., 1997 ; Brouwer, 2000*).

Parallèlement à l'étude de ces cohortes, des travaux se sont intéressés aux mécanismes par lesquels une altération du cycle de l'homocystéine entraînait ces malformations congénitales. Ainsi, des études menées sur des cellules embryonnaires du cerveau ont montré qu'une carence en folates inhibait la prolifération des cellules souches neurales, des cellules progénitrices et des astrocytes (*Akchiche et al., 2010*). D'autres résultats impliquant l'utilisation d'un inhibiteur du métabolisme des folates (méthotrexate) ont montré une apoptose précoce des neurones nouvellement formés (*Kruman et al., 2002*). Bien que les neurones chez un adulte soient différenciés et donc incapables de proliférer, on pourrait s'attendre à ce que ces cellules souffrent moins des misincorporations de nucléotides qui accompagne une carence en acide folique dans les cellules en mitose (*Choi et al., 2002*), or c'est au niveau de la réparation de l'ADN que les folates jouent un rôle important dans les

cellules post-mitotiques (*Kruman et al., 2002*). En effet, l'excision de nucléotides conduisant à la réparation de l'ADN est susceptible d'être une source importante de misincorporation d'uridine dans les cellules différenciées. Les neuroblastes mitotiques restent également sensibles à la misincorporation d'uridine au cours de la phase de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire en situation de carence en folates, ce qui expliquerait en partie l'inhibition de la prolifération des cellules neurales. Les vitamines B6 et B12 sont des cofacteurs des voies métaboliques qui affectent le taux d'homocystéine. Une carence en vitamine B12 pendant la grossesse engendre des taux élevés d'homocystéine chez le fœtus et donc augmenterait les risques d'anomalie du développement du système nerveux (*Guerr-Shinohar et al., 2002*). Dans l'enfance, la carence en vitamine B12 peut entraîner une régression psychomotrice, une neuropathie sensorielle, une hypotonie sévère, des convulsions et une apathie, qui pourraient résulter d'un défaut de myélinisation (*Hal., 1990 ; Lovblad, K. et al., 1997*). En outre, des déficits héréditaires en transcobalamine II conduisent à des lésions neurologiques qui sont caractérisées par un retard mental, une ataxie et un syndrome pyramidal affectant les membres (*Thomas et al., 1982*). Ces observations cliniques ont été confirmées dans des modèles animaux où les carences en folates, vitamine B12 et vitamine B6 peuvent entraîner de graves anomalies du développement du système nerveux (*Zhao et al., 1996*).
D'autres protéines influencent les taux d'homocystéine dans certaines conditions comme la méthionine synthase réductase (*Doolin et al., 2002*), la glutamate carboxypeptidase II (transporteur des folates) (*Devlin et al., 2000*) et la transcobalamine (transporteur de la vitamine B12). Des carences en folates et en vitamine B12 ont également été associées à l'autisme et des troubles neuropsychiatriques infantiles (*Lowe et al., 1981*). En effet, des données ont montré que les mères porteuses de l'allèle G du gène RFC1 (récepteur aux folates) présentaient une augmentation significative du risque d'avoir un enfant autiste. De plus, ces mères avait un profil d'hypométhylation de leur ADN ainsi que des concentrations plasmatiques élevées en homocystéine et SAH (*James et al., 2010*).

2. Les pathologies chez l'adulte

Chez l'adulte, les troubles psychiatriques sont assez fréquents. Par exemple, la prévalence globale des épisodes de dépression et d'anxiété aux Etats-Unis sont respectivement de l'ordre de 15% et 17%, tandis qu'au moins 1% de la population souffre de schizophrénie au cours de la vie. En France, on estime qu'environ 8% de la population auraient connu un état dépressif majeur et ce nombre atteindrait 19 %, soit un Français sur cinq, en considérant les sub-syndromes, c'est-à-dire un ou plusieurs symptômes identifiés (comme une insomnie isolée), qui n'atteignent pas le seuil du diagnostic de dépression. L'anxiété touche, quant à elle, 13% de la population française alors que le pourcentage de schizophrènes est similaire à celui des Etats-Unis. (Bulletin épidémiologique hebdomadaire de l'Institut national de veille sanitaire. 2008). De nombreux travaux se sont intéressés à la physiopathologie de ces troubles, montrant que des facteurs génétiques contribuaient à la mise en place des pathologies, mais que les facteurs environnementaux jouaient également un rôle majeur. Les premiers travaux reliant la voie de l'homocystéine et des donneurs de méthyle à la dépression ont été publiés il y a déjà plus de 30 ans et montraient que des patient souffrant de dépression présentaient des taux de

folates plasmatiques diminués par rapport à des sujets témoins non dépressifs (*Reynolds et al., 1970*). Ainsi, des études qui portaient sur la supplémentation de patients dépressifs ont permis dans certains cas de réverser la pathologie (*Gray, 1989 ; Alpert et al., 2002*). C'est au début du XXIème siècle, que des travaux menés en Angleterre sur des patients atteints de dépression et d'hypovitaminose en B12/B9 ont apporté la preuve d'un mécanisme impliquant l'hyperhomocystéinémie, des perturbations dans les réactions de méthylation et du métabolisme des neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, noradrénaline et sérotonine) (*Bottiglieri et al., 2000*). D'autres études ont associé une carence en folates et une altération du métabolisme neurochimique dans la dépression. En effet, des dosages cérébro-spinaux de l'acide-5-hydroxyindolacétique, un métabolite de la sérotonine, ont révélé une diminution de ce composé chez des personnes atteintes de dépression et son niveau a été restauré suite à une supplémentation en folates (*Botez et al., 1982*). De plus, une supplémentation en vitamine B6 semble également réduire les symptômes dépressifs (*Shiloh et al., 2001*).

Parallèlement à la dépression, des travaux ont montré un risque accru de développer une schizophrénie en cas d'hyperhomocystéinémie associée à une carence en folates, risque qui n'est pas retrouvé en cas d'hypovitaminose en B9 sans modification des taux d'homocystéine plasmatique (*Susser et al., 1998*). Tous ces travaux montrent l'importance du statut vitaminique en B12 et B9 dans la survenue de certains troubles psychiatriques, soulignant l'intérêt de mesurer leurs taux lors du diagnostic. Dans le cas d'une carence, la supplémentation en folates pourrait participer à l'atténuation des troubles.

Les analyses génétiques ont révélé que les individus homozygotes du polymorphisme C677T relativement commun du gène de la MTHFR (présent dans 10-12% de la population et qui entraîne une réduction supérieure à 70% de l'activité enzymatique) présentent un risque accru de développer une schizophrénie (*Regland et al., 1995*).

3. Les pathologies neurodégénératives liées au vieillissement

L'augmentation du stress oxydant, le compromis métabolique, les dommages de l'ADN et l'apoptose associée et les mécanismes d'excitotoxicité conduisant à la mort cellulaire sont tous impliqués dans la pathogenèse des principales pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladie d'Huntington et la sclérose amyotrophique latérale). On retrouve des mécanismes physiopathologiques communs dans ces troubles malgré qu'ils présentent leurs propres facteurs déclencheurs comme l'altération du précurseur de la protéine amyloïde dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de dérivés dopaminergiques dans la maladie de Parkinson ou bien la présence excessive de glutamine dans la protéine huntingtine dans la chorée de Huntington. Le taux d'homocystéine augmente au cours du vieillissement physiologique et un taux élevé de cet acide aminé est un facteur de risque d'accident vasculaire cérébral mais surtout de développer des maladies neurodégénératives (*Kronenberg et al., 2009*). En effet, les études épidémiologiques, épidémio-génétiques et expérimentales décrivent que des individus présentant des taux élevés d'homocystéine ont un plus grand risque de survenue de maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, des études de population et des modèles expérimentaux suggèrent un rôle de l'homocystéine et des effets délétères d'une carence en folates dans les processus physiopathologiques de la maladie (*Kruman et al., 2002 ; Seshadri et al., 2002*). En effet, les personnes atteintes de cette pathologie présentent des taux élevés d'homocystéine (*Clarke et al., 1998 ; Gottfries et al., 1998 ; McCaddon et al., 1998 ; Miller., 1999*) avant la survenue de la maladie (*Joosten et al., 1997*). On retrouve cette augmentation au cours de la maladie ; ainsi, selon certains auteurs, l'homocystéine pourrait être utilisée comme marqueur précoce des troubles cognitifs chez les personnes âgées *(Clarke et al., 1998 ; Lehmann et al.,1999 ; Snowdon et al.,2000*). De plus, on retrouve une association entre des faibles concentrations de folates et des atrophies du cortex cérébral (*Snowdon et al., 2000*). En outre, bien que les niveaux de B9 dans le liquide céphalo-rachidien sont normalement trois à quatre fois supérieurs à ceux rencontrés dans le sang, les taux cérébro-spinaux sont significativement plus bas chez des personnes atteintes d'Alzheimer *(Serot et al., 2001*). Il a été également rapporté chez ces mêmes personnes une diminution des taux de SAM ainsi qu'une baisse d'activité de l'enzyme responsable de sa régénération, la méthionine-S-adénosyltransférase dans le liquide céphalo-rachidien et le cerveau par rapport à des témoins du même âge (*Bottiglieri et al., 1990*). Une altération du métabolisme de l'homocystéine contribue à l'accumulation du peptide Aβ, à une augmentation du stress oxydant ainsi qu'à une altération du métabolisme calcique et une augmentation du phénomène d'excitotoxicité (*Mattson, 1997 ; Growdon, 2001*). En effet, l'homocystéine ou la carence en B9 potentialiserait la neurotoxicité du peptide Aβ dans des cultures de neurones hippocampiques (*White et al., 2001 ; Kruman et al., 2002*) et chez les souris sur-exprimant la protéine APP (*Kruman et al., 2002*). Une exposition simultanée des neurones en culture au peptide β-amyloïde et à l'homocystéine induit un stress oxydant et une apoptose beaucoup plus importants qu'en cas d'exposition à l'un des deux composés, montrant une potentialisation des effets (*Ho et al., 2001*). Les niveaux d'EROs et d'apoptose résultant de cette association sont alors deux fois plus élevés, soulignant l'effet synergique sur les processus neurodégénératifs. En outre, le tétrahydrofolate est très sensible à l'oxydation (*McCaddon et al., 2002*), de même que la cobalamine I, un intermédiaire de la vitamine B12. L'homocystéine, bien qu'elle puisse endommager directement les neurones, a également une action délétère sur les vaisseaux sanguins notamment cérébraux, contribuant à renforcer les effets neurodégénératifs de la carence en folate et de l'hyperhomocystéinémie chez des individus souffrant d'Alzheimer (*Candito et al., 1997*).

D'autres liens intéressants entre l'homocystéine et Alzheimer ont été mis en avant, comme la protéine HERP *(homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein)*. HERP est une protéine présente dans la membrane du réticulum endoplasmique qui a été identifiée lors d'un screening d'ADNc codant des protéines qui augmenteraient le clivage γ de la protéine amyloïde (*Sai et al., 2002*). Des études ont montré que HERP interagissait avec les présinilines 1 et 2 et que sa surexpression dans les cellules en culture augmentait la production du peptide Aβ. De même, des études in vivo ont montré que HERP était présente dans l'hippocampe et dans le cortex où son expression était induite par le stress du réticulum endoplasmique (*Chan et al., 2002*). HERP joue également un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique, une autre de ses actions neuroprotectrices. D'autres travaux sont encore nécessaires pour clarifier l'influence de

l'homocystéine sur HERP dans les neurones et le rôle des HERP dans la maladie d'Alzheimer car certaines données récentes n'impliquent pas directement la protéine HERP dans l'effet pro-amyloïde de l'hyperhomocystéinémie (*Zhuo et al., 2010*). Comme décrit ci-dessus, les carences en folates et l'augmentation du taux d'homocystéine inhibent les réactions de transméthylation en réduisant les taux de SAM. A cet égard, l'altération des voies de méthylation est impliquée dans de nombreux troubles neurologiques. Il a été trouvé de faibles taux de SAM dans le liquide céphalo-rachidien et le cerveau de personnes atteintes de plusieurs troubles neurologiques y compris la maladie d'Alzheimer (*Morrison et al., 1996 ; Linnebank et al., 2010*). Des mécanismes corrélant une diminution du taux de la SAM et maladie d'Alzheimer ont été récemment rapportés. La SAM agirait directement sur l'activité de la glutathion S-transférase (GST) (enzyme qui transfère les xénobiotiques sur le glutathion réduit). Or, la maladie d'Alzheimer est accompagnée d'une réduction de la GST, de la SAM et d'une augmentation de la SAH qui est surproduite en aval de la réaction de transméthylation en cas de carence en folates (*Panza et al., 2009*). D'autres liens ont été établis entre les conséquences d'une altération du métabolisme de l'homocystéine et la maladie d'Alzheimer. Des travaux ont rapporté que des individus possédant l'isoforme E4 de l'apolipoprotéine E ont un risque accru de développer la maladie, peut-être en raison d'une diminution de l'activité antioxydante de cette isoforme comparée aux autres (*Ramassamy et al., 1999 ; Pedersen et al., 2000*). Il y aurait un lien entre l'ApoE4 et la MTHFR dans la survenue de la maladie d'Alzheimer (*Nishiyama., 2000*) car une carence en folates aurait un impact sur les conséquences neurotoxiques associées à une diminution en ApoE. Des souris homozygotes KO pour ApoE (ApoE $^{-/-}$) et carencées en folates pendant un mois ont montré des dommages oxydatifs cérébraux, contrairement aux ApoE $^{-/-}$ non carencées et aux souris sauvages également carencées en B9 (*Shea et Rogers, 2002*). De même, quand ces souris ApoE $^{-/-}$ sont carencées en vitamine E, une privation de folates entraîne une augmentation des lésions oxydatives dans le cerveau, contrairement aux souris non carencées.
Ainsi, conformément aux données obtenues chez les patients Alzheimer, ce modèle transgénique présente une altération de l'état d'équilibre du glutathion dans le tissu cérébral par rapport aux souris sauvages (*Shea et Rogers, 2002*). La privation de folates entraîne une augmentation du taux de glutathion cérébral aussi bien chez les souris sauvages que chez les ApoE $^{-/-}$. Cependant, cette augmentation de glutathion n'est apparemment pas capable de compenser l'absence d'ApoE chez les animaux carencés, ceci étant illustré par l'augmentation des dommages oxydatifs (*Shea et al., 2002*). Ces données sont conformes aux précédentes montrant que le stress oxydant submerge la capacité du glutathion d'éliminer les radicaux libres (Lièvre et al., 2001) et montrent comment l'impact conjugué du stress oxydant, la prédisposition génétique et la carence en folates peut induire une neurodégénérescence.

Bien que les données sur le lien entre la maladie de Parkinson et une altération du métabolisme de l'homocystéine soient moins nombreuses que pour la maladie d'Alzheimer, certains travaux suggèrent que les folates et les taux plasmatiques d'homocystéine ont un impact sur cette pathologie. En effet, il a été retrouvé un taux d'homocystéine plasmatique élevé chez des patients atteints de Parkinson (*Yasui et al., 2000 ; Blandini et al., 2001*). En outre, une telle augmentation a été détectée chez les individus atteints de cette maladie et porteurs de la mutation C677T de la MTHFR. Fait important, il a été montré que

l'administration de lévodopa, généralement utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, favoriserait l'épuisement des groupes méthyles à cause de sa méthylation par la catéchol-O-méthyltransférase provoquant ainsi indirectement une élévation du taux d'homocystéine (*Liu et al., 2000*). Ceci, au lieu d'atténuer la maladie, l'aggraverait en accélérant le processus neurodégénératif. Une carence en folates associée à une hyperhomocystéinémie entraînerait chez des souris injectées au MPTP (1-méthyl-4-phényl-1, 2, 3,6-tétrahydropyridine, modèle utilisé chez l'animal pour mimer la maladie de Parkinson) une augmentation de la mort de neurones dopaminergiques (*Duan et al., 2002*). De même, une carence en folates et une concentration élevée d'homocystéine dans des cultures de neurones dopaminergiques humains sensibiliseraient davantage ces derniers à une mort cellulaire induite par la roténone et le fer, deux agents utilisés pour produire des modèles de la maladie de Parkinson *(Duan et al., 2002*). Ces résultats suggèrent que la carence en folates et une augmentation du taux d'homocystéine pourraient, en endommageant les neurones dopaminergiques, précipiter l'apparition et la progression de la maladie de Parkinson.

PARTIE 4 : L'HYPOXIE NEONATALE : DE LA NEURODEGENERESCENCE A LA NEUROGENESE

Le premier travail scientifique portant sur l'hypoxie fut mené par P.Bert (1878), dans lequel il révéla que la diminution de la pression atmosphérique en oxygène dans l'air inspiré était un facteur physiologique important de l'atmosphère de la montagne. De plus d'être un état rencontré lors de processus physiologique (apnée, accouchement, escalade en altitude…) l'hypoxie est également un facteur prépondérant dans plusieurs pathologies cérébrales. Elle est une composante majeure dans la progression des tumeurs, parce qu'elle stimule la formation de nouveaux vaisseaux, qui alimentent cette tumeur et est à l'origine de la mort neuronale lors d'une ischémie cérébrale ou d'une asphyxie néonatale. Le cerveau consomme 20% de la consommation d'oxygène totale, au repos ce qui le rend très sensible à l'hypoxie. La consommation d'oxygène par le cerveau n'est pas homogène, et diffère d'une région du cerveau à l'autre (du plus consommateur au moins consommateur): cortex cérébral > Noyaux gris centraux >cervelet >thalamus > tronc cérébral >bulbe > moelle épinière. Les structures végétatives du tronc cérébral sont donc plus résistantes à l'hypoxie que le cortex cérébral expliquant qu'au cours d'un arrêt cardiaque ou une autre cause d'hypoxie prolongée, le patient récupère les fonctions végétatives normales, mais conserve un déficit intellectuel grave et définitif

I. Les différents types d'hypoxie et sa régulation physiologique

1. Les différents types d'hypoxie

L'hypoxie est un phénomène pathologique qui a lieu lorsque la quantité de dioxygène (O_2) délivrée aux tissus est insuffisante par rapport aux besoins cellulaires. On classifie généralement l'hypoxie en quatre catégories :

- L'hypoxie hypoxique est due à une diminution de la disponibilité d'O_2 pour le métabolisme, phénomène typique en altitude ou d'un trouble de ventilation caractérisé par une hypoventilation qui entraine une diminution du gradient de diffusion jusqu'au sang pulmonaire artériel gênant de cette façon la capture de l'oxygène. On peut également retrouver une hypoxie hypoxique lors de trouble de diffusion empêchant l'équilibre des concentrations en oxygène entre les alvéoles pulmonaires et le sang capillaire. Le type hypoxique peut être de 2 catégories : l'hypoxie d'altitude (celle du milieu naturel) est dite hypobare. C'est la diminution de pression de l'air atmosphérique (moins de 760mmHg) qui conduit à la diminution de la pression partielle de chacun des gaz qui le composent, dont l'O_2. Toutefois, chacun des gaz reste identique en proportion : il y a toujours 20.93% d'O_2 dans l'air. Au contraire, il existe l'hypoxie normobare, souvent utilisée en laboratoire pour simuler une montée en altitude. Ce n'est pas une diminution de la pression de l'air, mais simplement une diminution de la part du dioxygène dans l'air (moins de 20.93%), en injectant par exemple un surplus d'azote au mélange gazeux

-l'hypoxie anémique est causée par une réduction de la capacité du sang à transporter l'oxygène soit en cas d'anémie ou lors d'une incapacité de l'hémoglobine à fixer ou à libérer le dioxygène. C'est ainsi par exemple, que le monoxyde de carbone (CO) se fixe à l'hémoglobine avec une affinité 200 fois supérieure à celle de l'oxygène. Une molécule de CO liée à l'un des groupements hèmes augmente l'affinité pour l'O_2 des trois autres groupements de l'hémoglobine de sorte que celle-ci va non seulement lier moins d'O_2 mais aura encore plus de mal à libérer celui qui lui est fixé.

-L'hypoxie d'origine circulatoire est causée par une diminution du débit sanguin dans un tissu donné dont l'origine peut être une insuffisance circulatoire ou une vasoconstriction. On peut également retrouver une hypoxie ischémique lors d'un œdème ou d'une hypertrophie tissulaire sans croissance de capillaires ce qui va accroitre la distance séparant une cellule du capillaire le plus proche.

-L'hypoxie histotoxique résulte de substances (cyanure, monoxyde de carbone) qui inhibent la chaine respiratoire mitochondriale bloquant ainsi l'utilisation de l'O_2 par la cellule.

2. Adaptation physiologique à une hypoxie

Afin de maintenir un approvisionnement continu en oxygène pour assurer un fonctionnement optimal du cerveau, le corps doit être en mesure de détecter et de réagir rapidement à tout changement d'oxygénation comme par exemple lors d'une hypoxie. Pour cela, l'organisme possède deux types de chimiorécepteurs : les récepteurs centraux localisés dans le tronc cérébral au niveau du bulbe rachidien et les récepteurs artériels situé sur l'aorte dénommé corps aortiques et sur l'artère carotide appelé corps carotidiens. Les corps aortiques sont précisément installés au niveau de la crosse aortique à proximité des barorécepteurs aortiques qui eux sont spécialisé dans les différences de pression artérielle. Les corps carotidiens sont de petites structures sensorielles situées au niveau du sinus carotidien qui est le lieu de séparation de l'artère carotide commune en artères carotides interne et externe **(Figure 24)**. Les chimiorécepteurs carotidiens sont les récepteurs les plus sensibles aux changements de pression partielle d'oxygène. Pendant une hypoxie, les corps carotidiens vont libérer des neurotransmetteurs (adénosine, dopamine ou autres) qui vont activer les afférences sensorielles via les nerfs vague et glossopharyngien qui a leur tour vont relayer l'information au bulbe rachidien. C'est influx nerveux combiné aux informations issu des barorécepteurs vont moduler les éfférences sympathiques afin d'induire une réponse cardiorespiratoire en réponse à l'hypoxie : hyperventilation, tachycardie, vasodilatation, réponse adéquate du foie et du rein (production d'érythropoïétine) et modification du débit sanguin cérébrale. Tout cela aura pour conséquence de maintenir l'oxygénation des organes essentiels (cerveau, cœur).

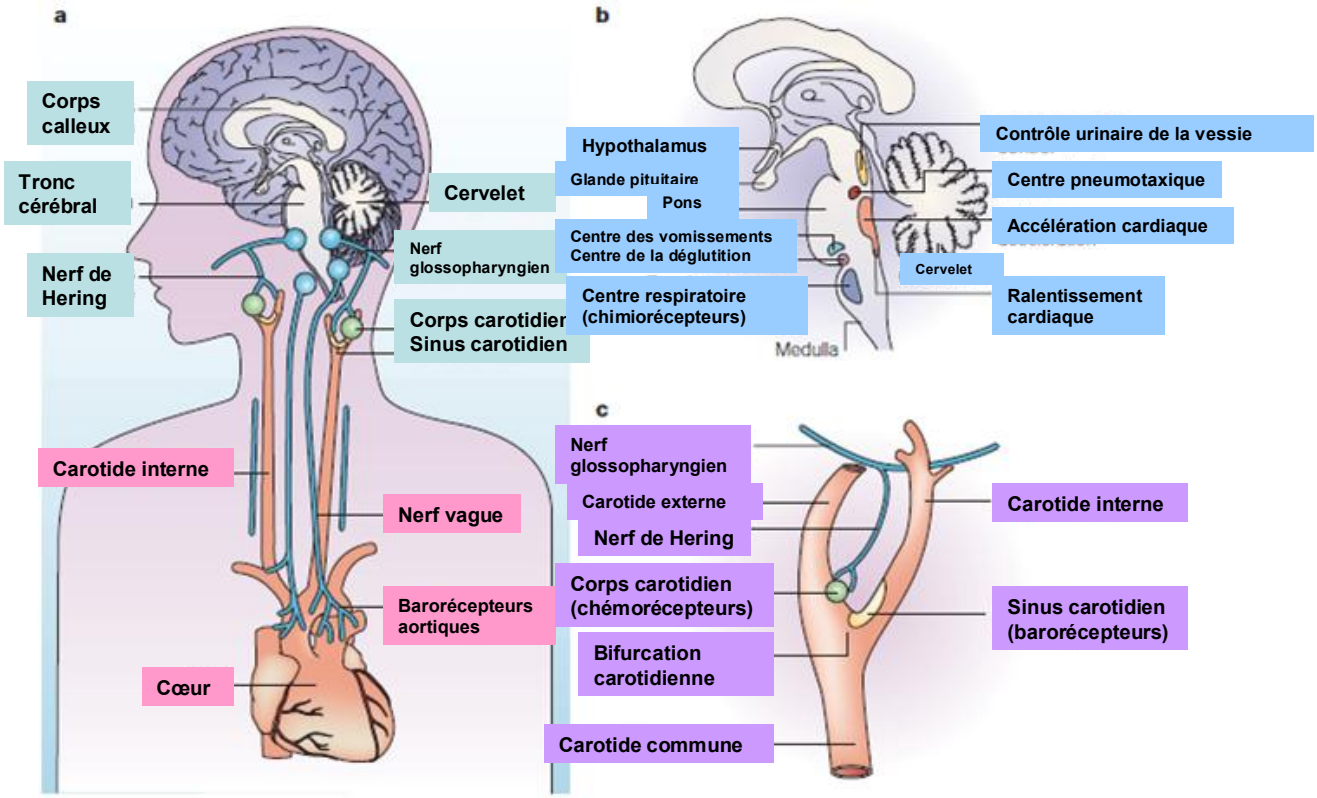


Figure 24: Sensibilité à l'oxygène A. Structures et circuits impliqués dans le sensibilité à l'oxygène. B. Centre régulateur dans le tronc cérébral. C. Récepteurs sensibles à l'oxygène au niveau carotidien (*D'après Sharp et Bernaudin.,2004*).

3. Influence de l'âge à une lésion hypoxie-ischémie

Il est établi depuis longtemps que le sujet immature tolère mieux l'hypoxie que l'adulte, et que le fœtus est plus résistant que le nouveau-né (*Johnston et al. 2001; Longo 2005 ; Maulik et al. 1999*). Les travaux de Mallard et al. (1995) montrent que 10 minutes de clampage du cordon ombilical n'entraînent pas de lésions cérébrales chez le fœtus de brebis de 90 jours alors qu'à l'âge de 120 jours ce traitement est responsable d'une atteinte de l'hippocampe période durant laquelle la neurogenèse est complète et que la myélinisation est amorcée. A cette étape particulière du développement, le cerveau de brebis, comparable à celui du nouveau-né humain à terme, est caractérisé par une maturation fonctionnelle des neurones corticaux et des récepteurs aux neurotransmetteurs impliqués dans les phénomènes de propagations de l'influx nerveux, une prédominance des synapses excitatrices (glutamate) sur celles inhibitrices (GABA) et un niveau métabolique important avec une consommation élevée en oxygène par les neurones. Ce changement de sensibilité à l'hypoxie-ischémie pourrait aussi résulter d'une plus grande vulnérabilité du système cardiovasculaire à cet âge. De même, les manifestations neuropathologiques de l'encéphalopathie hypoxique/ischémique, en particulier la sévérité des lésions, varient avec l'âge. Ainsi, les lésions présentes au niveau du cortex et du thalamus sont plus importantes chez les rats âgés de 24 à 26 mois que chez les jeunes rats de 3 à 4 mois (*Canese et al., 1998*).

L'hypothèse de cette tolérance relative suggère un faible métabolisme énergétique de ces jeunes animaux qui, en plus du glucose, utilise les composés cétoniques contrairement à l'adulte. (*Nehlig et Pereira de Vasconcelos.,1993 ; Vannucci et Vannucci.,2000*) Alors que chez l'adulte l'accumulation de lactate et l'acidose sont deux éléments critiques dans le devenir neurologique suite à une ischémie, chez le jeune animal, la participation de l'acidose dans le développement des lésions tissulaires semble moins probante. En effet, le cerveau immature possède la capacité de métaboliser le lactate grâce à une activité importante du lactate déshydrogénase (*Nehlig, 1993*). Cette propriété empêche d'une part l'accumulation d'acide lactique à un niveau toxique et d'autre part fournit une source d'énergie alternative au glucose. Par ailleurs, la production tissulaire excessive d'acide lactique observée dans des conditions hypoxiques-ischémiques chez le rat immature n'aggrave pas les lésions cérébrales (*Vannucci et al.,1994*).

II. L'hypoxie sévère

Ce phénomène est observé dans différentes pathologies notamment dans l'asphyxie périnatale. L'asphyxie périnatale demeure une complication relativement fréquente, avec une mortalité de l'ordre de 10 à 60% ainsi qu'une morbidité neurologique importante (25%). Elle représente la principale étiologie des lésions périnatales acquises et graves Son incidence est estimée entre 0,5 et 6‰ des naissances vivantes dans les pays développés, les formes modérées à sévères représentant environ la moitié à deux tiers des cas (*García-Alix et al.,2009*). L'agression hypoxique peut affecter de nombreux organes chez les nouveau-né à terme dont les systèmes cardiaque, pulmonaire, rénal et le système nerveux central. Par ailleurs, les effets de l'hypoxie ont surtout été étudiés dans le système nerveux central dont les conséquences sont généralement sévères et permanentes. Ainsi, il est retrouvé des séquelles neuropsychologiques incluant les retards mentaux, des disfonctionnements visuo-moteur ou visuo-perceptive, une hyperactivité, des paralysies cérébrales et des épilepsies (*Vannucci et Perlman.,1997*). De plus, il faut distinguer l'asphyxie périnatale et l'encéphalopathie hypoxique-ischémique (EHI) qui en est la conséquence. A noter qu'une EHI n'est pas forcément la résultante d'une asphyxie car d'autre pathologies (génétiques, neuromusculaire, métaboliques) y sont également associées.

1. L'asphyxie périnatale (*pour revue Fournié et al.,1999*)

L'hypoxie-ischémie se définit comme un déséquilibre entre les besoins en O_2 de l'enfant (particulièrement cérébrale) et les apports en O_2 maternel aboutissant à un phénomène d'asphyxie périnatale. La consommation d'un fœtus est deux fois plus importante que celle de l'adulte (6 mL/kg/min). La quantité d'oxygène disponible dans l'organisme fœtal est très faible et ne permet une autonomie que de 2 minutes pour un fœtus de 3 kg. Lors des contractions pendant le travail, le fœtus vient puiser l'O2 au niveau de la chambre intervilleuse dont les réserves peuvent être altérées par de nombreuses pathologies maternelles (vasculaires, constitutionnelles ou fœtales). Confronté à une hypoxie, le fœtus réagit d'abord en maintenant l'oxygénation de ses organes essentiels, le cerveau, le cœur, les surrénales et le placenta, grâce à des adaptations faisant appel à plusieurs mécanismes mais si

cela devient trop sévère, les mécanismes physiopathologiques se mettront en place ainsi que l'arrivé des premières lésions.

Au niveau cardiovasculaire, lorsque l'hypoxie devient sévère, la consommation d'oxygène ne peut plus être maintenue ; les mécanismes protecteurs sont dépassés. Il se développe une intense vasoconstriction du lit vasculaire et c'est à partir de ce moment que surviennent les lésions des autres organes. L'interruption des échanges va également entrainer une acidose respiratoire (augmentation de la pression partielle en CO_2). L'orientation du catabolisme glucidique vers la voie anaérobie provoque une accumulation d'acide lactique, laquelle conduit à une acidose métabolique.

Au niveau cérébrale, un cerveau fœtal consomme plus d'O_2 qu'un cerveau adulte (50% environ de plus). Mais il résiste mieux à l'hypoxie, probablement du fait de deux mécanismes : la capacité qu'a le cerveau de retarder, dans l'hypoxie, le largage du potassium intracellulaire dans l'espace interstitiel et une capacité plus importante du cerveau à fabriquer de l'ATP par la voie anaérobie. Dans le cas où la diminution en oxygène est trop importante (hypoxie sévère), dans un premier temps un processus d'autorégulation (biogène et neurogène) va maintenir une circulation cérébrale normale. L'augmentation des débits est plus importante au niveau du tronc cérébral, moins importante au niveau du cervelet et de la substance blanche du cortex pariétal parasagittal, notamment au niveau de l'interface des branches terminales des artères cérébrales moyennes et antérieures (*Longo et Packianathan.,1997*) d'où une plus grande sensibilité de ces zones. Secondairement, cette autorégulation entre la pression artérielle et le débit cérébral est perdu et entraine une diminution de la perfusion du cerveau. Dans la période périnatale, la diminution de l'apport en oxygène au niveau du tissu nerveux pourra être à l'origine d'une encéphalopathie hypoxique et ischémique ; l'ischémie étant liée à la diminution de la perfusion cérébrale. Du faites que le débit sanguin cérébral diminue graduellement, on retrouvera deux régions pathologiques distinctes : le foyer et la pénombre ischémique où la mort des cellules cérébrales est plus lente. En effet, l'apoptose est généralement observée dans des cas d'agression hypoxique modérée et, après ischémie, elle est essentiellement présente au pourtour de la région infarcie correspondant à la zone de « pénombre » (*Dickson et al. 1995*).

2. Conséquences de l'hypoxie-ischémie périnatale (*Pour revue Lai et al.,2011*)

Le développement des lésions cérébrales issu d'un épisode d'hypoxie-ischémie sévère est un processus évolutif qui perdurent jusqu'à la phase de reperfusion. Le mécanisme pathogénique sous-jacent à l'origine de lésions neurologiques est la privation de glucose et d'oxygène qui vont engendraient un déficit énergétique et déclenchaient ainsi une cascade d'événements biochimiques et cellulaires pour aboutir finalement à la mort des cellules (*Perlman.,2006 ; Volpe.,2008*). Par la suite, lors de la phase de reperfusion, il sera observé une augmentation de l'altération cérébrale via une amplification du phénomène de stress oxydant.

a. Déficit énergétique et accumulation de lactate

Du point de vue du métabolisme énergétique, il a été identifié des changements temporels à l'issu d'une hypoxie-ischémie. Ces deux stades sont les déplétions énergétique primaire et secondaire (*Lorek et al.,1994 ; Penrice et al.,1997 ; Kusaka et al.,2004 ; Vannucci et al.,2004*). La déplétion énergétique primaire se met place immédiatement après les lésions hypoxique-ischémique. Il est caractérisé par une forte diminution de la phosphorylation oxydative (ATP, phosphocréatine) dû au déficit en oxygène et qui va contrainte la cellule à passer à un métabolisme anaérobie d'où une production accrue de lactate et d'ions hydrogène. L'accumulation de ces deux composés est initialement profitable à la cellule via la production de NADH à partir du lactate mais la sévérité du phénomène va finalement conduire à des effets délétères. Les conséquences sont multiples : altération de l'autorégulation vasculaire, aggravation des lésions ischémiques, inhibition de l'activité de la phosphofructokinase consécutive au pH devenu acide et mise en place d'une cascade biochimique conduisant à des lésions cellulaires (*Johnston et al.,2001*). La survenue de la déplétion énergétique secondaire varie en fonction de la nature et de la sévérité de la lésion. Ainsi, les niveaux de phosphate énergétique retrouvent leur niveau physiologique 2 à 3 heures après la reperfusion et réoxygénation mais 48h après il a été observé une nouvelle diminution de ces composés (*Lorek et al.,1994 ; Penrice et al.,1997 ; Vannucci et al.,2004*). La diminution importante du contenu en ATP va entrainer un disfonctionnement des pompes sodium potassium ATP dépendante dont la fonction première est de maintenir la polarité de la membrane neuronale. Cela va engendrer une perturbation des échanges ioniques illustré par une dépolarisation membranaire, une accumulation extracellulaire d'acides aminés excitateurs, une entrée d'ions calcium et sodium accompagnée d'eau, l'activation de la phospholipases et la génération de radicaux libres.

b. Excitotoxicité et œdème cytotoxique

La déplétion énergétique secondaire va favoriser la dépolarisation neuronale et gliale. Dans ces conditions, les canaux calciques voltages-dépendants se trouvent activés, facilitant ainsi la libération de glutamate dans l'espace extracellulaire (*Katsura et al.,1994*). L'élévation de la concentration en glutamate est d'autre part consécutive à l'altération de sa recapture présynaptique, elle aussi dépendante de mécanismes consommateurs d'énergie (*Dirnagl et al.,1999*). D'une part l'augmentation de la concentration de glutamate extracellulaire et l'activation des récepteurs du glutamate, après hypoxie-ischémie va déclencher une cascade excitotoxique. Depuis ces vingt dernières années, beaucoup d'études ont démontré le rôle critique du glutamate comme médiateur de la mort neuronale dans les lésions hypoxie-ischémie (*Choi et Rothman.,1990 ;Barks et Silverstein.,1992 ; McQuillen et Ferriero.,2004*). L'action des différents récepteurs au glutamate (NMDA, AMPA), les canaux calciques voltages dépendants et la libération de calcium issu du réticulum endoplasmique vont augmenter la concentration intracellulaire de calcium. Les effets délétères de cette élévation du taux de calcium sont nombreux et vont inclure l'activation de la NO synthétase inductible (iNOS), la génération de radicaux libres, la dégradation des lipides membranaires, des protéines et de l'ADN via l'activation de phospholipases, protéases et endonucléases et des altérations du métabolisme mitochondriale (*Ankarcrona et al.,1995 ; Ferriero et*

al.,1996 ; Gilland et al.,1998). L'augmentation de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale va provoquer la libération du cytochrome C, des caspases 9 et 3 l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) qui vont conduire la cellule en apoptose (*Hagberg et al.,2009*). Autre mécanisme issu des perturbations des échanges ioniques va entrainer la formation d'un œdème cytotoxique. En l'absence d'ATP, les canaux sodique et potassique ATP dépendant vont être perturbés et la membrane cellulaire ne va plus jouer plus son rôle, entraînant une entrée de sodium et de potassium accompagné d'une entrée d'eau qui va entrainer un gonflement cellulaire formant un œdème cytotoxique et conduire la cellule à sa mort

c. La mort cellulaire : nécrose et apoptose

Le mécanisme de mort cellulaire neuronale après une hypoxie-ischémie comprend la nécrose et l'apoptose et celle-ci est principalement dépendante de la sévérité de la lésion et de l'état de maturation des cellules. Des études ont montré qu'il existait un continuum entre la nécrose qui apparaissait précocement par rapport à l'apoptose (*Northington et al.,2001 ; Northington et al.,2007*). Comme cela a été cité précédemment, la déplétion en ATP va induire un gonflement cellulaire par une entrée de sodium, potassium et d'eau dans la cellule. Ce phénomène conduisant à la lyse cellulaire donc à une nécrose se produira plus généralement lors d'une lésion sévère. Dans le cas contraire, il sera observé une excitotoxicité et une augmentation du stress oxydant amenant la cellule à une mort cellulaire programmée. De plus, il a été montré dans un modèle cellulaire in vitro soumis à une hypoxie sévère que les neurones sur-exprimaient des protéines inhibitrices de la progression du cycle cellulaire (p21,p53) ainsi que des protéines effectrices de l'apoptose (Bax,caspase) (*Bossenmeyer-Pourié et al. ,2002*). Le mécanisme apoptotique est plus souvent rencontré que la nécrose dans le cerveau périnatale. Face à l'hypoxie-ischémie, les cellules gliales seraient moins sensibles que les neurones (dans l'ordre neurone > oligodendrocyte >astrocyte > microglie) (*Salford et al.,1973*). Localement, la sensibilité des neurones est différents car les cellules pyramidales de l'hippocampe (Mitani et Kataoka.,1991), certains neurones du striatum (*Obrenovitch et al.,1993*) et du cortex cérébral (*Shimada et al.,1993*) seraient les plus affectés par une hypoxie-ischémie.

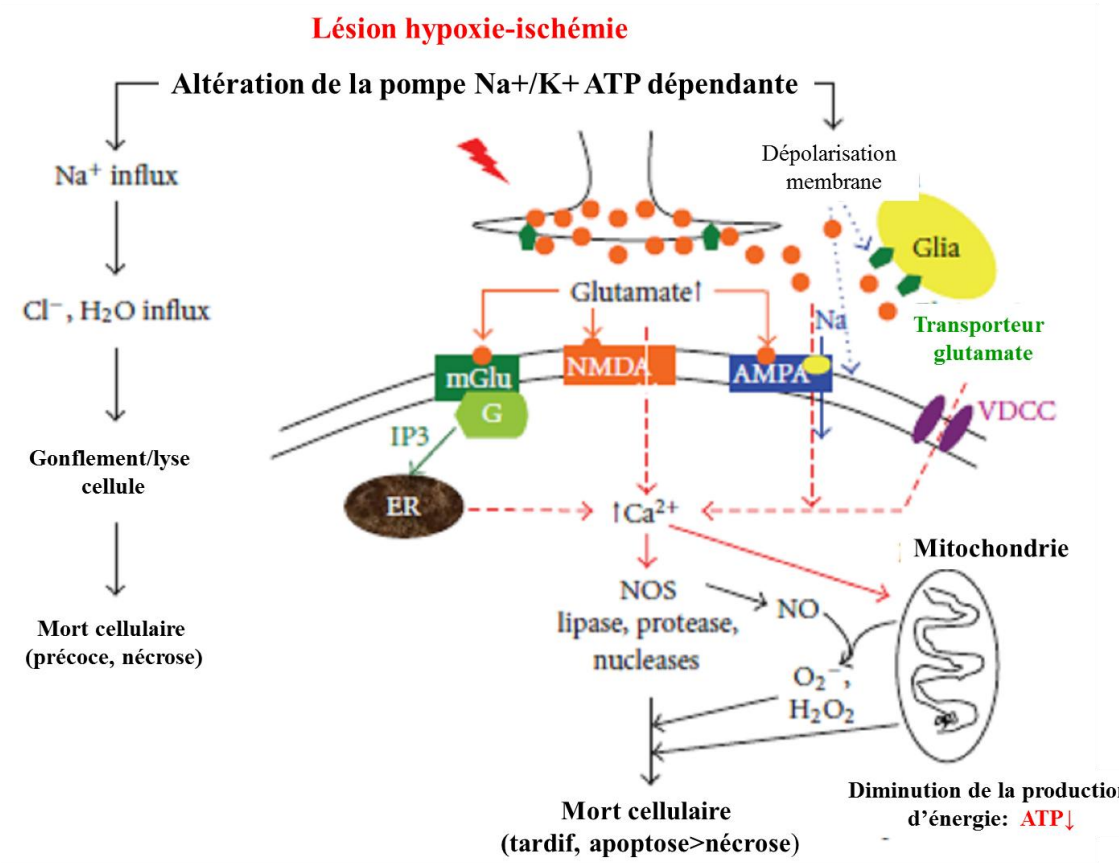


Figure 25 : Mécanisme cellulaire issu d'une hypoxie-ischémie (*D'après Lai et Yang.,2011*).mGlu : récepteur métabotropique au glutamate ;G :protéine G ;IP3 :inositol triphosphate ;ER :réticulum endoplasmique ;NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique ;AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate ;VDCC : Voltage-dependent calcium channels

III. Le préconditionnement

Le terme de préconditionnement (PC) désigne le processus par lequel l'exposition d'un organisme, d'un organe ou d'une cellule à un stress modéré le (ou la) protège par la suite d'un stress du même type mais beaucoup plus important. Selon le stimulus utilisé lors du préconditionnement notamment au niveau cérébral, le niveau de tolérance neuronale s'exerce à travers deux profils temporels :

- un dans lequel le stimulus induit une protection en quelques minutes (tolérance rapide ou aigu) (*Perez-Pinzon et al.,1997*)
- l'autre dans lequel une protection se met en place après un délai de plusieurs heures voir de plusieurs jours (tolérance retardée) (*Kitagawa et al.,1990*).

Par exemple dans le préconditionnement ischémique, on peut retrouver ces deux profils en même temps ou bien l'un ou l'autre *(Stagliano et al., 1999 ; Perez-Pinzon et Born .,1999 ; Kariko et al.,2004 ; Hoyte et al.,2006*). La phase aigu aurait probablement pour origine une modification post-traductionnelle rapide des protéines (*Nakase et al.,2000 ; Meller et al.,2006*) alors que la phase retardée serait dépendante de la synthèse *de novo* des protéines et d'ARN (*Bossenmeyer et al.,1998 ;Kirino.,2002 ; Stenzel-Poore et al.,2003*).

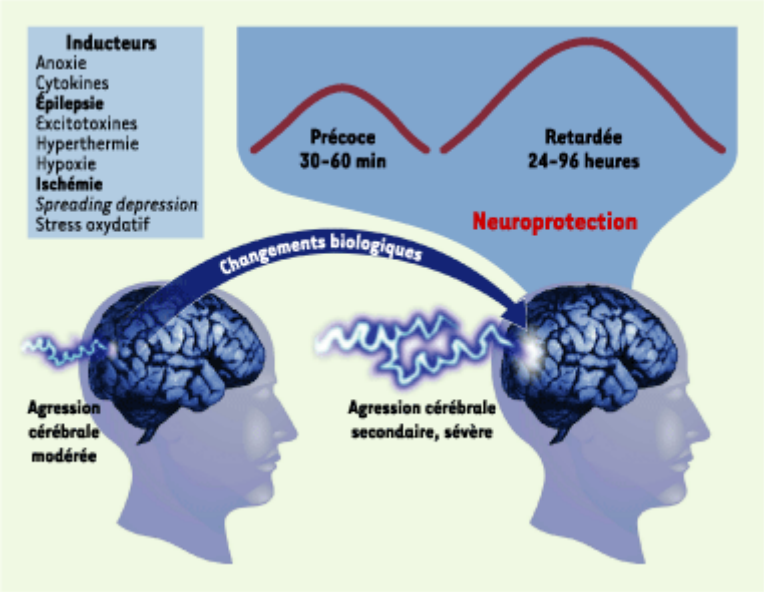


Figure 26 : Critères définissant les concepts du préconditionnement et de la tolérance cérébrale (*D'après Blondeau et Heurteaux.,2004*)

1. Les principaux types de préconditionnements cérébraux (*Pour revue Shpargel et al.,2008*)

a. L'ischémie

Le préconditionnement ischémique global est généralement réalisé après l'occlusion des artères carotides. Par contre dans le préconditionnement ischémique focal, il s'agit de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne pendant environ 1 à 20 minutes, temps qui varie en fonction de la méthode choisie et de l'espèce animal utilisée (*Kitagawa et al.,1990 ; Corbett et Crooks.,1997 ; Barone et al.,1998 ; Wu et al.,2001*). 24 heures après le préconditionnement ischémique, un accident vasculaire cérébral est provoqué chez ces animaux. Ce type de préconditionnement induit une neuroprotection observée en termes de volume de l'infarctus mais également en termes de scores neurologiques et d'études comportementales.

b. Les lipopolysaccharides

Une tolérance à une lésion ischémique peut être aussi induite par l'injection dans la cavité péritonéale d'une petite dose de lipopolysaccharides (LPS). Les doses administrées varient de 0.05 à 1mg/kg chez les petits rongeurs comme les rats ou les souris et n'engendrent pas de signes anormaux chez ces animaux (*Tasaki et al.,1997 ; Dawson et al.,1999b ; Ahmed et al.,2000 ; Rosenzweig et al.,2004 ; Furuya et al.,2005*). La protection qui en résulte réduit le volume de l'infarctus d'environ 30%. Cet état est maintenu environ une semaine avec une protection maximale qui survient 2-3 jours après l'injection de LPS.

c. L'hypoxie

Une méthode facile à utiliser est le préconditionnement des animaux exposés à une hypoxie. Les animaux sont mis dans une chambre dans laquelle les proportions d'oxygène et d'azote peuvent être contrôlées ainsi que le temps d'exposition. La concentration d'oxygène utilisée est habituellement comprise entre 8 et 13% en condition normobare durant 1 à 6 heures. 24h à 72h plus tard, il est pratiqué une ischémie focal transitoire ou permanente (*Miller et al.,2001 ;Bernaudin et al.,2002 ; Kulinskii et al.,2002 ; Prass et al.,2003*). On peut voir les premiers effets du préconditionnement hypoxique 1 à 3 jours après l'ischémie avec une réduction significative de la taille de l'infarctus. Ce type de préconditionnement a également été pratiqué dans des cultures de neurones *in vitro* avec en plus de l'hypoxie, une privation de glucose (*Liu et al.,2000*).

d. L'acide 3-nitropropionique (3-NP)

Cet acide est un inhibiteur irréversible de la succinate déshydrogénase, une enzyme nécessaire à la phosphorylation oxydative et à la production d'adénosine triphosphate (ATP).Administré à de faibles doses (1 à 20mg/kg) 1 à 4 jours avant l'ischémie, le 3-NP permet une neuroprotection notamment dans le prosencéphale de gerbilles ou de rats (*Sugino et al.,1999 ; Kuroiwa et al.,2000 ; Horiguchi et al.,2003*). Un tel traitement améliore de manière significative la survie neuronale dans la région CA1 de l'hippocampe. En outre, le préconditionnement au 3-NP induit également une tolérance à l'hypoxie dans des préparations de coupes d'hippocampe (*Riepe et al.,1996 ; Aketa et al.,2000*).

e. L'hypothermie et l'hyperthermie

L'hypothermie est un phénomène bien connu et bien caractérisé dans ses effets neuroprotecteurs lors d'interventions neurochirurgicales. Il est également rapporté qu'une exposition brève à une hypothermie ou hyperthermie conduit à une tolérance ischémique. Les températures utilisées varient de 25 à 32°C en hypothermie et de 42 à 43°C lors d'hyperthermie (*Nishio et al.,1999 ;Nishio et al.,2000 ; Yunoki et al.,2003*).

f. Le Cortical spreading depression et les anesthésiques

Le cortical spreading depression ou dépression corticale propagée est un phénomène électrophysiologique qui correspond à une vague de dépolarisation corticale s'étendant par contigüité à la substance grise cérébrale. Elle s'accompagne d'une inhibition transitoire de l'activité neuronale durant quelques minutes. Habituellement, 5 M de chlorure de potassium est infusé dans le cortex où il est mis en place un coton imbibé de cette solution à la surface de la dure-mère ce qui entraine une dépolarisation des neurones et la propagation de la dépression corticale. Ce préconditionnement induit une phase prolongée de la tolérance ischémique qui dure 1 à 7 jours (*Kawahara et al.,1995 ; Taga et al.,1997 ; Yanamoto et al.,1998 ; Kawahara et al.,1999*). L'exposition aux anesthésiques volatils comme l'isoflurane ou l'halothane dans des concentrations pharmacologiques adéquates confère une phase de tolérance ischémique retardée (*Baughman et al.,1988*). D'autres modèles de

préconditionnement existent comme l'injection de glutamate ou de ces dérivés agonistes (*Bhave et al.,1999*), l'induction de convulsion de type épilepsie (*Plamondon et al.,1999)* ou de privation d'oxygène/glucose (*Goldberg et Choi.,1993*).

2. Les mécanismes cellulaires et moléculaires dans la tolérance cérébrale

a. Les récepteurs au glutamate et l'excitotoxicité

L'ischémie cérébrale entraine un épuisement rapide des réserves énergétiques qui déclenche une cascade complexe d'événements cellulaires tels que la dépolarisation cellulaire, un influx entrant de Ca^{2+} qui sont à l'origine de la mort cellulaire par excitotoxicité (*Ginsberg.,2003 ; Hossmann.,2006*). Le rôle des récepteurs NMDA dans le préconditionnement est étayé par des études portant sur l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs qui altèrent la mise en place de la tolérance cérébrale (*Kato et al.,1992 ; Kasischke et al.,1996 ;Grabb et Choi.,1999*). Par ailleurs, l'exposition à des doses sub-léthales de NMDA fournit une protection supplémentaire aux neurones contre la mort cellulaire soumis à des stimuli appliqués en aval (*Bhave et al.,1999*). Au contraire, le préconditionnement ischémique appliqué 24 h avant un stress excitotoxique ne permet pas réduire la mort cellulaire par cette application de NMDA, kaïnate ou glutamate (*Grabb et Choi.,1999*). Il a été également observé une diminution de la régulation de l'ARNm du récepteur au glutamate, ionotropique delta2, dans le cerveau de souris après préconditionnement (*Lin et al.,2008*). En revanche, la fixation de la [3H] muscimole au récepteur GABA A des neurones de la couche CA1 de l'hippocampe est transitoirement augmenté après préconditionnement mais pas après des lésions ischémiques (*Sommer et al.,2002*). Ces résultats suggèrent que le préconditionnement pourrait entrainer un changement de l'équilibre entre phénomène excitotoxique et mécanismes inhibiteurs de telle façon que ce sont les forces pro-inhibitrices qui sont majoritaires dans le cerveau tolérant. De même, il a été montré dans une autre étude que le préconditionnement au glutamate présentait une meilleure résistance aux dommages induits par une privation d'oxygène et de glucose mais cela était dépendant de la durée d'exposition au préconditionnement et de l'intervalle de temps qui le séparait du traitement délétère. (*Lin et al.,2008*)

b. Lutte contre le stress oxydatif

L'ischémie cérébrale est connu pour induire la production de radicaux libres oxygénés et azotés qui sont responsable des lésions observées dans le cerveau ischémique (*Carbonell et Rama.,2007*). Les ions superoxyde peuvent être générés notamment par l'action de la xanthine oxydase, des fuites dans la chaine de transport mitochondriale des électrons ou via l'action d'autres oxydases (*Cadet et Brannock.,1998*). Le monoxyde d'azote (NO) peut être produit par l'action de la NO synthase dont l'activation lors de lésions ischémiques dépend de l'activation des récepteurs au glutamate. Il peut aussi réagir avec l'ion superoxyde pour donner l'anion peroxynitrite qui est un agent oxydant et nitrant puissant (*Guix et al.,2005*). Certaines études ont suggéré que le préconditionnement pouvait exercer ses effets protecteurs en empêchant la production de ces radicaux libres ou en inhibant leurs effets toxiques sur le cerveau (*Busija et al.,2008*). On peut citer le préconditionnement ischémique qui augmentent

en d'autres la superoxyde dismutase (*Toyoda et al.,1997*) ou le préconditionnement à des anesthésiques volatiles via la NO synthase inductible (*Kapinya et al.,2002*) ou l'hème oxygènase 1 (HO-1) (*Li et al.,2008*).

c. La voie des protéines kinases

Au niveau cardiaque, l'activation des kinases jouent un rôle prépondérant dans le phénomène de tolérance (*Costa et Garlid.,2008*) mais on les retrouve également au niveau cérébrale. Ainsi, il a été observé que 3 minutes de préconditionnement ischémique augmentait la phosphorylation des kinases MEK 1/2 et ERK 1/2 dans l'hippocampe de rat (Shamloo et al.,1999). En outre l'augmentation de la phosphorylation d'ERK 1/2 était toujours présente après 9 minutes d'ischémie aussi bien chez les animaux témoins que les animaux préconditionnés mais revenait à un niveau normal seulement chez les animaux traités 24 heures après les lésions ischémiques (*Shamloo et al.,1999*). Ces résultats ont été confirmé dans d'autres études (*Choi et al.,2006*) ou lors d'un préconditionnement à l'hypoxie (*Pourié et al.,2006*). Des études *in vitro* ont également montré une activation de la cascade Ras régulé par le NO dans le développement de la tolérance à une privation oxygène/glucose. L'activation d'ERK5 participerait également aux effets protecteurs d'un préconditionnement ischémique (*Wang et al.,2005b ;Wang et al.,2006).* Autres kinases impliquées dans la neuroprotection serait les protéines kinases C epsilon, alpha et delta (*Kurkinen et al.,2001a ; Kurkinen et al.,2001b ;Lange-Asschenfeldt et al.,2004*)

d. Les facteurs de transcription

Les lésions ischémiques sont associés à l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription (*Walton et al.,1996*). Dans le cadre de réponse adaptatives à l'ischémie, les facteurs impliqués sont par exemple l'Activator protein 1 (AP-1) (*Salminen et al.,1995*), la cyclic AMP responsive element binding protein (CREB) (*Walton et al.,1996*) et les Hypoxia inducible factor (HIFs) (*Bergeron et al.,2000*).

Les hétérodimères AP-1 sont impliqués dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (*Shaulian et Karin.,2002*) et comprennent c-fos, fra-1 et 2, fosB, c-jun, JunB et D (*Verde et al.,2007*). De nombreuses études ont montré que les lésions ischémiques étaient associées à des changements significatifs de leur expression où pour la plupart on retrouve une augmentation (*Kiessling et al.,1993 ;Whitfield et al.,1999 ; Kapinya et al.,2000; Dhodda et al.,2004*).

Les lésions ischémiques sont également associées à la phosphorylation de CREB et l'augmentation de son expression (*Walton et al.,1996 ; Hu et al.,1999*). CREB est nécessaire pour la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (*Carlezon et al.,2005*). Dans le cerveau, l'expression de CREB participe également à l'apprentissage et à la mémoire (*Lonze et Ginty.,2002*). CREB est très important dans le couplage stimulus-transcription et dans l'expression génique via des récepteurs médiés (*Carlezon et al.,2005*). Ces changements sont entre d'autres médiés par les récepteurs au glutamate et l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Cette voie est probablement impliquée dans le préconditionnement ischémique où l'on

retrouve une augmentation de la phosphorylation de CREB (*Mabuchi et al.,2001 ; Lee et al.,2004 ; Rybnikova et al.,2008*). De plus, ces résultats sont appuyés par des travaux utilisant des inhibiteurs de CREB ou la tolérance ischémique est altérée (*Hara et al.,2003*).
HIF-1 est un facteur de transcription agissant dans tous les tissus et est régulé par l'absence d'oxygène (*Cassavaugh et Lounsbury.,2011*). HIF-1α peut avoir comme partenaire HIF-1β et ce dimère est transloqué dans le noyau pour réguler l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation hypoxique (*Wang et al.,1995*) et dans lequel on peut observer son expression augmentée dans des cerveaux hypoxiques (*Chavez et La Manna al.,2002*). Des traitements à la desferrioxamine qui a une action neuroprotectrice dans des modèles d'ischémie aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, maintient le taux d' HIF-1α (*Zaman et al.,1999 ; Hamrick et al.,2005*).

e. Les protéines chaperonnes

Les protéines chaperonnes sont connus pour être impliqués dans des mécanismes de protection contre toutes sortes de lésions y compris l'ischémie cérébrale (*Brown.,2007*) et de nombreuse études ont porté sur leurs rôles dans le préconditionnement. Par exemple, il a été rapporté l'induction des protéines de choc thermique 70 (HSP 70), 27, 40 et B2 lors d'un préconditionnement ischémique chez le rat ou la souris (*Liu et al.,1993 ;Tanaka et al.,2002; Dhodda et al.,2004*). Il en est de même pour ceux de la famille des HSP 110, ischemia responsive protein 94 (Irp94), HSP110/105 et osp94/apg-1 (*Kato et al.,1994 ;Chen et al.,1996 ;Yagita et al.,2001*). Tous ces résultats montrent que les HSP jouent un rôle très important dans les effets protecteurs observés après un préconditionnement. Certains de ces changements se produiraient également dans les astrocytes afin de libérer plusieurs facteurs susceptibles de protéger les neurones (*Brown.,2007*).

f. Les réponses neuroinflammatoires

Les accidents vasculaires cérébraux sont accompagnés de réactions inflammatoires qui participeraient aux altérations de la survie neuronale (*Wang et al., 2007*). Le préconditionnement aux lipopolysaccharides atténue fortement la réponse inflammatoire dans le cerveau et la circulation sanguine suite à une ischémie (*Rosenzweig et al.,2004*). De plus il a été observé une implication des cellules gliales qui protègeraient et aideraient même à la régénération du tissu cérébral après une lésion (*Benarroch.,2005*). Autre cellule gliale, la microglie subit une transformation morphologique et sécrète un certain nombre de substances qui participent à des mécanismes protoxiques ou protecteurs (*Kim et de Vellis.,2005; Dheen et al.,2007*). De plus, en utilisant un antibiotique de la familles des tétracyclines, la minocycline permet une protection actif contre l'activation des cellules migrogliales lors de lésions ischémiques (*Yrjanheikki et al.,1998; Yrjanheikki et al.,1999*). Par ailleurs, des facteurs secrétés par la microglie protègeraient des dommages causés par le glutamate (*Watanabe et al.,2000*). Ainsi, il serait intéressant d'approfondir les investigations pour connaitre le rôle de la microglie dans le cerveau préconditionné.

g. Les facteurs trophiques

Les facteurs de croissance dont impliqués dans la croissance des neurites et dans la survie cellulaire (*Bibel et Barde.,2000*). Ces facteurs neurotrophiques inclus notamment le Brain

derived neurotrophic factor (BDNF) et la neurotrophine-3 (NT-3) sont présents à des concentrations élevées dans l'hippocampe et le cortex cérébral (*Chao.,2003*). Les voies intracellulaires utilisées par ces facteurs dépendent de leur interaction avec leurs récepteurs tyrosine kinase : TrkA pour le Nerve growth factor (NGF), TrkB pour le BDNF et TrkC pour la NT-3 (*Chao.,2003 ; Huang et al.,2003*). Suite à une ischémie, les taux de NGF et de BDNF sont diminués dans les neurones hippocampiques ce qui n'est pas le cas pour la NT-3 (*Merlio et al.,1993 ; Lindvall et al.,1999*) alors que pour les récepteurs, seul le TrkB est augmenté dans l'hippocampe (*Merlio et al.,1993*). Ces résultats confirment les données suggérant que le NGF et le BDNF protégeraient les neurones de la couche CA1 de l'hippocampe contre les dommages cellulaires ischémiques (*Tanaka et al.,1994 ;Beck et al.,1994 ; Shigeno et al.,1991*). Ainsi il a été constaté une augmentation des taux de NGF et de BDNF lors du préconditionnement ischémique (*Truettner et al.,2002*).

h. Autres mécanismes

D'autres études ont mis en évidence des mécanismes impliqués dans la mise en place de la tolérance cérébrale (*Stenzel-Poore et al.,2003 ; Stenzel-Poore et al.,2004*). Ainsi, la tolérance à court terme pourrait être dépendante de l'activation de la voie ubiquitine-protéasome (*Meller et al.,2006*). Des données basées sur des puces à ADN ont révélées que l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, l'apoptose, le stress cellulaire et la transduction du signal était augmenté lors d'une ischémie (*Stenzel-Poore et al.,2003*). En revanche, ces même gènes seraient régulés négativement lors du préconditionnement cérébral. De plus d'autres travaux ont montré que le préconditionnement ischémique était associé avec une augmentation de Bcl-2, Bid et caspase 2 (*Dhodda et al.,2004*). L'augmentation de Bcl-2 serait probablement médié par l'activation de CREB (*Meller et al.,2005*) et serait également retrouvé dans des modèles *in vitro* de préconditionnement au glutamate (*Lin et al.,2008*).
Enfin il a été rapporté une augmentation de Smad 1, Smad 7, du TGF-α et TGF-β lors du préconditionnement ischémique (*Dhodda et al.,2004*).

IV. Stimulation d'une neurogenèse par un conditionnement hypoxique néonatal

1. La neurogenèse

a. La neurogenèse embryonnaire

Toutes les cellules constituant le SNC dérivent du neuroectoderme, à l'exception de la microglie. Les neurones, astrocytes et oligodendrocytes dérivent d'un précurseur commun, un type cellulaire multipotent présent dans le neuroépithélium (*Alvarez-Buylla et al., 2001*). Ce précurseur est considéré comme une cellule souche neurale (CSN) possédant toutes les caractéristiques des cellules souches : un auto-renouvellement, une capacité de prolifération illimitée et une capacité de générer les différents types cellulaires qui constituent le tissu dont elles sont issues. Les CSN sont produites au cours de la vie fœtale et chez l'adulte dans certaines régions du cerveau. Ces cellules prolifèrent par division asymétrique pour donner une cellule souche identique à la cellule mère et des cellules post-mitotiques qui peuvent alors se différencier en neurone, astrocyte ou oligodendrocyte. (**Figure 27**)

Des expériences d'inactivation génique réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence l'existence de gènes s'exprimant durant la phase de différenciation. Ces gènes codent des protéines dites à hélice-boucle-hélice (bHLH) caractéristiques des facteurs de transcription. L'expression de gènes précoces responsables de la spécification d'une cellule indifférenciée vers les lignées neuronales (Mash1 homologue d'achaete-scute chez la drosophile, neurogénine et Math1 homologues d'atonal) induisent la spécification cellulaire (l'entrée dans la phase de différenciation) (*Ishibashi., 2004*), et l'expression de gènes plus tardifs (NeuroD et Math2) permet l'accomplissement de la phase de différenciation. L'inactivation de ces gènes provoque une différenciation accélérée. Il semble que ces gènes (dont Hes1 et Hes5) exercent une action inhibitrice sur la phase de différenciation, réprimant (directement ou indirectement) l'expression des gènes de spécification neuronale précoces (*Castella et al., 1999*). La différenciation des CSN en neurones fait également intervenir le contrôle extracellulaire impliquant la voie Notch-Delta. Dans une première étape, Notch agit sur l'alternative neurone/cellule gliale en réprimant la voie neuronale et en favorisant la voie gliale. Dans une seconde étape, Notch agit sur les progéniteurs en réprimant la différenciation des neurones et oligodendrocytes et en stimulant celle des astrocytes (*Zhou et al., 2010*). Les cellules souches du système nerveux central présentent des propriétés semblables, que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte. Elles se multiplient en réponse à des facteurs mitogènes tels que bFGF, EGF (*Mondal et al., 2004*) et BDNF (*Lee et Son., 2009*). Les cellules souches neurales s'engagent dans une voie de différenciation neuronale, par défaut, en l'absence de ces facteurs mitogènes.

b. La neurogenèse adulte

Depuis plus d'un siècle, on s'accordait à dire que les cellules nerveuses du cerveau adulte des mammifères, si elles étaient endommagées ou si elles mouraient, n'étaient pas remplacées, contrairement aux autres cellules de l'organisme (*Ramón y Cajal., 1928*). En d'autres termes, on tenait pour un dogme le fait qu'il ne se développait pas de nouveaux neurones dans le cerveau adulte. On considérait que les individus naissaient avec leur stock maximal de neurones, et celui-ci ne faisait que décroître tout au long de notre vie, malgré le foisonnement de nouvelles connexions qui, elles, pouvaient toutefois se développer jusqu'à la mort. Comme initialement décrit dans les travaux de Josef Altman en 1965 (*Altman.,1962*) puis redécouvert au début des années 1990, certaines régions du cerveau (la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe et la zone subventriculaire qui borde le ventricule latéral) des mammifères, y compris l'être humain, (*Eriksson et al., 1998*) maintiendraient leur capacité de produire de nouveaux neurones durant toute la vie (**Figure 27**). A ce titre, la neurogenèse adulte hippocampique présente beaucoup de similitudes avec le développement neuronal embryonnaire, mais dans des conditions établies dans le cerveau adulte. En effet, la neurogenèse adulte est issue de cellules précurseurs neurales dans l'hippocampe adulte représentant un exemple particulier de la façon dont les nouveaux neurones se développent dans un environnement appelé « niche ». La niche se définit comme le microenvironnement qui soutient et régule le comportement des cellules souches comprenant leur maintien, leur auto-renouvellement, leur différenciation et leur développement (*Morrison et Spradling, 2008 ; Ma et al., 2009*). La structure des niches diffèrent selon leur localisation. En effet, la niche de la ZSV s'étend du ventricule latéral au cordon de migration rostral qui prend fin au niveau

du bulbe olfactif, alors que la niche de la ZSG hippocampique est moins évidente d'un point de vue structural et se situerait dans le hile de la ZSG (*Seri et al.,2004*). La composition cellulaire des niches est variée : des astroglies, des épendymocytes, des cellules vasculaires, des précurseurs immatures descendant des cellules souches neurales adultes et des neurones matures (*Ma et al., 2009*). Il est à noter que les deux régions germinatives contiennent également des vaisseaux sanguins (*Palmer et al., 2000 ; Mercier et al., 2002*), suggérant, selon certains auteurs, que des facteurs issus de la vascularisation pourraient réguler les cellules souches et leur descendance.
Dans le gyrus denté, les principaux neurones excitateurs, à savoir les cellules granulaires, continuent à être générées à partir des cellules souches neurales et des cellules progénitrices de la zone subgranulaire pendant toute la vie. Alors que les cellules issues de la zone subventriculaire vont migrer via deux cordons migratoires :
-un cordon migratoire antérieur en direction du bulbe olfactif (*Reynolds et Weiss., 1992*) où les cellules se différencient en deux types d'interneurones ;
- un cordon migratoire postérieur en direction de la couche CA1 de l'hippocampe qui a été découvert suite à l'exposition à une hypoxie brève (*Pourié et al., 2006*).

Dans les premières études, les cellules en prolifération dans le cerveau adulte ont été marquées à la thymidine tritiée puis mise en évidence par une détection autoradiographique (*Altman et Das, 1965 ; Kaplan et Hinds, 1977*). Une des difficultés de l'époque était que le phénotype neuronal des cellules nouvellement générées ne pouvait pas être caractérisé précisément. C'est quelques années plus tard qu'il a été mis en évidence la polysialylated form of neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) dans le gyrus denté (*Seki et Arai., 1993*). Enfin, au début des années 90, les premiers travaux utilisant le BrdU, un analogue de la thymidine initialement utilisé dans les études de développement) ont permis de mettre en évidence la neurogenèse adulte. Ces travaux ont été ensuite complétés par l'immunohistochimie et de la microscopie confocale afin de déterminer le phénotype des cellules nouvellement formées.

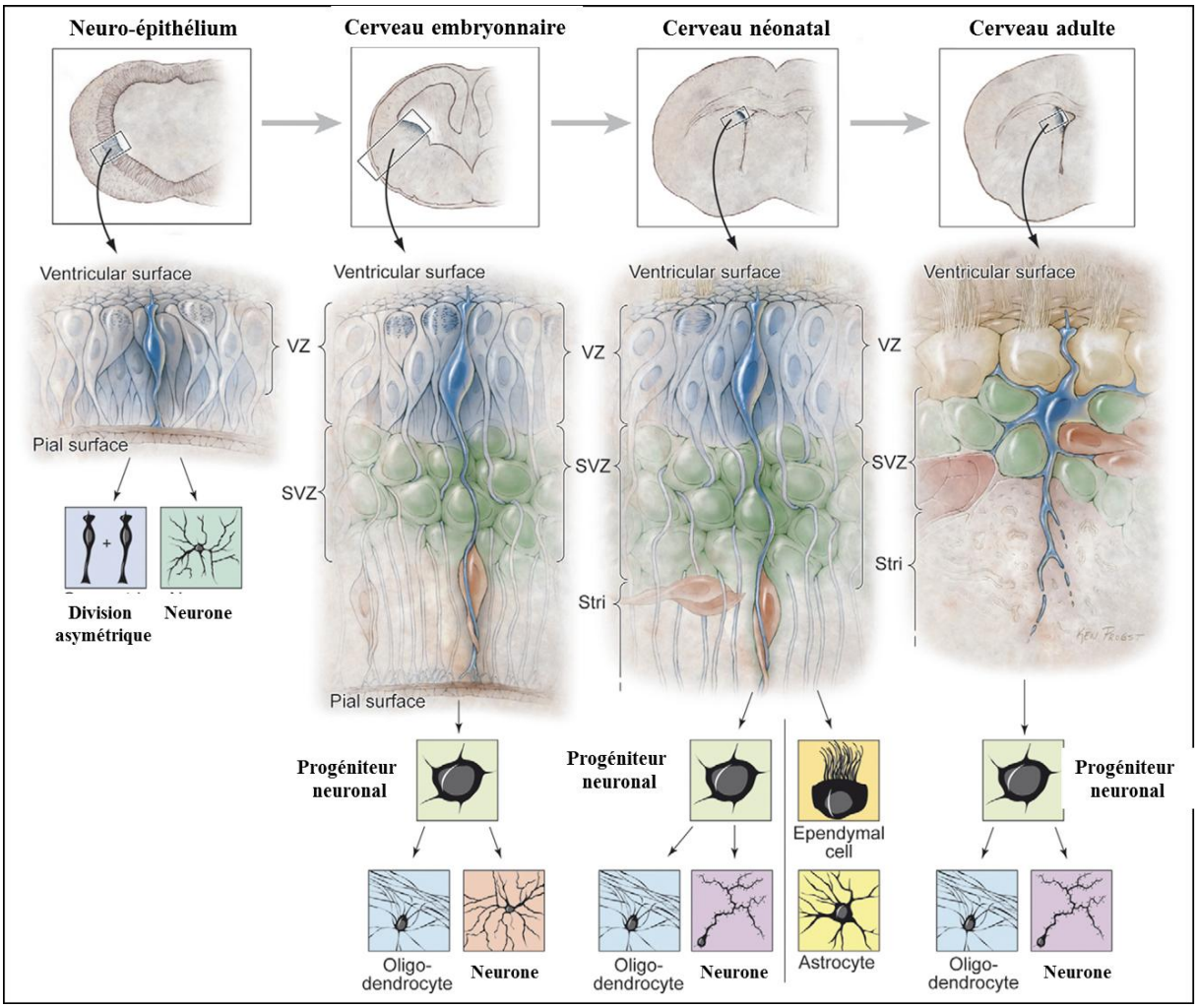


Figure 27 : La neurogenèse à différents stades du développement et de la vie. VZ : zone ventriculaire ; SVZ : zone subventriculaire ; Stri : striatum (*D'après Merkle et Alvarez-Buylla.,2006*)

2. Le conditionnement hypoxique néonatal

Les premiers travaux décrivant le préconditionnement ont été réalisés par Gidday et al (1994). Ils ont montré que l'exposition d'un raton de 7 jours sous 8% d'oxygène pendant 3 heures suivi un jour plus tard d'une hypoxie-ischémie produisait une protection marquée dans le cerveau. Ce préconditionnement a été ensuite testé sur différentes espèces qui toutes n'ont pas présenté de lésions cérébrales. Ces travaux ont été par la suite confirmés. (*Vannucci et al.,1998*). Plusieurs caractéristiques essentielles du préconditionnement hypoxique ont été décrites comme une dépendance de la synthèse de nouvelles protéines et d'ARN qui est une des caractéristique de la tolérance retardée ou une insensibilité aux antagonistes du glutamate contrairement au préconditionnement ischémique (*Gidday et al.,1999*). Beaucoup de molécules induites par l'hypoxie sont connus pour avoir des effets protecteurs comme l'EPO, le VEGF ou d'autres dont le principale activateur est le facteur de transcription HIF-1 (*Bernaudin et al.,2002*). HIF-1 est connu comme le facteur de transcription le plus important

dans l'expression de gènes en réponse à l'hypoxie mais qui est rapidement dégradé par le protéasome lors d'une normoxie (*Sharp et Berbaudin.,2004*). Autre caractéristique de l'hypoxie, quand elle est modérée, celle-ci n'induit pas de mort cellulaire (*Simon.,1999 ; Tang et al.,2003*) dans le cerveau mais au contraire elle stimulerait le phénomène de neurogenèse. En effet, des travaux in vitro portant sur un modèle de neurones embryonnaires ont montré que si ces cellules subissaient un stress hypoxique modéré (3 heures,95% N_2 et 5% CO_2) la viabilité cellulaire était augmentée contrairement à des cellules traitées par une hypoxie plus sévère (6 heures,95% N_2 et 5% CO_2). Non seulement la viabilité était augmentée mais il a été observé des cellules en mitose pendant l'hypoxie brève alors que la majorité des cellules était en nécrose ou en apoptose lors de l'hypoxie sévère. D'un point de vue moléculaire, l'hypoxie modéré induisait des protéines anti-apoptotiques permettant la sauvegarde des cellules ainsi que l'activation de facteurs tels que le Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), un cofacteur de l'ADN polymérase, signe d'une stimulation de la prolifération cellulaire (*Bossenmeyer-Pourié et al.,2000*). Ces résultats ont été par la suite validés dans un modèle *in vivo*. En effet, il a été montré qu'une brève hypoxie néonatale qui ne semblait pas induire de lésions apoptotiques, déclenchait au contraire une neurogenèse importante dans les semaines qui ont suivi ce stimulus. Ce modèle a également pu mettre en évidence une nouvelle voie neurogénique où les cellules néoformées issues de la ZSV ne migraient pas seulement en direction du bulbe olfactif (cordon de migration antérieur) mais également en direction de la couche CA1 de l'hippocampe (cordon de migration postérieur) (*Daval et al., 2004*) (**Figure 28**). L'intégration de ces nouvelles cellules a été corrélée avec une amélioration du score mnésique chez les jeunes adultes ayant subi l'hypoxie brève par rapport aux témoins (*Pourié et al., 2006*).

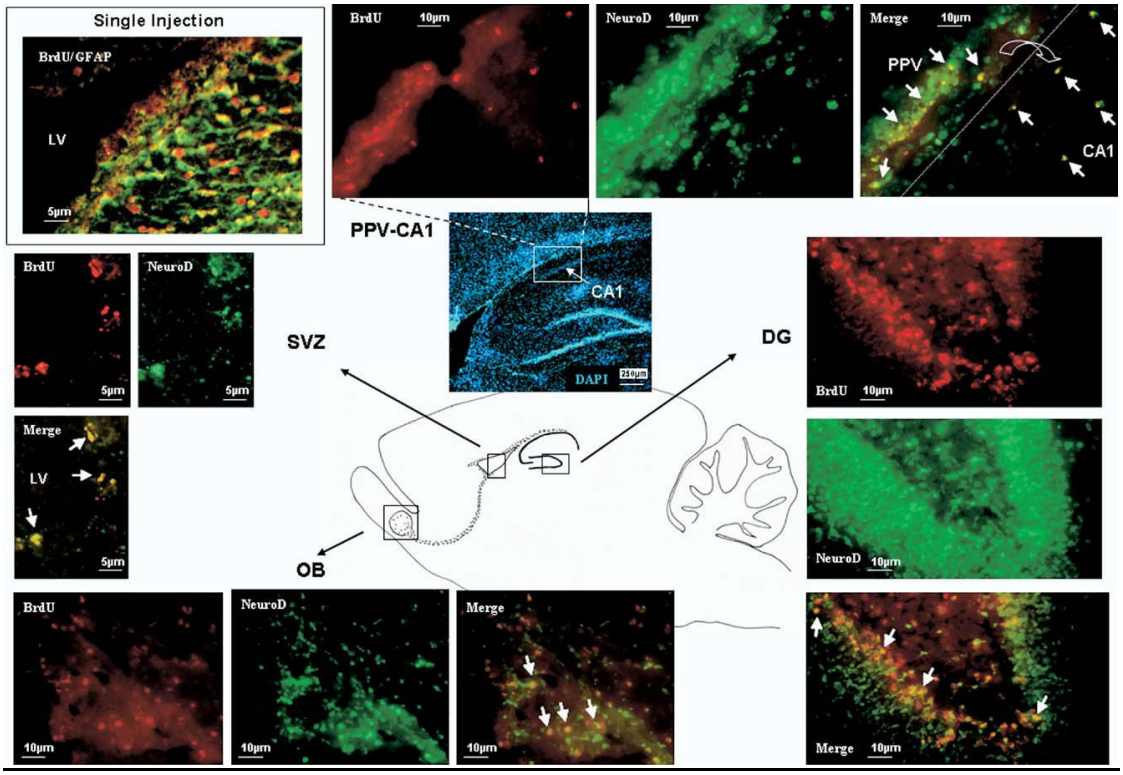


Figure 28 : La neurogenèse issue d'une hypoxie néonatale dans le cerveau de raton à 20 jours post-hypoxie. En rouge : marquage BrdU, en vert : NeuroD. SVZ : zone subventriculaire ; DG : gyrus denté ; OB : bulbe olfactif *(D'après Pourié et al.,2006)*

OBJECTIFS

De nombreuses études ont montré qu'une altération du métabolisme de l'homocystéine joue un rôle dans la survenue de diverses pathologies, notamment neurologiques. L'hyperhomocystéinémie, qui est susceptible de concerner toutes les classes d'âge, peut être d'origine génétique et/ou liée à un déficit de l'apport nutritionnel en vitamines du groupe B qui interviennent comme cofacteurs des enzymes du métabolisme et, en qualité de donneurs de groupements méthyles, jouent un rôle capital dans la régulation de l'expression de nombreux gènes. Dans un modèle *in vitro* de progéniteurs neuronaux hippocampiques carencés en folates (Akchiche et al., soumis), nous avons montré au laboratoire qu'une altération du métabolisme des monocarbones en lien avec cette carence réprimait la prolifération cellulaire et induisait des troubles de la différenciation neuronale. Cela suggère l'existence de mécanismes précis par lesquels les déficits en vitamines B et/ou l'homocystéine peuvent affecter le fonctionnement du cerveau et sa plasticité. De plus, nous avons également montré que les rats nés de mère carencée en vitamines B12, folates et choline pendant la gestation et la période d'allaitement, présentent, à l'âge de 21 jours, une hyperhomocystéinémie associée à une accumulation d'homocystéine et une apoptose dans des structures cérébrales sélectives telles que l'hippocampe et le cervelet. Sur le plan fonctionnel, ceci s'accompagne d'une diminution des capacités cognitives et des aptitudes motrices chez les jeunes rats (Blaise et al., 2007, 2009).

In vivo, des rats nouveau-nés ont été exposés à une hypoxie de 5 mn, dont les caractéristiques correspondent aux stimuli utilisés dans différentes études pour induire un « conditionnement » cérébral, c'est-à-dire suffisamment modérée pour ne pas provoquer de lésions et susceptible d'induire une neuroplasticité réactionnelle (Pourié et al., 2006). Dans ce modèle, alors qu'aucune perte cellulaire secondaire n'était apparente, il a été mis en évidence une augmentation importante de la prolifération cellulaire, principalement au niveau de la zone subventriculaire qui est connue pour être le siège d'une neurogenèse persistant tout au long de la vie (Peretto et al., 1999). L'utilisation de différents marqueurs cellulaires a permis de montrer que les cellules néoformées présentaient un phénotype neuronal et qu'elles étaient capables de migrer progressivement de la zone subventriculaire vers l'hippocampe. Cette néo-neurogenèse a eu pour conséquence une augmentation de la densité cellulaire dans plusieurs structures hippocampiques, parmi lesquelles la couche pyramidale de la région CA1 et le gyrus denté. Enfin, l'exposition des rats à une batterie de tests comportementaux a montré que le traitement hypoxique ne compromettait pas le développement neurocomportemental des individus. Au contraire, une amélioration significative des capacités mnésiques a été observée par rapport aux animaux témoins, constituant un indice de l'incidence bénéfique de la neurogenèse réactionnelle secondaire à l'hypoxie. Enfin, les troubles consécutifs à une carence gestationnelle en donneurs de méthyles ont pu être atténués par l'exposition des rats aux effets neurogéniques de l'hypoxie modérée, suggérant un processus compensatoire (Blaise et al., 2009).

Alors que les connaissances se sont développées en ce qui concerne certains mécanismes précoces mis en jeu dans la réponse cérébrale et/ou neuronale aux différentes situations

évoquées ci-dessus, notre objectif était d'exploiter ces différents modèles expérimentaux originaux dans le but d'étudier les conséquences de la carence nutritionnelle précoce au cours du temps, du stade juvénile au stade sénescent, et d'évaluer l'impact de la néo-neurogenèse associée à l'hypoxie. Ainsi, plusieurs questions demeurent :

- Quels sont les mécanismes sous-jacents aux altérations du développement et de l'homéostasie neuronale associées à la carence ?
- Quel est le statut fonctionnel du cerveau des individus jeunes et âgés exposés à une carence précoce, en particulier au niveau de l'hippocampe et du cervelet ?
- les effets bénéfiques en termes de plasticité cérébrale mis en évidence après une hypoxie néonatale brève perdurent ils tout au long de la vie, et quels sont les mécanismes qui les sous-tendent ?
- les effets délétères de la sénescence cérébrale sont-ils potentialisés par une carence en vitamines B, et quel est l'influence d'une neurogenèse induite ?

Afin de répondre à ces différentes questions, nous avons utilisé un modèle cellulaire correspondant à des progéniteurs neuronaux issus de l'hippocampe d'embryons de rat cultivés dans des conditions de carence en folates. La pertinence de ce modèle est soulignée par le fait que les progéniteurs présentent les principales caractéristiques des neurones de l'hippocampe au cours du développement *in vivo*. De plus, la structure hippocampique est particulièrement sensible aux modifications environnementales – dont l'homocystéine – et elle est affectée dans les pathologies associant des troubles de la cognition. Nous avons également exploité le modèle *in vivo* de rat carencé en vitamine B12, B9 et choline associé ou non à un bref conditionnement hypoxique néonatal.

Conformément aux objectifs que nous nous sommes fixés, la section expérimentale du mémoire de thèse se décline en trois parties qui s'articulent autour de 5 publications :

Première partie : **Plasticité cérébrale et carence en donneurs de méthyles**

1. Une carence en folate altère la différenciation et la plasticité de neuroprogéniteurs via les voies épigénétiques et l'homocystéinylation ;

2. Une carence en donneurs de méthyles modifie la neuroplascticité cérébelleuse dépendante des synapsines via une altération de la voie des récepteurs aux œstrogènes ;

Deuxième partie : **Conditionnement hypoxique néonatal**

3. Un conditionnement hypoxique néonatal bref améliore les fonctions cognitives et les propriétés tissulaires cérébrales chez le rat adulte – Mise en évidence d'un dimorphisme sexuel

4. Une brève hypoxie néonatale confère une résistance à la sénescence cérébrale chez les rats mâles âgés associée avec une augmentation de la plasticité synaptique et une amélioration des performances mnésiques

Troisième partie : **Programmation fœtale et vieillissement**

5. Programmation fœtale et vieillissement cérébral : influences conjuguées d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles et d'un conditionnement hypoxique périnatal

Résultats I
Plasticité cérébrale et carence en donneurs de méthyles

PREMIERE PARTIE: **Une carence en folate altère la différenciation et la plasticité de neuroprogéniteurs via les voies épigénétiques et l'homocystéinylation.**

OBJECTIFS DE LA PUBLICATION 1

Les folates (Vitamine B9) constituent un micronutriment essentiel au développement cérébral et à l'homéostasie neuronale (*Van der Put et al., 2001 ; Ellison et al.,2004*) et sa déficience en période péri-conceptionnelle puis dans les premières semaines de la grossesse a été associée à un risque plus élevé d'anomalies du développement, en particulier d'anomalies de fermeture du tube neural (*Van der Put et al., 2001*). Sous la forme de 5-méthyltétrahydrofolate, la vitamine B9 permet la reconversion de l'homocystéine en méthionine via la méthionine synthase qui utilise la vitamine B12 comme cofacteur. Une déficience en ces vitamines nécessaires au bon fonctionnement du cycle des monocarbones (cycle de l'homocystéine) conduit à une augmentation anormale du taux d'homocystéine et à une diminution de S-adenosylméthionine (SAM). Les conséquences neuronales de ces avitaminoses sont un déséquilibre entre prolifération cellulaire et différenciation neuronale (*Kruman et al., 2005 ; Battaglia-Hsu et al., 2009 ; Akchiche et al., 2010*) et une augmentation de l'apoptose, phénomènes qui se traduisent au niveau cérébral par une atrophie de l'hippocampe et un déficit cognitif (*Blaise et al., 2007 ; Daval et al., 2009*). Outre les effets neurotoxiques de l'accumulation de l'homocystéine dans les cellules favorisant le stress cellulaire, la diminution de la SAM, donneur de méthyle pour les réactions de transméthylation, influence directement la synthèse de petites molécules méthylées ainsi que les régulations épigénétiques en lien avec la méthylation de l'ADN et des histones. Bien que certains mécanismes sous-jacents aient été élucidés, les données issues des essais de supplémentation demeurent toutefois contrastées (*Balk et al., 2007 ; Durga et al., 2007 ; Wald et al., 2010*). Afin de mieux comprendre les processus altérés lors d'une carence en folates, nous avons utilisé un modèle de progéniteurs hippocampiques (lignée H19-7 décrite par *Eves et al., 1992*) cultivés en absence de vitamine B9, et nous avons étudié les mécanismes moléculaires intervenant dans les voies de prolifération/différenciation ainsi que l'altération de protéines fonctionnelles impliquées dans le trafic vésiculaire et la neuroplasticité. Un objectif complémentaire étant de confirmer nos principaux résultats sur un modèle de carence gestationnelle en donneurs de méthyles (B9, B12 et choline) validé (*Blaise et al., 2007 ; Daval et al., 2009*).

Folate deficit alters differentiation and plasticity of neuroprogenitors by epigenetic pathways and homocysteinylation

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

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

Contact: Carine Bossenmeyer-Pourié, PhD, Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

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

Running Title: Altered neuroprogenitor fate by folate deficit

Highlights:

- Low folate alters proliferation, migration, and differentiation of neuroprogenitors
- Low folate affects epigenetic regulation of the neurogenic program
- Folate deficiency induces homocysteinylation of cytoskeletal proteins
- Homocysteinylation is a new mechanism of neuronal protein aggregation

SUMMARY

Despite the key role of folate deficiency in neural tube defects and neurodegenerative disorders, little is known on the underlying mechanisms related with neuronal development and homeostasis. We therefore studied the consequences of folate deficit on proliferation, differentiation and plasticity of hippocampal neuroprogenitors. Folate deprivation reduced proliferation and sensitized progenitors to differentiation-associated apoptosis. Decreased production of S-adenosylmethionine and altered HDAC expression led to epigenetic dysregulations of key proneural bHLH factors that impair the differentiation program. Differentiation, vesicular transport and synaptic plasticity were dramatically affected, with poor neurite outgrowth and alterations of major cytoskeleton proteins. Increased homocysteine levels consecutive to folate shortage produced homocysteinylation of actin and kinesin and subsequent formation of protein aggregates, a common feature of many neurodegenerative diseases, and we report for the first time that folate deficiency leads to patent aggregation of neuronal proteins by a new mechanism involving homocysteine, as confirmed in an *in vivo* model.

INTRODUCTION

Brain development is highly sensitive to nutritional conditions. A large body of evidence supports that maternal denutrition can affect fetal brain and predispose the offspring to a wide range of pathologies (Oliver et al., 2007; McMillen et al., 2008). The micronutrient folate (vitamin B9) is essential to brain development and neuronal homeostasis (Van der Put et al., 2001; Ellinson et al., 2004), and folate deficiency is one of the commonest vitamin deficiencies worldwide, especially in pregnant women. In the methionine cycle of the one-carbon metabolism, metabolic product of folate, 5-methyltetrahydrofolate, provides a methyl group to reconvert homocysteine back to methionine by the vitamin B12-dependent methionine synthase (Finkelstein, 1998). A deficiency in either folate, vitamin B12 or both produces an elevation of homocysteine and a decrease in S-adenosylmethionine (SAM) production. This was associated with hippocampus atrophy, rarefaction of microvasculature, neuronal and glial apoptosis, imbalanced proliferation/differentiation of neuronal cells as well as cognitive impairments in rodents (Blaise et al., 2007; Troen et al., 2008; Daval et al., 2009; Battaglia-Hsu et al., 2009). Folate deficiency was linked with various developmental pathologies, including neural tube defects (Van der Put et al., 2001; Pitkin, 2007). It was shown to inhibit the proliferation of neuronal progenitors both *in vitro* and *in vivo*, while newly-generated neurons were more prone to oxidative damage and apoptosis (Kruman et al., 2002, 2005; Zhang et al., 2008). Independently of folate deprivation, cell exposure to high concentrations of homocysteine has neurotoxic effects through mechanisms that include reticulum and oxidative stress as well as excitotoxicity (Kruman et al., 2000; Mattson and Shea, 2003; Obeid and Herrmann, 2006). Since SAM is the universal substrate of transmethylation reactions, its reduction influences directly the synthesis of small methylated molecules and the epigenetic mechanisms related with DNA and histone methylations. Beyond this, most of the known cellular effects triggered by folate deficiency cannot provide

a satisfactory mechanistic explanation for the contrasted results of interventional trials (Balk et al., 2007; Durga et al., 2007; Wald et al., 2010), and cellular and molecular events that definitely precipitate neuronal defects need to be better understood. Thus, the present study aimed to investigate the consequences of folate deficiency on the fate of hippocampal neuroprogenitors by using the rat H19-7 embryonic cell line (Eves et al., 1992; Akchiche et al., 2010), with a special focus on the molecular mechanisms underlying proliferation/differentiation and the alteration of functional proteins involved in synaptic trafficking and plasticity. Additionally, a validated model for methyl donor deficiency in developing rats (Blaise et al., 2007; Daval et al., 2009) was used to confirm our most salient observations *in vivo*.

RESULTS

Folate deficiency affects the one-carbon metabolism in progenitors and is associated with elevated homocysteine

To validate the experimental model, concentrations of folate, vitamin B12 and homocysteine were measured in both control and folate-deficient cells. As expected, concentrations of vitamin B9 were considerably reduced in deficient cells (Figure 1), despite the presence of B9 in fetal calf serum (30.0±6.4 nmol/L, finally corresponding to 0.25±0.01 nmol/L in the culture medium). In parallel, the level of vitamin B12 was slightly elevated in 13h-differentiated neurons, and homocysteine amounts were increased by more than two-fold. Homocysteine can be either remethylated to methionine by methionine synthase (MTR) with the participation of methylene-tetrahydrofolate reductase (MTHFR) or metabolized by cystathionine β-synthase (CBS) through the transsulfuration pathway, but CBS activity was not detected in these cells, compared with liver HepG2 cells. Consequently, SAM concentration and MTHFR activity were significantly lower, while MTR activity was maintained. This was preceded by a reduced expression of the two enzymes in early hours of

differentiation, with no significant changes at 13h (Figures 1J,K). Finally, the methylation index reflected by the S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio (SAM/SAH) dropped in folate-deficient neurons (Figure 1I).

Folate deficiency inhibits proliferation and migration of progenitors and makes them more sensitive to differentiation-associated cell death

At the permissive temperature of 33°C, the rate of proliferation in folate-deficient cells was reduced by 17% starting from the third day of culture (Figure 2A). Concomitantly, the capacity of migration was reduced by 50% and remained lower than controls (Figure 2B).

After induction of differentiation, cell viability gradually decreased under control conditions (Figure 2C). The percentage of Apostain-positive cells – indicative of apoptosis-associated single-strand DNA – increased with time (Figure 2D). Folate deficiency augmented significantly the number of apoptotic cells. A progressive disruption of mitochondrial membrane potential was recorded in cells after induction of differentiation (Figure 2E). In folate-deficient progenitors, the loss of mitochondrial membrane potential was higher at 13h and 24h of differentiation, when a significant increase in the number of Apostain-positive cells was observed. Also, the expression of active caspase-9 and caspase-3 was highly stimulated in folate-deficient cells (Figure 2F).

Total catalytic Protein Phosphatase 2A (PP2Ac) expression was high when differentiation was induced, and then decreased 13h later (Figure 2F). PP2Ac was dramatically repressed in deficient cells. Differentiation of progenitors in control conditions was associated with a stable expression of cyclin E and a concomitant decreased expression of cdk2 in 13h-differentiated neurons. Folate deficiency enhanced cyclin E expression in the first hours of differentiation without changes in cdk2 levels. Conversely, cdk2 expression was repressed at 13h in deficient cells, suggesting an arrest of the cell cycle, while cyclin E levels remained

high. Quantitative changes in protein amounts are provided in Supplemental Information (Figure S2).

Folate deficiency alters progenitor differentiation

As compared to control conditions, folate deficit did not modify the temporal expression of NeuroD (immature neurons) but increased NeuN (mature neurons) at 24h (Figure 3A). Analysis of cell morphology revealed that folate deficiency was associated with a lesser characteristic neuronal (stellate) morphology. Impaired differentiation was further suggested by a significant reduction of cell processes. In deficient cells, polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) − involved in cell motility and axonal growth − was less expressed and its presence was more restricted to cell bodies (Figure 3B). Further phenotypic characterization of cells showed that differentiated neurons were glutamatergic both in control and in deficiency conditions, as shown by the presence of vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2). Again, the presence of VGluT2 in folate-deficient cells was dramatically reduced in neurites.

Folate deficiency affects progenitor fate through epigenetic dysregulations of the neurogenic program

Proneural genes encode bHLH transcription factors which are epigenetically regulated and are key determinants of neuronal fate (Kageyama et al., 2005). In our model, folate deficiency was associated with an increased expression of Mash1 and NeuroD, suggesting an accelerated differentiation process, whereas Neurogenin3 expression was reduced (Figures 3C and S3). In parallel, more mRNA transcripts of HDAC4 − known as a repressor of neuronal differentiation − were present in deficient cells (Figure 3D).

Folate deficiency affects progenitor differentiation through alterations of cytoskeleton components

Apparent alterations of neuronal differentiation as well as ectopic localization of various important proteins prompted us to investigate cytoskeleton major components.

Amounts of microtubule proteins β-tubulin, α-tubulin, and especially acetylated α-tubulin, which are normally ideally suited as tracks to deliver vesicles and organelles to distal cellular regions, as well as amounts of microtubule-associated proteins Map2 were significantly reduced in B9-deficient cells (Figures 4A and S4). Interestingly, B9 deficiency was associated with reduced levels of the mature components Map2A/B, along with higher levels of the immature isoform Map2C. Immunohistochemical analyses showed a disorganization of the cytoskeleton, with abnormal filopodias, a lack of cell polarity that requires acetylated α-tubulin, and a perinuclear distribution of most proteins (Figures 4B-D).

Whereas cell treatments by the inhibitor of DNA methyltransferase, 5-aza-cytidine (5-aza), or by the inhibitor of histone deacetylase (HDAC), suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), had no effect on the expression of β-tubulin, SAHA increased significantly α-tubulin total levels and particularly acetylated α-tubulin levels in deficient cells. Such changes were accompanied by a slight, but noticeable improvement of cell polarity, with longer processes containing α-tubulin (Figure 4E). SAHA had little effect on Map2, while the treatment by 5-aza raised the levels of Map2C both in control and folate-deficient cells.

Folate deficiency is associated with actin homocysteinylation and subsequent aggregation

Amounts of actin (microfilaments) were reduced in deficient cells, with a noticeable restoration following treatment with 5-aza (Figures 5A and S5). However, no difference was shown for RNA transcripts (Figure 5B), suggesting post-translational modifications upon B9 deficiency. Actin was found to strikingly co-localize with homocysteine, along with the appearance of obvious cellular aggregates (Figure 5C). We therefore tested the hypothesis of protein homocysteinylation by co-immunoprecipitation experiments. Homocysteine

immunoprecipitation followed by homocysteine Western blot analysis revealed a number of proteins associated with homocysteine both in proliferating and differentiated cells (Figure S5D).

While we did not detect any interaction of homocysteine with either α-tubulin or β-tubulin (not shown), a prominent interaction of homocysteine with actin was demonstrated either by homocysteine precipitation followed by actin immunodetection or by actin precipitation followed by homocysteine detection (Figures 5E and S5E), and was further confirmed by the Duolink® *in situ* proximity ligation assay that showed a significant increase of fluorescent signals in deficient cells compared to controls (Figure 5D). Since the procedure is based on a stoichiometric reaction, each dot corresponds to a physical interaction between actin and homocysteine. According to co-immunoprecipitation and Duolink® experiments, the fraction of actin linked to homocysteine was calculated to be 64.7±4.3% in B9-deficient cells *vs* 12.3±2.7% in controls. Actin was constantly identified by mass spectrometry among immunoprecipitated proteins using an immobilized anti-homocysteine antibody. We analyzed in detail the possible modifications carried by this protein in B9-deficient cells. As shown in Figure S5G, we identified the lysine residue K359 (conserved among the actin family) as being N-homocysteinylated. The non-modified peptide was also found in the protein digests.

In addition, co-immunoprecipitations showed the presence of several protein components of lower molecular weights (Figure 5E, arrows), possibly indicative of increased actin breakdown. Accordingly, in the presence of the proteasome inhibitor MG132, actin amounts were more elevated in deficient cells. Finally, inhibition of MAP kinase, a pathway previously shown to be involved in differentiation-associated cell death, by PD98059 led to lower levels of actin in controls that were no longer different from deficient cells (Figures 5F and S5B).

Folate deficiency affects motor proteins with kinesin homocysteinylation, and impairs vesicular transport and synaptic functions

The motor proteins kinesin and dynein also appeared to be highly affected by folate deficiency (Figures 6A and S6A). Their global expression was lower than in controls, and their presence in neurites was reduced. While cell treatment by 5-aza had no obvious effect on the expression of motor proteins in deficient cells, SAHA increased levels of dynein and tended to improve neurite growth. Dynein did not co-immunoprecipate with homocysteine (not shown), but kinesin did (Figure 6B). It is noteworthy that kinesin was detected at 124 kDa in differentiated control cells, but was present at 75 kDa in all deficient cells as well as in proliferating controls, possibly suggesting the existence of a non-mature isoform. Kinesin homocysteinylation was confirmed by Duolink® assay (Figure 6D). The fraction of kinesin linked to homocysteine was calculated to be 63.3±17.9% in deficient cells *vs* 4.2±1.2% in controls. Adverse effects associated with increased protein homocysteinylation in folate-deficient cells were reflected by reduced interactions with physiological partner proteins (vinculin and β-tubulin for actin and kinesin, respectively) (Figures 5G,H, 6E,F). Functional disabilities were further supported by the perinuclear localization of cargo synapsins normally anterogradly transported by kinesin (Figure S6).

Other functional capacities of differentiated hippocampal neurons were found to be altered, as reflected by the expression and clustering of PSD-95 (postsynaptic density-95 kDa protein) normally present at the postsynaptic side of excitatory synapses and which plays a key role in the regulation of glutamate receptor targeting and trafficking (Petralia et al., 2005), and also by the labeling of the lumenal part of synaptotagmin I, a Ca^{2+}-binding protein enriched in synaptic vesicles and known to be essential for synaptic vesicle exocytosis and endocytosis in neurons (Sudhof, 2004) (Figure 6G).

Protein homocysteinylation, aggregation, and functional disabilities were corroborated *in vivo* in rats early exposed to methyl donor deficiency

Methyl donor deficiency was evidenced at weaning by reduced plasma concentrations of folate and vitamin B12, increased homocysteinemia, and decreased of the methylation index SAM/SAH (Figure S7).

Traces of homocysteine were present as early as embryonic day 20 (E20) in the hippocampus of control rats, and homocysteine increased with age (Figure 7A). Higher amounts of homocysteine could be observed in methyl donor deficient (MDD) pups at E20 and then at weaning, time at which animals started to receive standard food. Most importantly, homocysteine accumulation was still much more patent in previously MDD rats at 450 days of age, with a colocalization with both actin and kinesin, and the presence of colabeled protein aggregates, as it was the case in cultured progenitors (Figure 7A). Finally, the Duolink® *in situ* proximity ligation assay confirmed higher interactions between homocysteine and the two proteins in the hippocampus of MDD rats (Figures 7B,C).

At the functional level, hippocampus is a key structure underlying learning-memory capacities and it is known that reorganization of the actin cytoskeleton is essential for synaptic plasticity and memory formation. Success in the homing test increased in both groups during development of pups from day 5 to day 14, reflecting a learning process (Figure 7D). But while 42% of MDD pups were successful in the test at 14 days of age with a day-by-day improvement average score of 5%, control pups showed two-fold greater performances at 14 days, with a day-by-day improvement average score of 12% ($p=0.0075$). These results were confirmed nearly 4 weeks later with the learning performances in a visuo-spatial maze test. Actually, despite both groups of animals improved their abilities to escape the maze day after day (Figures 7E,F), MDD rats needed more trials to reach controls' scores, with significant differences recorded every day of test for escape latency ($0.015<p<0.0001$), and at days 2 and 3 for number of errors ($p=0.024$ and $p=0.0075$, respectively). As a whole, these results suggest a strong reduction in neurocircuitry functioning in MDD pup hippocampus.

DISCUSSION

Our study showed that folate deprivation can markedly affect hippocampal progenitor proliferation, migration, differentiation, survival and synaptic plasticity. This occurs through altered protein expression and signalling related with epigenetics and dramatic homocysteinylation of proteins involved in elongation and stabilization of axons and dendrites, cell polarity and trafficking.

Deleterious effects of folate deprivation involve various mechanisms. According to our observations, they are tentatively summarized in Figure S1. Impaired remethylation of homocysteine and its subsequent accumulation were reported to sensitize hippocampal neurons to excitotoxicity, oxidative stress, and to promote apoptosis (Kruman et al., 2000, 2002). In our study, folate deficiency sensitized neuroprogenitors to differentiation-associated cell death through the activation of the mitochondrial apoptosis pathway. PP2A, a major cellular phosphatase, can either induce or prevent apoptosis via Akt, depending on what other signals the cell is receiving (Andrabi et al., 2007). PP2A has been shown to be activated by methylation of its catalytic subunit, and its activation occurs in response to DNA damage. In folate deficiency conditions, PP2Ac expression decreased after induction of differentiation. PP2A was shown to regulate the activities of G1 cyclin-dependent kinases (Yan and Mumby, 1999) and, in our study, repression of PP2A in folate deficient H19-7 cells, along with cyclin E overexpression could participate to the sensitization of progenitors to differentiation-associated death.

Differentiation of functional neurons requires the regulated expression of specific gene sets with a number of precisely orchestrated steps. Epigenetic modifications of both DNA and histones are emerging as fundamental mechanisms by which neurons adapt their transcriptional response to developmental and environmental cues (Hirabayashi and Goto, 2010). As expected, folate deficiency increased homocysteine and decreased SAM

availability as well as the SAM/SAH ratio. Alterations in transmethylation reactions are critical for epigenetic modifications and for the synthesis of many substrates. Proneural proteins synergistically regulate target genes that control multiple aspects of the neurogenic process (Castro et al., 2006). Folate deficiency disrupted this process by altering, among others, expression patterns of bHLH proteins, leading to impaired neuronal differentiation. We showed that folate deficiency increased the expression of the epigenetic regulator HDAC4 that participates to silence the expression of key neurogenic transcription factors and of cell cycle regulators. Accordingly, pharmacological inactivation of HDAC leads to enhancement of neuronal differentiation (Yu et al., 2009). This was confirmed in our model by using the inhibitor SAHA that improved progenitor differentiation.

Synapse dysfunctions and degeneration occur early in the pathogenesis of various neurological diseases (Mattson et al., 2000). Folate and SAM were reported to modulate synaptic activity of cortical neurons *in vitro* (Serra, 2008). We showed that folate deficiency markedly impaired progenitor differentiation, synaptic activity and plasticity. As a consequence, dendrites were particularly affected. Dendritic spines are the primary recipients of excitatory input in the brain, and maturation of functional post-synaptic compartments involves specialized machinery for clusters in dendrites which then will form part of functional synapses (Bourne and Harris, 2008). Clustering of PSD-95 would be directly linked to neuronal activity and synaptic integrity in hippocampal neurons (Farías et al., 2009), and its level was significantly reduced in folate-deficient progenitors. The same observation was made for the lumenal domain of synaptotagmin I which has been shown to label recycling synapses (Kraszewski et al., 1995).

One of the most salient features in the present study was the demonstration of dramatic alterations of the cytoskeleton, in line with a strongly increased homocysteinylation of several proteins and subsequent aggregation. Differentiation of neurons involves marked

reorganization of the cytoskeleton relating actin filaments which regulate growth cone behaviors, and microtubule components participating in elongation and stabilization of axons and dendrites (Mattson, 1999). Changes in microtubule and actin dynamics are sufficient to alter axon and dendrite specification and development as well as cell polarity (Conde and Caceres, 2009). Also, synaptic cargo trafficking is essential for synapse formation, function and plasticity (Schlager and Hoogenraad, 2009). All the components studied were markedly affected in deficient progenitors, along with altered expression and distribution of synapsins and VGluT2. Reduced expression of the cytoskeleton proteins could not be attributed to changes in methylation/acetylation of their promoters since 5-aza and SAHA gave rise to similar protein expressions in control and deficient cells. SAHA increased levels of acetylated α-tubulin in deficient cells and thus improved cell polarity and neurite outgrowth likely through the inhibition of HDAC6. Unlike other histone deacetylases with chromatin remodeling activity, HDAC6 is known to catalyze deacetylation of cytoplasmic substrates, including α-tubulin (Hubbert et al., 2002), and dynein is necessary for the transport of HDAC6 (Kawaguchi et al., 2003). In good agreement with our observations, low folate was related to failure of post-translational methylation of the cytoskeleton required for neural tissue differentiation (Bjorklund and Gordon, 2006). Finally, the lower expression of cytoskeleton components under folate deficiency may be linked to increased protein degradation via the proteasome, as suggested by our experiments using the proteasome inhibitor MG132.

Homocysteine thiolactone is a metabolite of homocysteine reacting with amine groups to form N-homocysteinylated proteins that contribute significantly to homocysteine cytotoxicity (Sibrian-Vasquez et al., 2010). Homocystenylation was described for plasmatic proteins in healthy individuals (Jakubowski et al., 2008) and in hyperhomocysteinemic patients who display double the level of homocysteinylated proteins (Perna et al, 2006). Very recently,

homocysteinylation of non-plasmatic proteins was reported, affecting functional properties of fibrillin-1 and tropoelastin (Hubmacher et al., 2010). Under folate deficiency, we showed for the first time, both *in vitro* and *in vivo*, homocysteinylation of neuronal proteins, as confirmed by several technical procedures. Whereas actin and kinesin baseline homocysteinylation could be depicted in progenitors under control condition, it was dramatically increased under folate deprivation, leading to aggregation and undoubtedly to impaired functions. Significance of neuronal protein homocysteinylation was supported *in vivo* by long-lasting interaction of actin and kinesin with homocysteine, along with protein aggregates and altered cognitive capacities in rats early exposed to methyl donor deficiency.

In conclusion, folate deficiency affects the regulation of the neurogenic program and impairs neuroprogenitor differentiation, vesicular transport, neuron plasticity and synaptic functions through alterations of major cytoskeleton components. Protein aggregation is a common feature of many brain pathologies (Dohm et al., 2007; Irvine et al., 2008; Aguzzi and O'Connor, 2010), and we report a new mechanism of neuronal protein aggregation with the participation of homocysteine. The prominent homocysteinylation of neuronal proteins and their subsequent aggregation certainly constitute a major adverse effect in response to folate deficiency.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cultures

H19-7/IGF-IR cell line (ATCC# CRL-2526) was conditionally immortalized from embryonic day 17 rat hippocampi with a temperature sensitive SV40 large T antigen (Eves et al., 1992). Cells were cultured and allowed to differentiate as previously described (Akchiche et al., 2010). Details are provided in Supplemental Experimental Procedures.

When used, 5-aza, (a DNA methyltransferase inhibitor, Sigma-Aldrich), SAHA, (a histone deacetylase inhibitor, Aton Pharma), MG132 (a proteasome inhibitor, Enzo Life Sciences) and PD98059 (a MEK inhibitor, Calbiochem) were added to the differentiation medium and kept until 13h of differentiation.

One-carbon metabolism

13h after induction of differentiation, cultured cells were harvested and lysed at 4°C in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich), and proteins were quantified according to Bradford (1976). Concentrations of folate and B12 were monitored by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN Pharmaceuticals) according to Chery et al. (2002). Homocysteine concentrations were measured by fluorescent polarization immunoassay (IMX system, Abbott) (Amouzou et al., 2004).

MTR and CBS activities were monitored on samples corresponding to 400 µg of total proteins as described by Blaise et al. (2005). MTHFR activity was measured as reported by Kutzbach and Stokstad (1971). The concentrations of SAM and SAH were measured in cell extracts by high-performance liquid chromatography and by using a range of standards as described by Blaise et al. (2005).

Cell viability and migration

Cell viability was assessed by the measurement of intracellular ATP using the CellTiter-Glo® luminescent viability assay (Promega) as reported by Akchiche et al. (2010). Mitochondrial membrane permeability was evaluated by the MitoCapture™ assay kit (Calbiochem), as described by Akchiche et al. (2010). The assay is based on the disruption of the mitochondrial inner-membrane electrochemical potential using a fluorescent cationic dye.

The presence of apoptosis was assessed in cells previously fixed in 4% paraformaldehyde by the Apostain® method using monoclonal antibody to single-strand DNA (F7-26 from calf thymus ssDNA, AbCys SA) after DNA denaturation by heating in the presence of 50%

formamide at 56°C for 30 min, as originally reported by Frankfurt and Krishan (2001). Cells were incubated for 30 min at 37°C with Apostain F7-26 monoclonal antibody (AbCys SA, 1/10). They were then rinsed and incubated with AlexaFluor-conjugated anti-mouse IgM (1/750, Molecular Probes), and cell nuclei were counterstained by the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, 0.5 µg/mL, Sigma-Aldrich).

For the monitoring of cell migration, cells were plated at a density of $5x10^5$ cells per well in 6-well plates, and were allowed to proliferate at the permissive temperature. 24h later, a "scratch" was produced in the middle of the well, and half of the cells were removed with a rubber policeman (Liang et al., 2007). Cells were then observed and photographed everyday, and the average distance of migration was assessed by using Cell® analysis software (Olympus).

Immunohistochemistry

Cells cultured on poly-L-lysine-precoated glass coverslips were washed, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), as reported by Akchiche et al. (2010). Detailed procedure and the list of antibodies used are provided in Supplemental Experimental Procedures.

Western blotting

Western blot analyses were performed using standard procedure with chemiluminescence using ECL system (Amersham Biosciences), as previously detailed (Akchiche et al., 2010). The list of antibodies used is provided in Supplemental Experimental Procedure.

Protein interactions

To assess homocysteine interaction with proteins, co-immunoprecipitation experiments were performed by means of a Pierce® Co-Immunoprecipitation commercial kit (Thermo Scientific Pierce). This optimized method enables isolation of native protein complexes from a lysate by directly immobilizing purified antibodies onto an agarose support, and was shown

to prevent antibody interference (Howell et al., 2006). Actin co-immunoprecipitation was analyzed by mass spectrometry. Tryptic peptides were obtained from immunoprecipitated proteins as described (Ren et al., 2009) and separated using a nano-chromatography system (Easy nLC, Proxeon) connected online to a LTQ Velos Orbitrap (ThermoFisher) mass spectrometer. Separation conditions were as in Ren et al. (2009). MS spectra were acquired on the Orbitrap analyser at resolution mode R=30000. After each MS spectrum, an automatic selection of 20 most intense precursor ions was activated with 15 sec dynamic exclusion delay to acquire MS/MS spectra on the LTQ Velos analyser, using CID fragmentation mode at 35% relative resonant activation energy for 40 msec. Spectra were analyzed using Mascot 2.3.2 (Matrix Science), see Supplemental Experimental Procedures.

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

Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was purified using the RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen). PCR was performed using the Quantitect SYBR Green PCR kit from Qiagen and the LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics). See Supplemental Experimental Procedures for detailed methods and primer sequences.

Animal studies

In vivo, experiments were conducted in accordance with the N.I.H. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals on a validated animal model of methyl donor deficiency (Blaise et

al., 2007, Daval et al., 2009). One month before mating, adult female Wistar rats (Charles River) were fed either standard diet (n=6) (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering) or a MDD diet lacking vitamin B12, folate and choline (n=6) (Special Diet Service), as described by Blaise et al. (2007). At the end of the gestation, 20-day-old embryos (E20) were obtained from 2 MDD and 2 control dams. Otherwise, the assigned diet was provided to the dams until weaning of the offspring (postnatal day 21). At this time, rat pups were randomly chosen in the different litters (5 controls and 5 MDD); they were euthanized, and their brains rapidly harvested, frozen in methylbutane at -30°C and stored at -80°C. In addition, intracardiac blood samples were drawn for the measurement of plasma concentrations of vitamins B9, B12 and homocysteine as described above. The remaining pups were kept under standard conditions until 450 days of age. Immunohistochemistry was performed on cryostat-generated 20-µm sagittal brain sections mounted onto glass slides.

Behavioral tests (homing test and multiple T-maze) were performed between postnatal days 5 and 44 in order to evaluate the rats' cognitive performances as previously described (Hoeger et al., 2000, 2006). Detailed procedures are described in Supplemental Experimental Procedures.

Statistical analysis

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

References

Aguzzi, A., and O'Connor, T. (2010). Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. Nat. Rev. Drug Discov. 9, 237-248.

Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Pourié, G., Koziel, V., Nédélec, E., Guéant, J.L., and Daval, J.L. (2010). Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: Signaling pathways sequentially involved. Hippocampus 20, 949-961.

Amouzou, E.K., Chabi, N.W., Adjalla, C.E., Rodriguez-Guéant, R.M., Feillet, F., Villaume, C., Sanni, A., and Guéant, J.L. (2004). High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrhydrofolate reductase in coastal West Africa. Am. J. Clin. Nutr. 79, 619-624.

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

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

Balk, E.M., Raman, G., Tatsioni, A., Chung, M., Lau, J., and Rosenberg, I.H. (2007). Vitamin B6, B12 and folic acid supplementation and cognitive function: a systematic review of randomized trials. Arch. Intern. Med. 167, 21-30.

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

Blaise, S., 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.

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

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Castro, D.S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I.J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J.A., Nguyen, L., Gossler, A., Göttgens, B., Matter, J.M., and Guillemot, F. (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. Dev. Cell 11, 831-844.

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

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

Daval, J.L., Blaise, S., and Guéant, J.L. (2009). Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, E1.

Dohm, C.P., Kermer, P., and Bähr, M. (2008). Aggregopathy in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic implication. Neurodegener. Dis. 5, 321-338.

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

Ellinson, M., Thomas, J., and Patterson, A. (2004). A critical evaluation of the relationship between serum vitamin B, folate and total homocysteine with cognitive impairment in the elderly. J. Hum. Nutr. Diet 17, 371-383.

Eves, E.M., Tucker, M.S., Roback, J.D., Downen, M., Rosner, M.R., and Wainer, B.H. (1992). Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4373-4377.

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

Finkelstein, J.D. (1998). The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. Eur. J. Pediatr. 157 Suppl. 2, S40-S44.

Frankfurt, O.S., and Krishan, A. (2001). Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. J. Histochem. Cytochem. 49, 369-378.

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

Hoeger, H., Engelmann, M., Bernert, G., Seidl, R., Bubna-Littitz, H., Mosgoeller, W., Lubec, B., and Lubec, G. (2000). Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. Life Sci. 66, 947-962.

Hoeger, H., Engidawork, E., Stolzlechner, D., Bubna-Littitz, H., and Lubec, B. (2006). Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. Amino Acids 31, 385-396.

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

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F., and Yao, T.P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. Nature 417, 455-458.

Hubmacher, D., Cirulis, J.T., Miao, M., Keeley, F.W., and Reinhardt, D.P. (2010). Fuctional consequences of homocysteinylation of the elastic fiber proteins fibrilin-1 and tropoelastin. J. Biol. Chem. 285, 1188-1198.

Irvine, G.B., El-Agnaf, O.M., Shankar, G.M., and Walsh, D.M. (2008). Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. Mol. Med. 14, 451-464.

Jakubowski, H. (2008). New method for the determination of protein N-linked homocysteine. Anal Biochem. 380, 257-2761.

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Hatakeyama, J., and Ohsawa, R. (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. Exp. Cell Res. 306, 343-348.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., and Yao, T.P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. Cell 115, 727-738.

Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M., and De Camilli, P. (1995). Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with

CY3-conjugated antibodies directed against the lumenal domain of synaptotagmin. J. Neurosci. 15, 4328-4342.

Kruman, I.I., Culmsee, C., Chan, S.L., Kruman, Y., Guo, Z., Penix, L., and Mattson, M.P. (2000). Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. J. Neurosci. 20, 6920-6926.

Kruman, I.I., Kumaravel, T.S., Lohani, A., Pedersen, W.A., Cutler, R.G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M., and Mattson, M.P. (2002). Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. J. Neurosci. 22, 1752-1762.

Kruman, I.I., Mouton, P.R., Emokpae, R., Jr., Cutler, R.G., and Mattson, M.P. (2005). Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. Neuroreport 16, 1055-1059.

Kutzbach, C., and Stokstad, E.L. (1971). Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. Biochim. Biophys. Acta 250, 459-477.

Liang, C.C., Park, A.Y., and Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat. Protoc. 2, 329-333.

Mattson, M.P. (1999). Establishment and plasticity of neuronal polarity. J. Neurosci. Res. 57, 577-589.

Mattson, M.P., Culmsee, C., and Yu, Z.F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. Cell Tissue Res. 301, 173-187.

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

McMillen, I.C., MacLaughlin, S.M., Muhlhausler, B.S., Gentili, S., Duffield, J.L., and Morrison, J,L.(2008). Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 102, 82-89.

Obeid, R., and Herrmann, W. (2006). Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. FEBS Lett. 580, 2994-3005.

Oliver, M.H., Jaquiery, A.L., Bloomfield, F.H., and Harding, J.E. (2007). The effects of maternal nutrition around the time of conception on the health of the offspring. Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 64, 397-410.

Perna, A.F., Satta, E., Acanfora, F., Lombardi, C., Ingrosso, D., and De Santo, N.G. (2006). Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. Kidney Int. 69, 869-876.

Petralia, R.S., Sans, N., Wang, Y.X., and Wenthold, R.J. (2005). Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. Mol. Cell. Neurosci. 29, 436-452.

Pitkin, R.M. (2007). Folate and neural tube defects. Am. J. Clin. Nutr. 85, 285S-288S.

Ren, D., Pipes, G.D., Liu, D., Shih, L.Y., Nichols, A.C., Treuheit, M.J., Brems, D.N., Bondarenko, P.V. (2009). An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. Anal. Biochem. 392, 12-21.

Serra, E. (2008). Duloxetine and pregabalin: safe and effective for the long-term treatment of fibromyalgia? Nat. Clin. Pract. Neurol. 4, 594-595.

Sibrian-Vazquez, M., Escobedo, J.O., Lim, S., Samoei, G.K., and Strongin, R.M. (2010). Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 551-554.

Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. Annu. Rev. Neurosci. 27, 509-547.

Troen, A.M., Shea-Budgell, M., Shukitt-Hale, B., Smith, D.E., Selhub, J., and Rosenberg, I.H. (2008). B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 12474-12479.

Van der Put, N.M., van Straaten, H.W., Trijbels, F.J., and Blom, H.J. (2001). Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. Exp. Biol. Med. (Maywood) 226, 243-270.

Wald, D.S., Kasturiratne, A., and Simmonds, M. (2010). Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive decline: meta-analysis of randomized trials. Am. J. Med. 123, 522-527.

Yan, Y., and Mumby, M.C. (1999). Distinct roles for PP1 and PP2A in phosphorylation of the retinoblastoma protein. PP2a regulates the activities of G(1) cyclin-dependent kinases. J. Biol. Chem. 274, 31917-31924.

Yu, I.T., Park, J.Y., Kim, S.H., Lee, J.S., Kim, Y.S., and Son, H. (2009) Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. Neuropharmacology 56, 473-480.

Zhang, X., Liu, H., Cong, G., Tian, Z., Ren, D., Wilson, J.X., and Huang, G. (2008). Effects of folate on notch signaling and cell proliferation in neural stem cells of neonatal rats in vitro. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 54, 353-356.

Acknowledgements: The study was supported by a grant from the French National Agency for Research (ANR “Nutrivigène”). N.A. is indebted to the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” and the “Région Lorraine” for support.

Figure legends

Figure 1. Folate deficiency-associated changes in main determinants of the one-carbon metabolism in H19-7 cells

(**A-I**) Determinants of homocysteine concentration 13h after induction of differentiation. CBS: cystathionine β-synthase; MTHFR: methylene-tetrahydrofolate reductase; MTR: methionine synthase; SAM: S-adenosylmethionine; SAH: S-adenosylhomocysteine.

(**J-K**) Western blot analysis of the two key enzymes related to homocysteine remethylation, MTHFR and MTR, after induction of differentiation in control and folate-deficient cells. Data, normalized to GAPDH, are reported as means±sd

All values were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure 2. Effects of folate deficiency on proliferation, migration and differentiation-associated death of progenitors

(**A**) Temporal changes in cell proliferation reflected by the number of cells.

(**B**) Temporal changes in cell migration reflected by the colonization by progenitors of the part of the well where cells were previously removed, as described in experimental procedures. The average distance of migration was assessed by using Cell analysis software (Olympus).

(**C**) Temporal changes in cell viability by using the CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay (Promega). Other methods, i.e. MTT and Trypan blue, gave similar results (not shown).

(**D**) Percent of apoptotic cells reflected by Apostain immunostaining.

(**E**) Changes in the mitochondrial membrane potential depicted by the MitoCapture detection kit (Calbiochem).

(**F**) Temporal evolution of the expression of various key proteins assessed by Western blot after induction of differentiation in control and folate-deficient cells. Quantifications by densitometric analyses are provided in Supplemental Information (Figure S2).

All experiments were performed at least in triplicate. Data are reported as means±sd Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: **P*<0.05 and ***P*<0.01.

Figure 3. Phenotypic characterization of control and folate-deficient cells and expression of proneural bHLH factors

(**A**) Temporal profiles of the expression patterns of neuronal markers NeuroD and NeuN and specific neuronal characteristics at 6h and 13h after induction of differentiation. Results were obtained by a blind operator from three independent experiments, with each assay comprising a minimum of 10 visual fields at 40x magnification. Data are reported as means±sd Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: **P*<0.05 and ***P*<0.01.

(**B**) Immunostaining of NeuroD, NeuN, PSA-NCAM and the vesicular glutamate transporter VGLUT2 at 13h after induction of differentiation. Cell nuclei were counterstained by Dapi.

(**C**) Western blot analysis of proneural bHLH factors in control and folate-deficient cells at 6h and 13h after induction of differentiation. Densitometric analyses are provided in Supplemental Information (Figure S3).

(**D**) HDAC4 mRNA by RT-PCR in control and B9-deficient 13h-differentiated cells (data are reported as means±sd, n=3, ***P*<0.01) and immunostaining of HDAC4 at 13h after induction of differentiation.

Figure 4 Effects of folate deficiency on microtubule-associated components

(**A**) Expression of proteins assessed by Western blot in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6h and 13h after induction of differentiation (left part). Effects of treatments by 5-aza (2 μM) or SAHA (2.5 μM) at 13h (right part). Densitometric analyses are provided in Supplemental Information (Figure S4).

(**B-D**) Immunohistological analyses of proteins related to microtubules. Note the lack of polarization in B9-deficient cells.

(**E**) Effects of SAHA on the distribution of α-tubulins at 13h after induction of differentiation of control and B9-deficient cells. All experiments were performed at least in triplicate, leading to similar results.

Figure 5. Effects of folate deficiency on actin

(**A**) Expression of actin assessed by Western blot in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6h and 13h after induction of differentiation (left part). Effects of treatments by 5-aza or SAHA at 13h (right part). For each condition, three separate experiments were performed. Densitometric analyses are provided in Supplemental Information (Figure S5).

(**B**) Actin mRNA by RT-PCR in control (C) and B9-deficient 13h-differentiated cells. Data are reported as means±sd (n=3).

(**C**) Immunohistological evidence of co-localization of homocysteine with actin and occurrence of cell aggregates.

(**D**) *In situ* interaction between homocysteine and actin monitored by the Duolink® "proximity ligation" assay: percent of positive cells and number of dots per cell in control and B9-deficient 13h-differentiated cells. Experiments were performed in triplicate. Statistically significant difference between control and folate-deficient cells: $^{**}P<0.01$. Corresponding immunofluorescence pictures are provided in Figure S5.

(**E**) Actin homocysteinylation in proliferating (P) and 13h-differentiated (13h) control (C) and deficient (D) cells as shown by homocysteine precipitation followed by actin immunodetection (Hcy IP/Actin WB) and comparison with single actin Western blot analysis (Actin WB). Immunoblot corresponding to the reverse procedure, i.e. actin immunoprecipitation followed by hymocysteine Western blot analysis, is shown in Supplemental Information (Figure S5). Three separate experiments were performed, leading to similar results.

(**F**) Effects of a selective proteasome inhibitor (MG132, 3 μM) and of a MEK inhibitor (PD98059, 30 μM) on actin expression in control (C) and deficient (D) 13-differentiated cells. All experiments were performed at least in triplicate, leading to similar profiles. Densitometric analyses are provided in Supplemental Information (Figure S5).

(**G)** Immunohistological co-localization of actin and its partner protein vinculin in control and B9-deficient cells.

(H) *In situ* interaction between actin and vinculin monitored by the Duolink® assay in control and B9-deficient 13h-differentiated cells. Experiments were performed in triplicate. Statistically significant difference between control and folate-deficient cells: $^{**}P<0.01$

Figure 6. Effects of folate deficiency on motor and synaptic proteins

(**A**) Expression of kinesin and dynein assessed by Western blot in control (C) and folate-deficient (D) cells at 6h and 13h after induction of differentiation (left part). Effects of treatments by 5-aza or SAHA at 13h (right part). Densitometric analyses are provided in Supplemental Information (Figure S6).

(**B**) Kinesin homocysteinylation in proliferating (P) and 13h-differentiated (13h) control (C) and deficient (D) cells as shown by homocysteine precipitation followed by kinesin immunodetection (Hcy IP/Kin WB).

(**C**) Immunohistological evidence of cell co-localization of homocysteine with kinesin and occurrence of cell aggregates.

(**D**) *In situ* interaction between homocysteine and kinesin monitored by the Duolink® assay in control and B9-deficient 13h-differentiated cells. Experiments were performed in triplicate. Statistically significant difference between control and folate-deficient cells: $^{**}P<0.01$.

(**E**) Immunohistological co-localization of kinesin and its partner protein β-tubulin in control and B9-deficient cells.

(F) *In situ* interaction between kinesin and β-tubulin monitored by the Duolink® assay in control and B9-deficient cells. Experiments were performed in triplicate. Statistically significant difference between control and folate-deficient cells: $^{**}P<0.01$

(**G**) Expression pattern of the synaptic markers PSD-95 (postsynaptic spines) and synaptotagmin I (presynaptic lumenal domain) at 13h after differentiation.

Figure 7. *In vivo* studies in rats early exposed to methyl donor deficiency (MDD)

(**A**) Colabeling of actin and homocysteine and of kinesin and homocysteine in the CA1 layer of the hippocampus in control (C) and MDD rats at embryonic day 20 (E20), 21 days and 450 days of age. Note the increased colocalization in MDD rats and the presence of protein aggregates (arrows).

(**B**) *In situ* interaction between actin and homocysteine monitored by the Duolink® assay in the CA1 layer of control and MDD rats. Experiments were performed in triplicate. Statistically significant difference between control and folate-deficient cells: $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$.

(**C**) *In situ* interaction between kinesin and homocysteine monitored by the Duolink® assay in the CA1 layer of control and MDD rats. Experiments were performed in triplicate.

Statistically significant difference between control and folate-deficient cells: *P<0.05 and **P<0.01.

(**D**) Homing test: evaluation of the first learning function (hippocampal and non-hippocampal) in rat pups (n_C=33, n_{MDD}=35). Note the greater linear improvement score in controls as shown by slopes of learning curves day after day (F=132.9, p=0.0075).

(**E-F**) Hippocampal learning function in young rats (40-44 days): spatial learning in a multiple T-maze (n_C=22, n_{MDD}=29). ANOVA summary: F(1,50)=6.3 to 20.5; p<0.015 (panel E) and F(1,50)=2.0 to 2.9; p>0.092 for days 1, 4 and 5 (ns); F(1,50)=5.3 to 7.7; p<0.024 for days 2 and 3 (panel F).

Figure 1

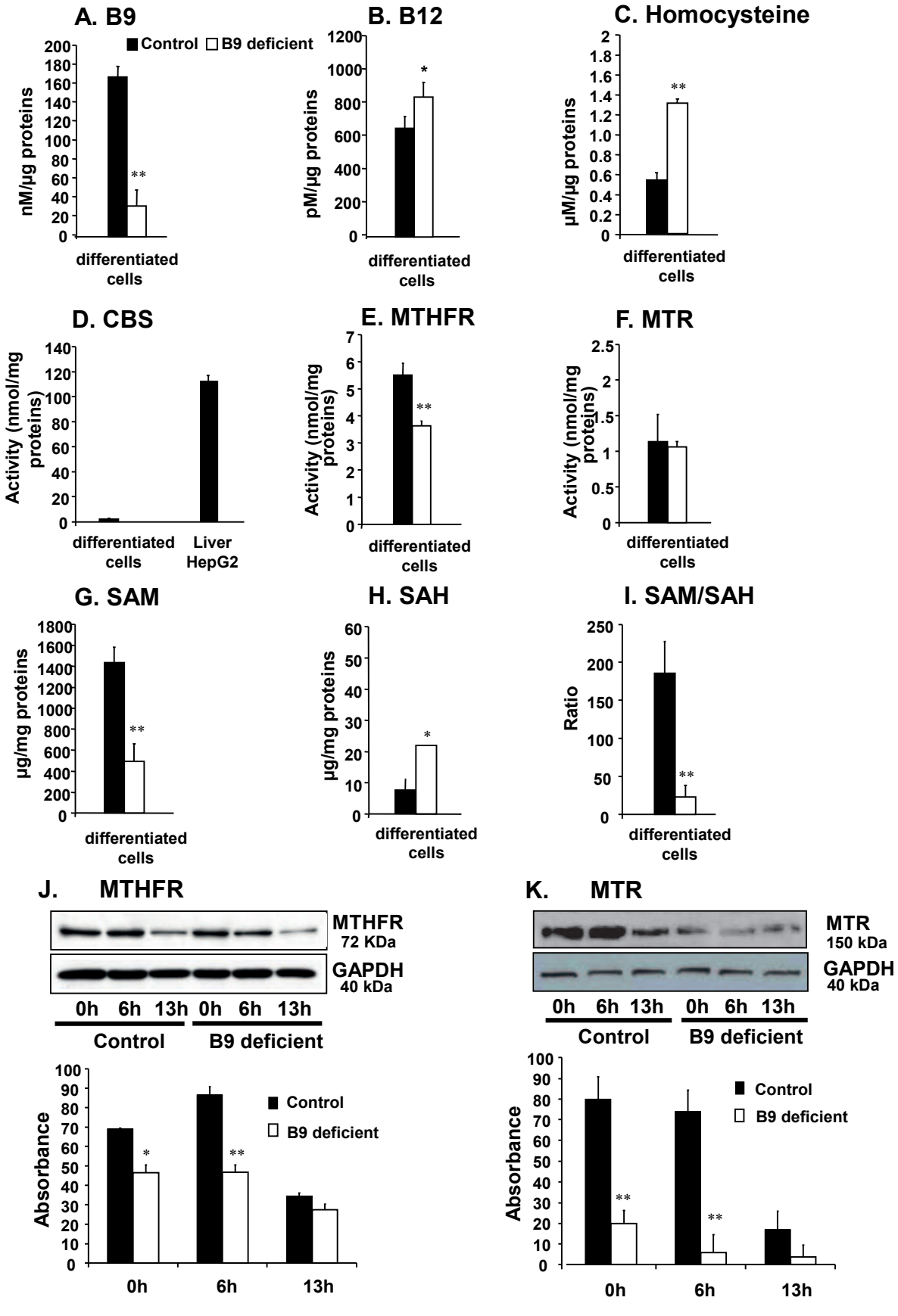

A. B9
Control
B9 deficient
nM/µg proteins
differentiated cells
B. B12
pM/µg proteins
differentiated cells
C. Homocysteine
µM/µg proteins
differentiated cells
D. CBS
Activity (nmol/mg proteins)
differentiated cells
Liver HepG2
E. MTHFR
Activity (nmol/mg proteins)
differentiated cells
F. MTR
Activity (nmol/mg proteins)
differentiated cells
G. SAM
µg/mg proteins
differentiated cells
H. SAH
µg/mg proteins
differentiated cells
I. SAM/SAH
Ratio
differentiated cells
J. MTHFR
MTHFR
72 KDa
GAPDH
40 kDa
0h 6h 13h 0h 6h 13h
Control
B9 deficient
Absorbance
Control
B9 deficient
0h
6h
13h
K. MTR
MTR
150 kDa
GAPDH
40 kDa
0h 6h 13h 0h 6h 13h
Control
B9 deficient
Absorbance
Control
B9 deficient
0h
6h
13h

Figure 2

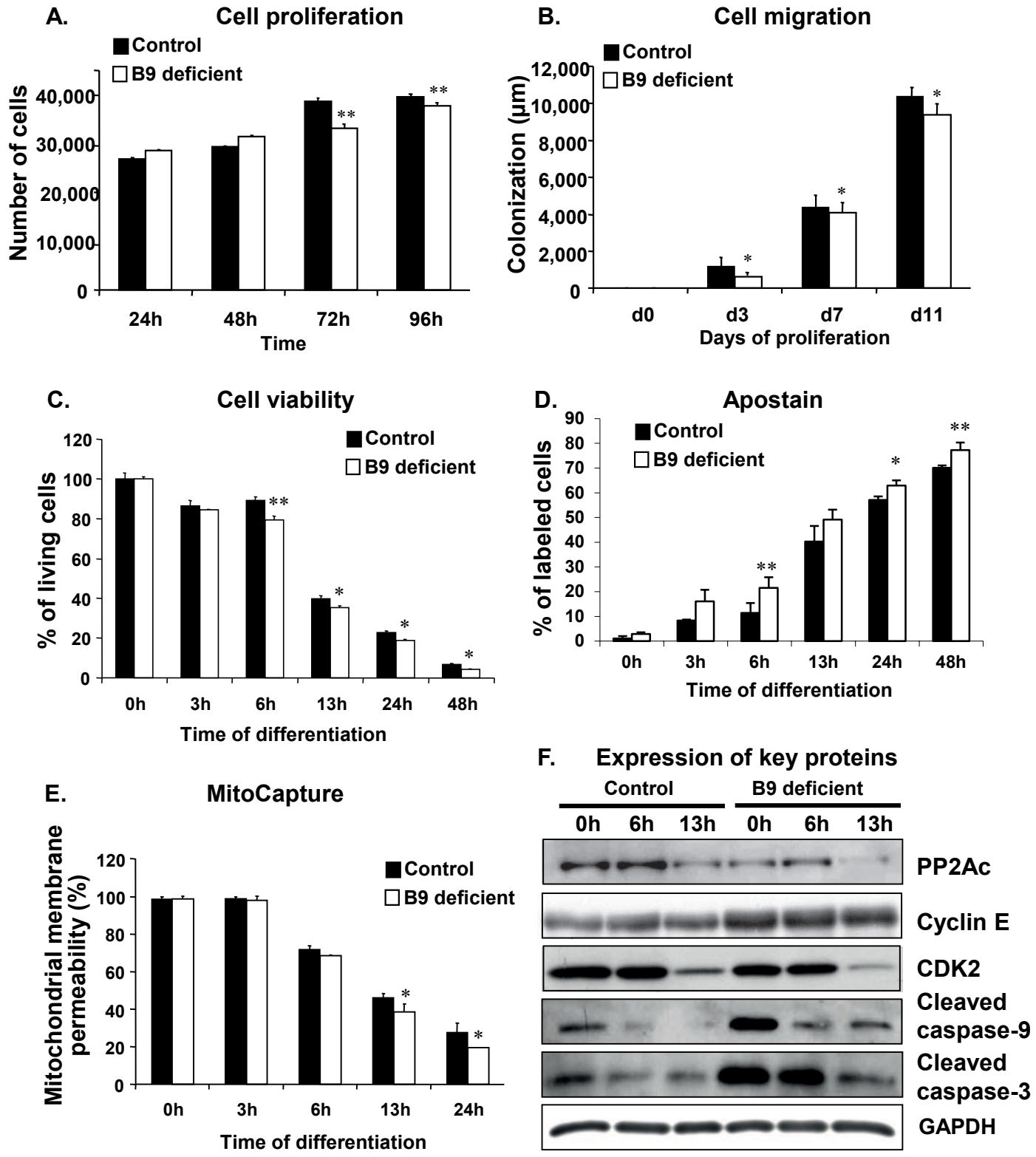

A.
Cell proliferation
Control
B9 deficient
Number of cells
40,000
30,000
20,000
10,000
0
24h
48h
72h
96h
Time
B.
Cell migration
Control
B9 deficient
Colonization (µm)
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
d0
d3
d7
d11
Days of proliferation
C.
Cell viability
Control
B9 deficient
% of living cells
120
100
80
60
40
20
0
0h
3h
6h
13h
24h
48h
Time of differentiation
D.
Apostain
Control
B9 deficient
% of labeled cells
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0h
3h
6h
13h
24h
48h
Time of differentiation
E.
MitoCapture
Control
B9 deficient
Mitochondrial membrane permeability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0h
3h
6h
13h
24h
Time of differentiation
F.
Expression of key proteins
Control
B9 deficient
0h
6h
13h
0h
6h
13h
PP2Ac
Cyclin E
CDK2
Cleaved caspase-9
Cleaved caspase-3
GAPDH

Figure 3

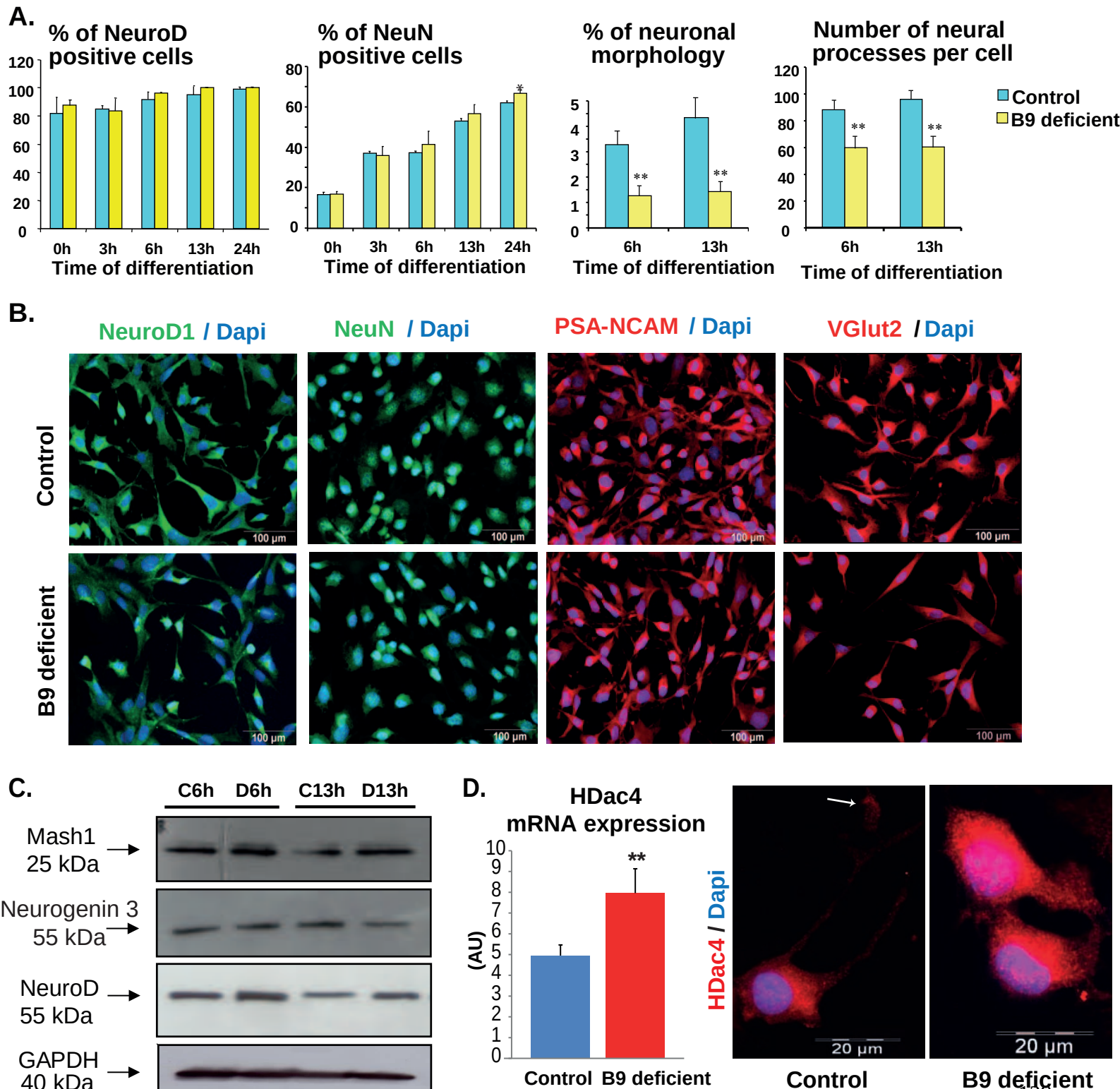

A.
% of NeuroD positive cells
% of NeuN positive cells
% of neuronal morphology
Number of neural processes per cell
Time of differentiation
0h
3h
6h
13h
24h
Control
B9 deficient
B.
NeuroD1 / Dapi
NeuN / Dapi
PSA-NCAM / Dapi
VGlut2 / Dapi
Control
B9 deficient
100 µm
C.
C6h
D6h
C13h
D13h
Mash1
25 kDa
Neurogenin 3
55 kDa
NeuroD
55 kDa
GAPDH
40 kDa
D.
HDac4
mRNA expression
(AU)
Control
B9 deficient
HDac4 / Dapi
20 µm

Figure 4

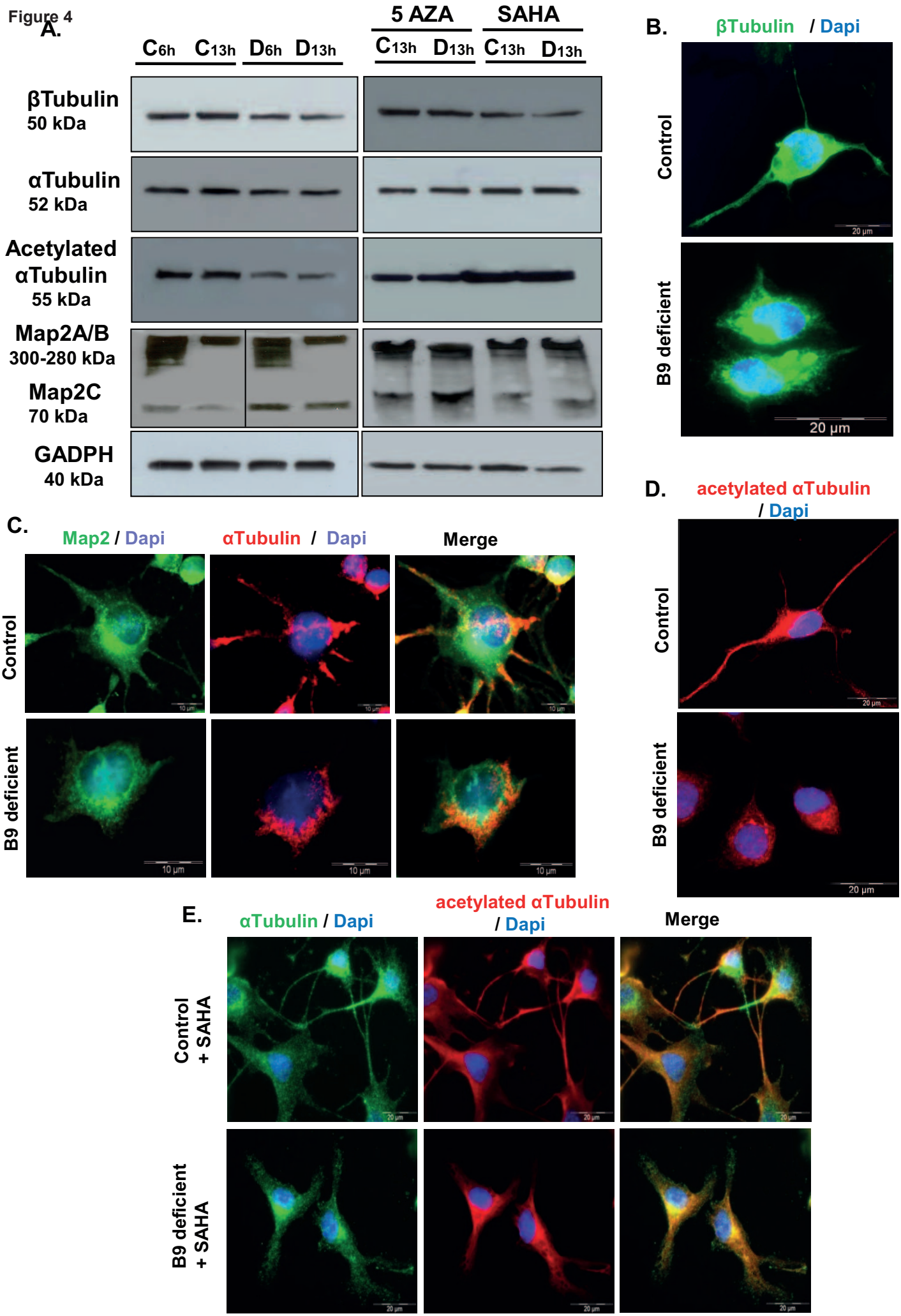

A.
C6h C13h D6h D13h
5 AZA
SAHA
C13h D13h C13h D13h
βTubulin
50 kDa
αTubulin
52 kDa
Acetylated
αTubulin
55 kDa
Map2A/B
300-280 kDa
Map2C
70 kDa
GADPH
40 kDa
B.
βTubulin / Dapi
Control
B9 deficient
20 µm
C.
Map2 / Dapi
αTubulin / Dapi
Merge
Control
B9 deficient
10 µm
D.
acetylated αTubulin
/ Dapi
Control
B9 deficient
20 µm
E.
αTubulin / Dapi
acetylated αTubulin
/ Dapi
Merge
Control
+ SAHA
B9 deficient
+ SAHA
20 µm

Figure 5

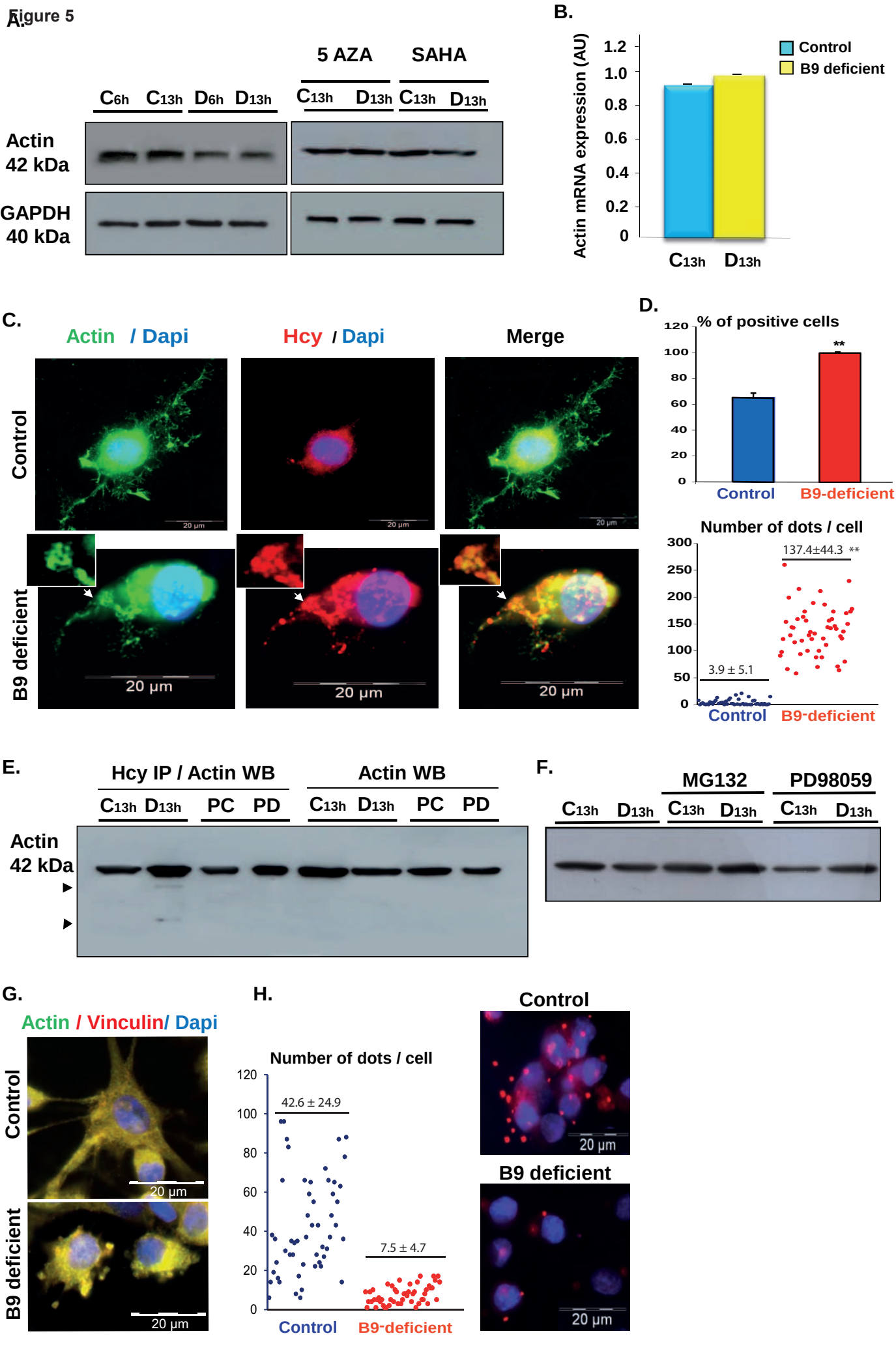
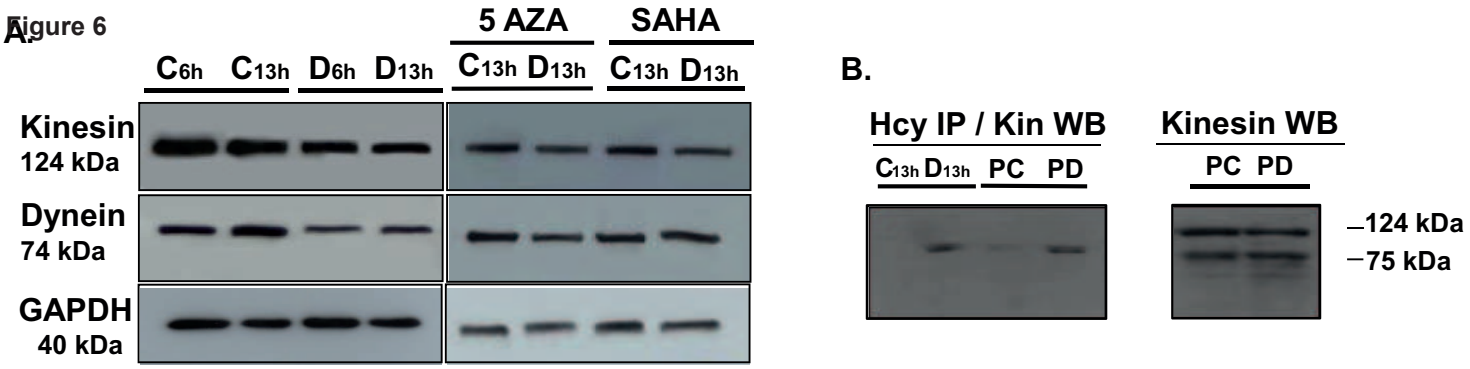
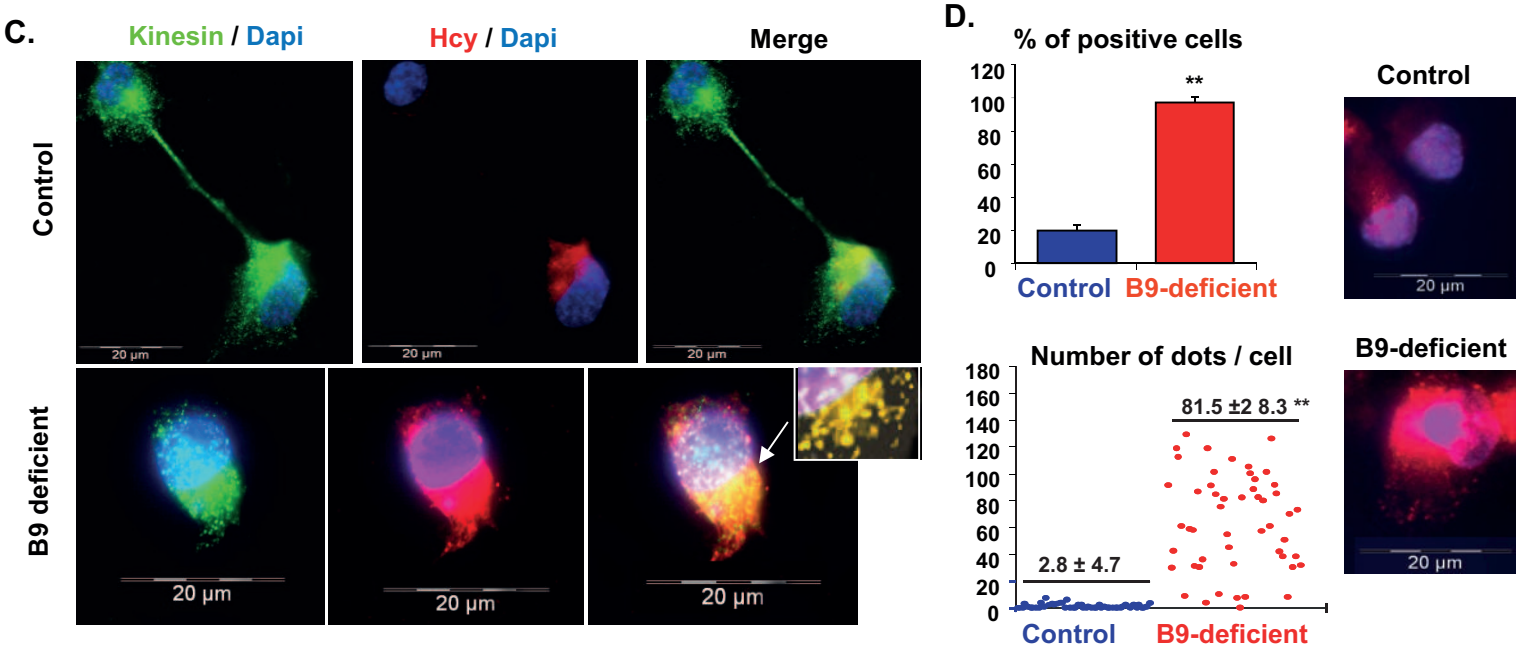
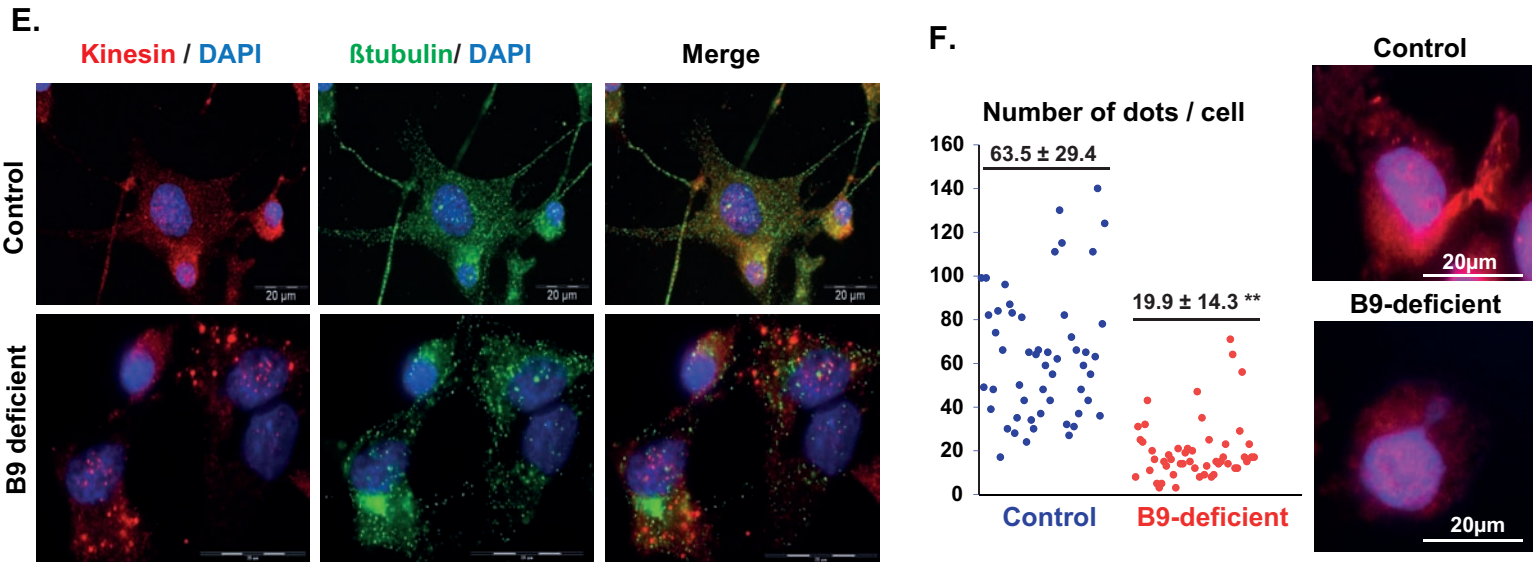

A.
5 AZA
SAHA
C6h C13h D6h D13h
C13h D13h C13h D13h
Actin
42 kDa
GAPDH
40 kDa
B.
Actin mRNA expression (AU)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
B9 deficient
C13h D13h
C.
Actin / Dapi
Hcy / Dapi
Merge
Control
B9 deficient
20 µm
D.
% of positive cells
120
100
80
60
40
20
0
**
Control
B9-deficient
Number of dots / cell
300
250
200
150
100
50
0
137.4±44.3 **
3.9 ± 5.1
Control
B9-deficient
E.
Hcy IP / Actin WB
Actin WB
C13h D13h PC PD
C13h D13h PC PD
Actin
42 kDa
F.
MG132
PD98059
C13h D13h C13h D13h C13h D13h
G.
Actin / Vinculin/ Dapi
Control
B9 deficient
20 µm
H.
Number of dots / cell
120
100
80
60
40
20
0
42.6 ± 24.9
7.5 ± 4.7
Control
B9-deficient
Control
B9 deficient
20 µm

Figure 6


A.
5 AZA
SAHA
C6h C13h D6h D13h
C13h D13h
C13h D13h
Kinesin
124 kDa
Dynein
74 kDa
GAPDH
40 kDa
B.
Hcy IP / Kin WB
Kinesin WB
C13h D13h PC PD
PC PD
124 kDa
75 kDa


C.
Kinesin / Dapi
Hcy / Dapi
Merge
Control
B9 deficient
20 µm
D.
% of positive cells
120
100
80
60
40
20
0
**
Control
B9-deficient
Control
20 µm
Number of dots / cell
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
81.5 ±2 8.3 **
2.8 ± 4.7
Control
B9-deficient
B9-deficient
20 µm


E.
Kinesin / DAPI
ßtubulin/ DAPI
Merge
Control
B9 deficient
20 µm
F.
Number of dots / cell
160
140
120
100
80
60
40
20
0
63.5 ± 29.4
19.9 ± 14.3 **
Control
B9-deficient
Control
20µm
B9-deficient
20µm

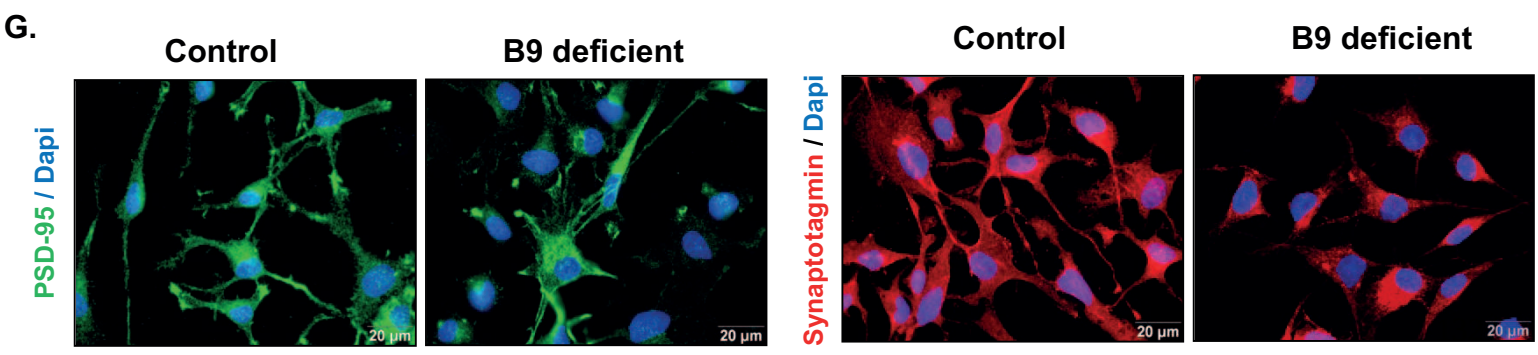
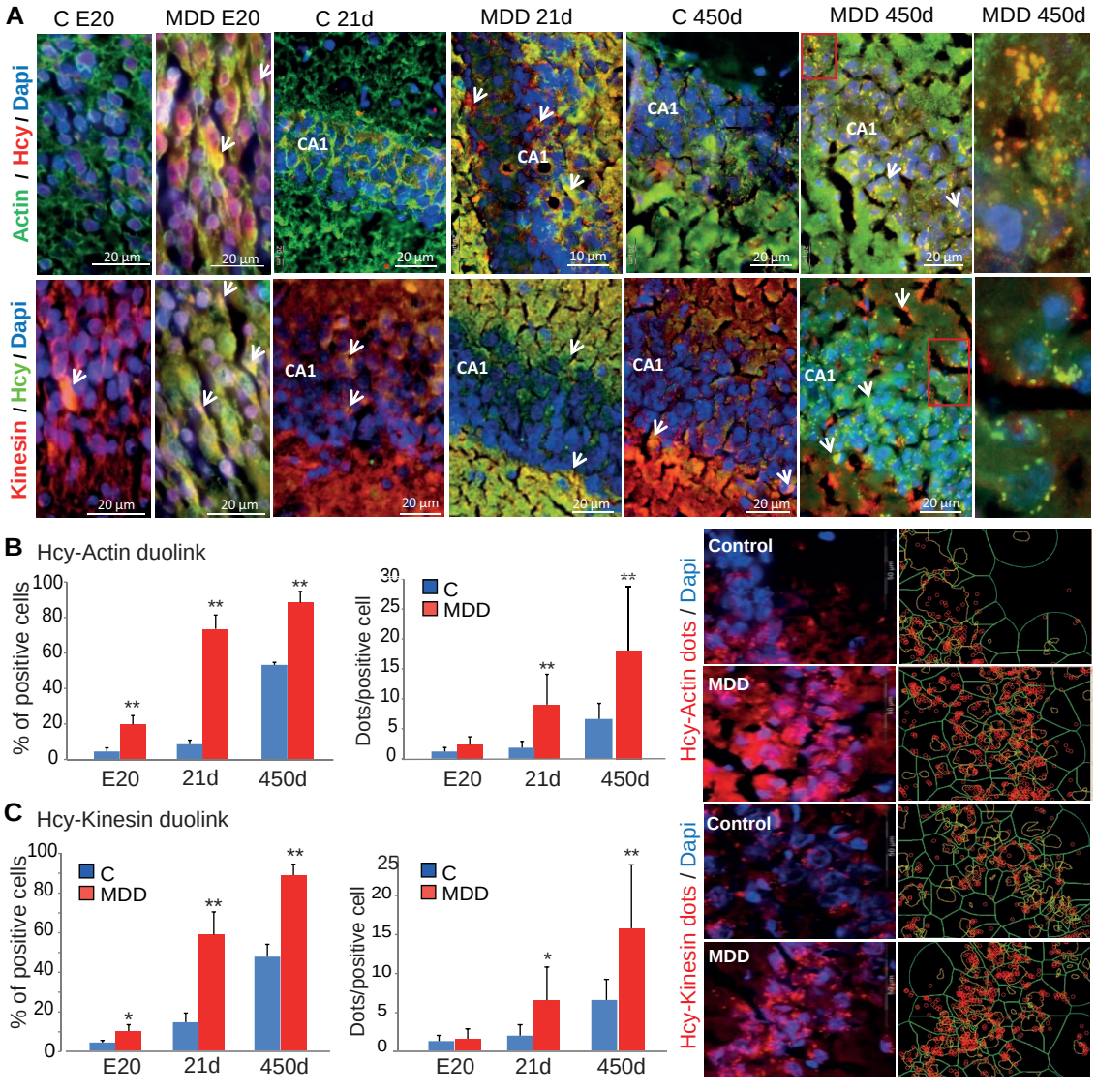
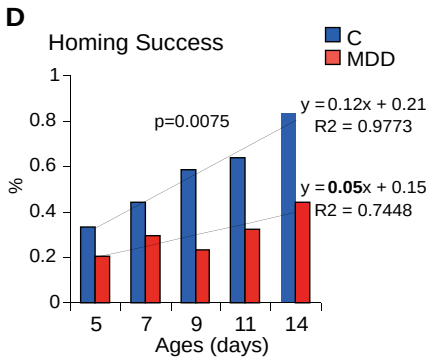
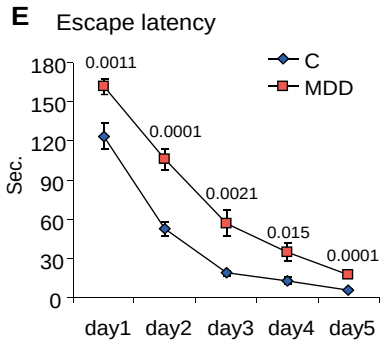
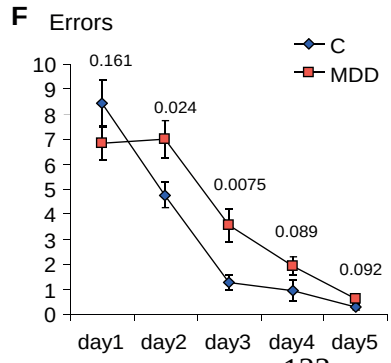

G.
Control
B9 deficient
PSD-95 / Dapi
20 µm
Control
B9 deficient
Synaptotagmin / Dapi
20 µm

Figure 7


A
C E20
MDD E20
C 21d
MDD 21d
C 450d
MDD 450d
MDD 450d
Actin / Hcy / Dapi
Kinesin / Hcy / Dapi
CA1
20 µm
10 µm
B
Hcy-Actin duolink
% of positive cells
Dots/positive cell
C
MDD
E20
21d
450d
Control
MDD
Hcy-Actin dots / Dapi
C
Hcy-Kinesin duolink
% of positive cells
Dots/positive cell
Control
MDD
Hcy-Kinesin dots / Dapi


D
Homing Success
C
MDD
p=0.0075
y = 0.12x + 0.21
R2 = 0.9773
y = 0.05x + 0.15
R2 = 0.7448
%
Ages (days)


E
Escape latency
C
MDD
Sec.
0.0011
0.0001
0.0021
0.015
0.0001
day1
day2
day3
day4
day5


F
Errors
C
MDD
0.161
0.024
0.0075
0.089
0.092
day1
day2
day3
day4
day5

Supplemental Information

Inventory:

7 Figures as follows:

- Figure S1, related to Figure 1, graphical abstract (with the corresponding legend)

- Figure S2, related to Figure 2 (with the corresponding legend)

- Figure S3, related to Figure 3 (with the corresponding legend)

- Figure S4, related to Figure 4 (with the corresponding legend)

- Figure S5, related to Figure 5 (with the corresponding legend)

- Figure S6, related to Figure 6 (with the corresponding legend)

- Figure S7, related to Figure 7 (with the corresponding legend)

Supplemental Information

Inventory:

7 Figures as follows:

- Figure S1, related to Figure 1, graphical abstract (with the corresponding legend)

- Figure S2, related to Figure 2 (with the corresponding legend)

- Figure S3, related to Figure 3 (with the corresponding legend)

- Figure S4, related to Figure 4 (with the corresponding legend)

- Figure S5, related to Figure 5 (with the corresponding legend)

- Figure S6, related to Figure 6 (with the corresponding legend)

- Figure S7, related to Figure 7 (with the corresponding legend)

Supplemental Experimental Procedures

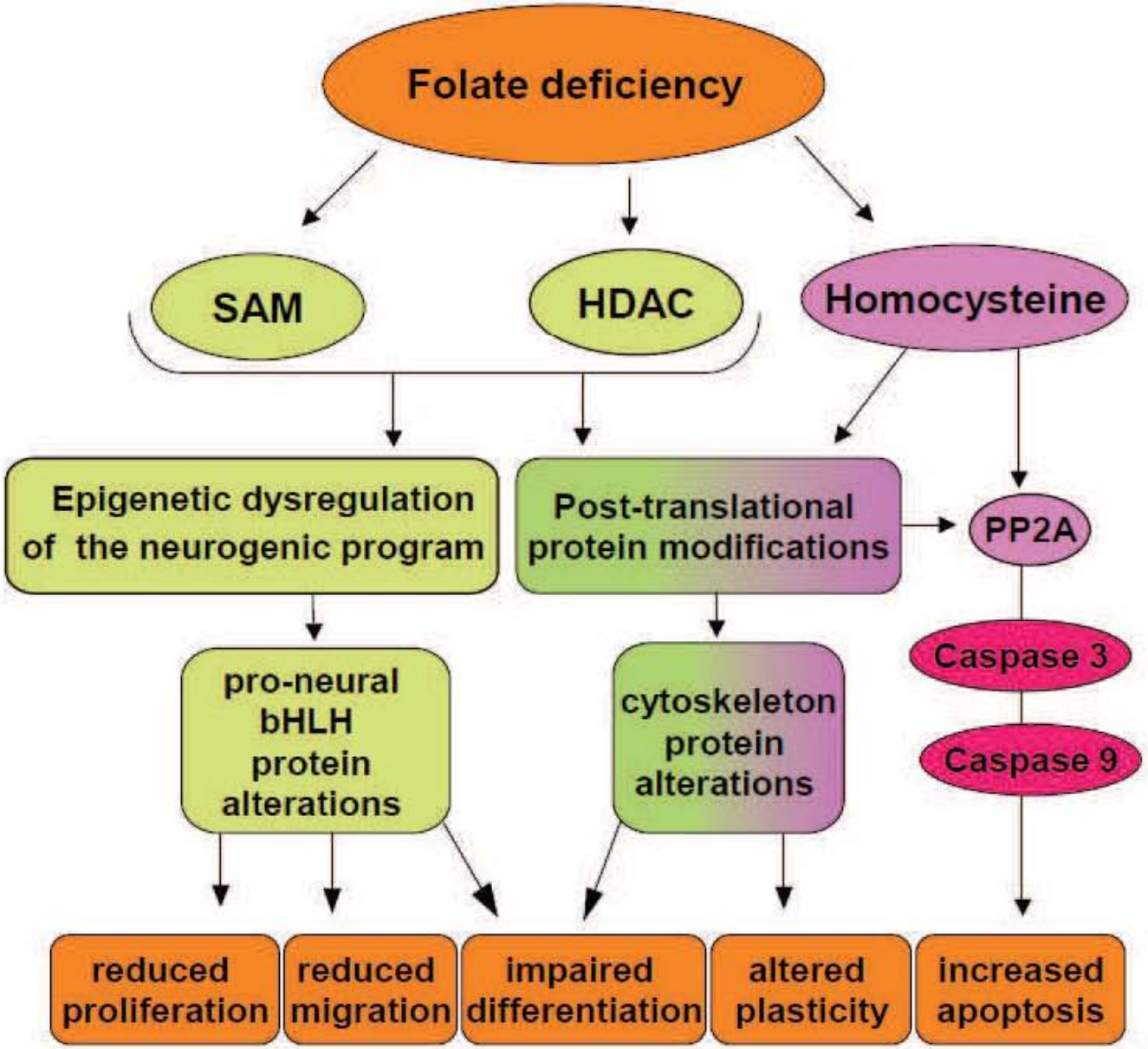


Figure S1, related to Figure 1. Suggested sequential events governing the fate of folate-deficient neuronal cells.

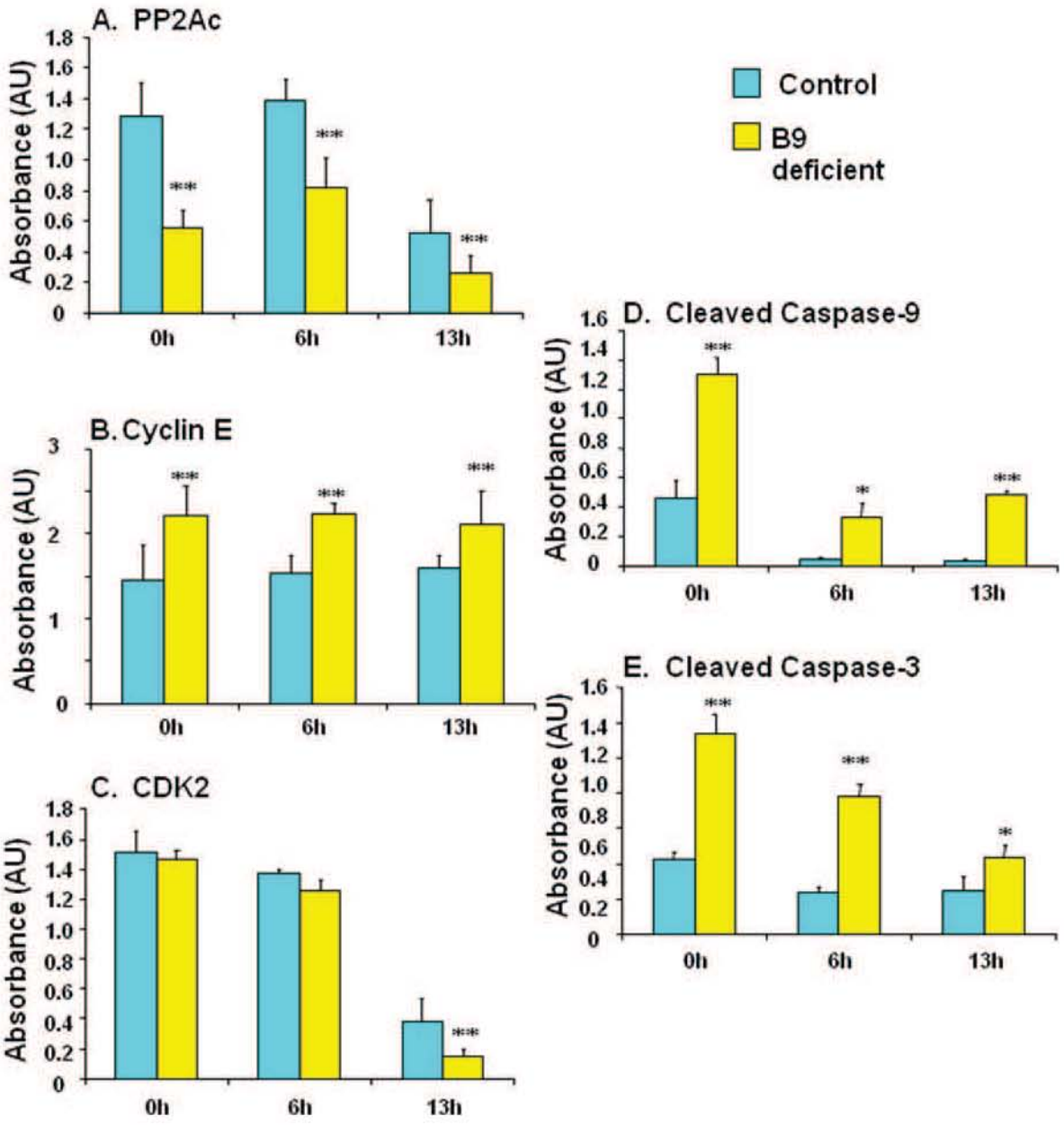

A. PP2Ac
Absorbance (AU)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0h
6h
13h
***
Control
B9 deficient
B. Cyclin E
3
2
1
0
C. CDK2
D. Cleaved Caspase-9
**
E. Cleaved Caspase-3

Figure S2, related to Figure 2. Effects of folate deficiency on various proteins involved in cell fate, densitometric analyses corresponding to Figure 2F Western blots. Data are reported as means ± s.d. in arbitrary units and were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: *$P < 0.05$ and **$P < 0.01$.

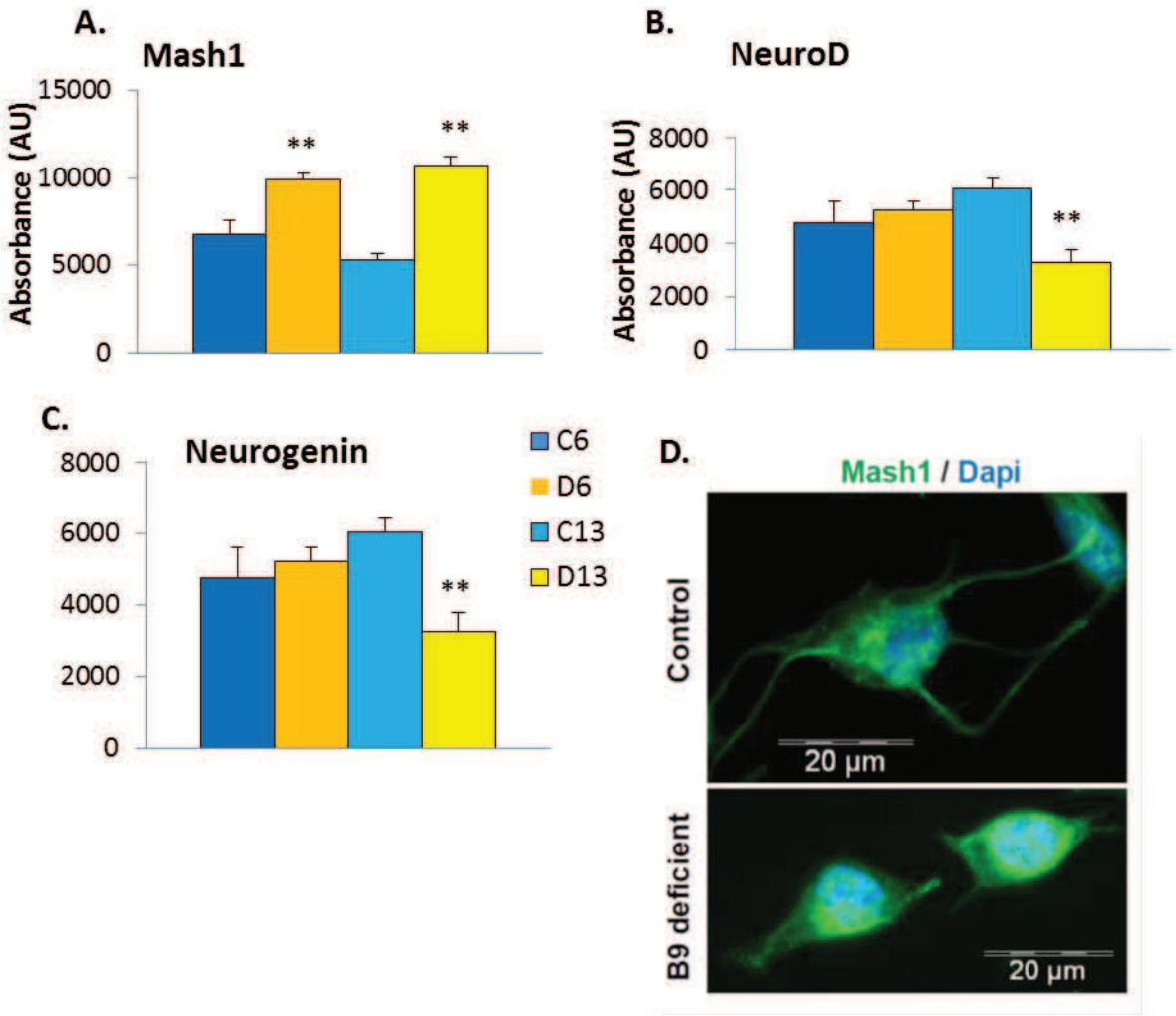

A.
Mash1
Absorbance (AU)
15000
10000
5000
0
**
**
B.
NeuroD
Absorbance (AU)
8000
6000
4000
2000
0
**
C.
Neurogenin
8000
6000
4000
2000
0
**
C6
D6
C13
D13
D.
Mash1 / Dapi
Control
20 µm
B9 deficient
20 µm

Figure S3, related to Figure 3. Effects of folate deficiency on proneural bHLH factors. **(A-C)** Densitometric analyses corresponding to Figure 3C Western blots. Data are reported as means ± s.d. in arbitrary units and were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: $^{**}P < 0.01$. (**D**) Immunostaining of Mash1 in 13h-differentiated H19-7 cells. Note the major nuclear/perinuclear localization in deficient cells. Cell nuclei were counterstained by Dapi. Experiments were performed in triplicate with similar observations.

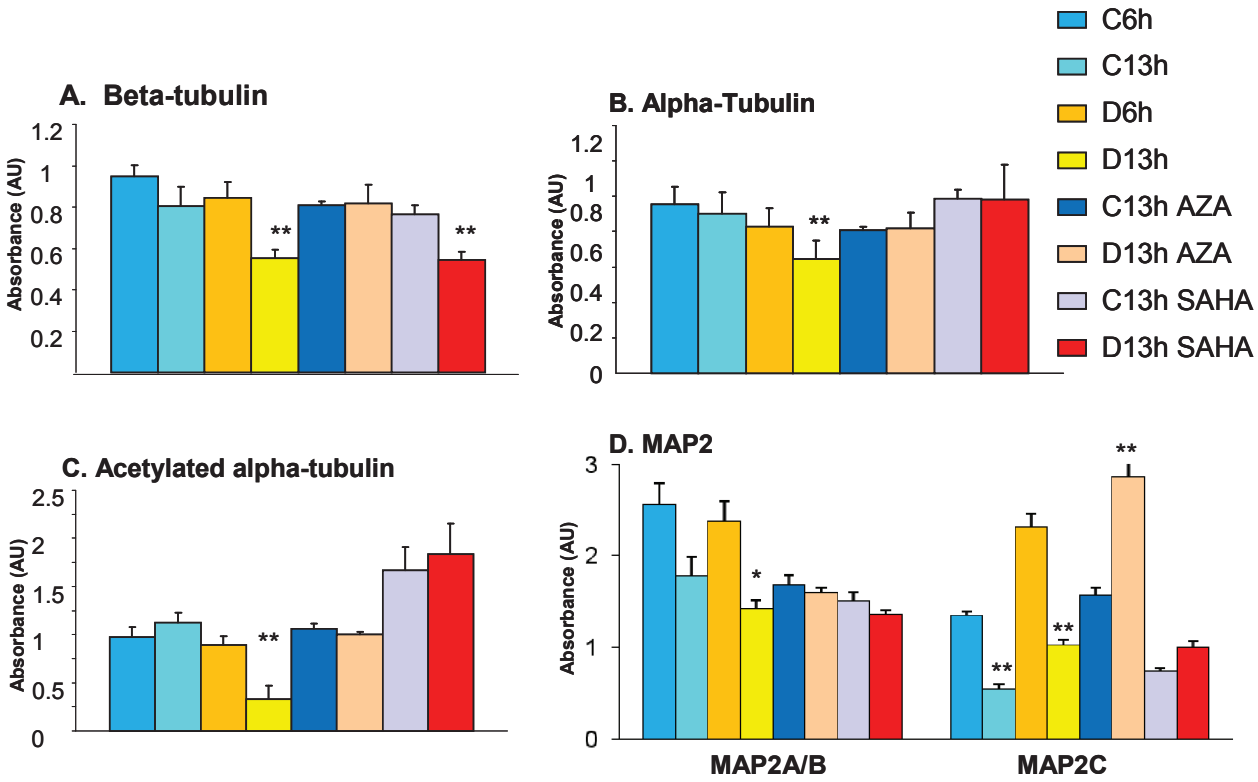


Figure S4, related to Figure 4. Effects of folate deficiency on microtubules-related proteins. Densitometric analyses corresponding to Figure 4A Western blots in the various conditions studied. Data are reported as means ± s.d. and were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

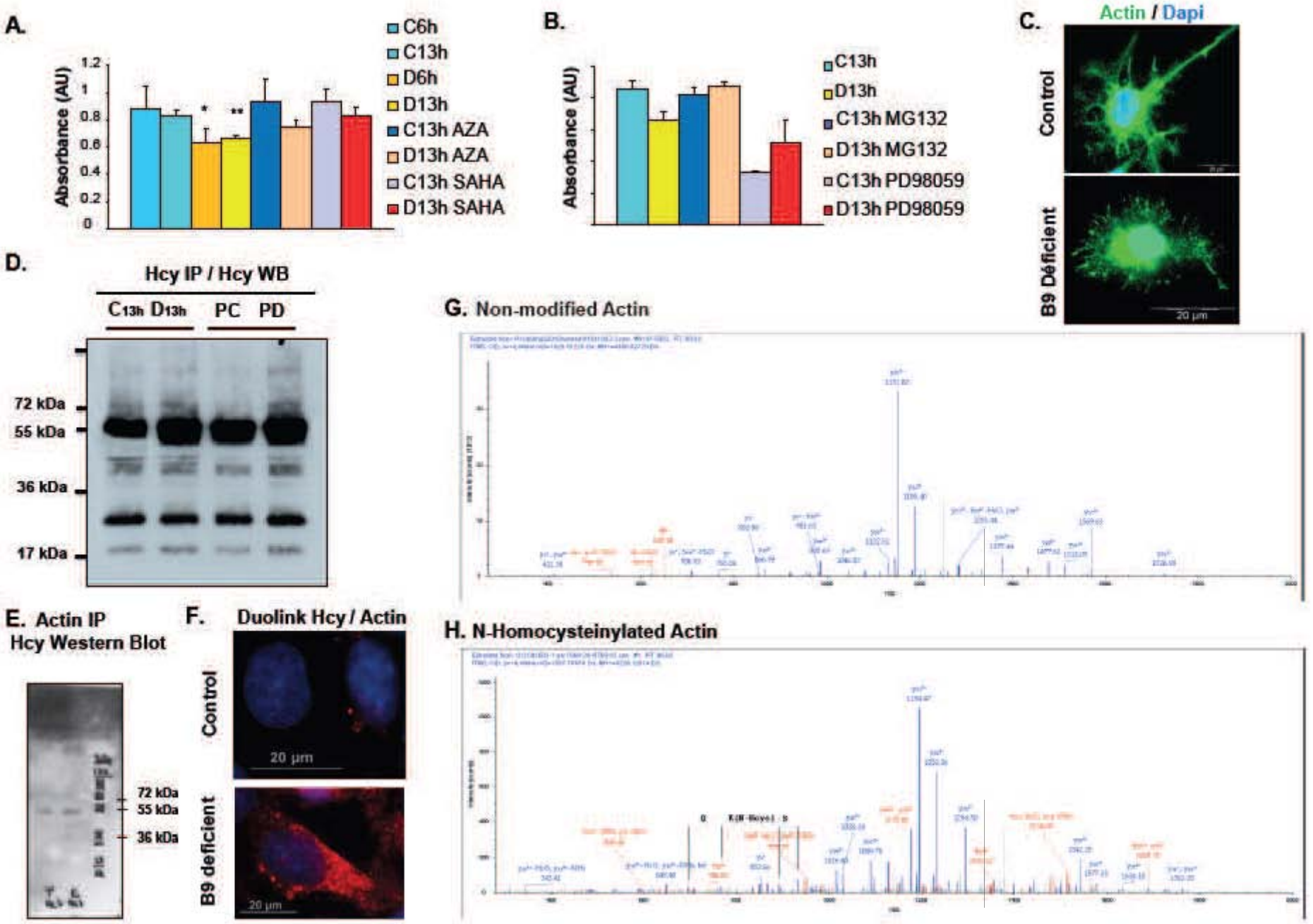

A.
Absorbance (AU)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
**
C6h
C13h
D6h
D13h
C13h AZA
D13h AZA
C13h SAHA
D13h SAHA
B.
Absorbance (AU)
C13h
D13h
C13h MG132
D13h MG132
C13h PD98059
D13h PD98059
C.
Actin / Dapi
Control
B9 Déficient
20 µm
D.
Hcy IP / Hcy WB
C13h D13h
PC PD
72 kDa
55 kDa
36 kDa
17 kDa
G. Non-modified Actin
E. Actin IP
Hcy Western Blot
72 kDa
55 kDa
36 kDa
F.
Duolink Hcy / Actin
Control
B9 deficient
20 µm
H. N-Homocysteinylated Actin

Figure S5, related to Figure 5. Effects of folate deficiency on actin and homocysteinylation studies. (**A**) Densitometric analyses corresponding to Figure 5A Western blots. (**B**) Densitometric analyses corresponding to Figure 5F Western blot (MG132 corresponds to the proteasome inhibitor and PD98059 to the MEK inhibitor). Data are reported as means ± s.d. and were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$. (**C**) Immunostaining of actin in 13h-differentiated control and deficient cells showing the lack of cell polarity and abnormal filopodias in deficient cells. **(D)** Immunoblot corresponding to homocysteine immunoprecipitation (Hcy IP) followed by homocysteine Western blot analysis (Hcy WB) in proliferating (P) and 13h-differentiated (13h) control (C) and deficient (D) cells. (**E**) Immunoblot corresponding to actin immunoprecipitation followed by hymocysteine Western blot analysis in 13h-differentiated control and deficient cells. (**F**) *In situ* interaction between homocysteine and actin as revealed by red fluorescent dots in the Duolink® "proximity ligation" assay. Experiments were performed in triplicate, leading to similar results. (**G-H**) Mass spectrometry. **(G)** Interpreted CID fragmentation spectrum of the m/z= 1025.76228 (z=4+, exp mas; MH+= 4100.027 Da, theoretical mass 4100.022 Da) precursor ion of cytoplasmic actin 1/2 of sequence: YSVWIGGSILASLSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHR. The most intense ions are y31(3+),y32(3+). **(H)** Interpreted CID fragmentation spectrum of the m/z= 1057.78674 (z=4+, exp mass MH+=4228.12 Da, theoretical mass 4228.0422 Da) precursor ion of cytoplasmic actin 1/2 of sequence: YSVWIGGSILASLStFQQMWIS**K(N-Hcys)**QEYDESGPSIVHR. Representative y(2+) ions around the modified residue (SKQ) are labelled on the spectrum. The most intense ions are y31(3+),y32(3+).

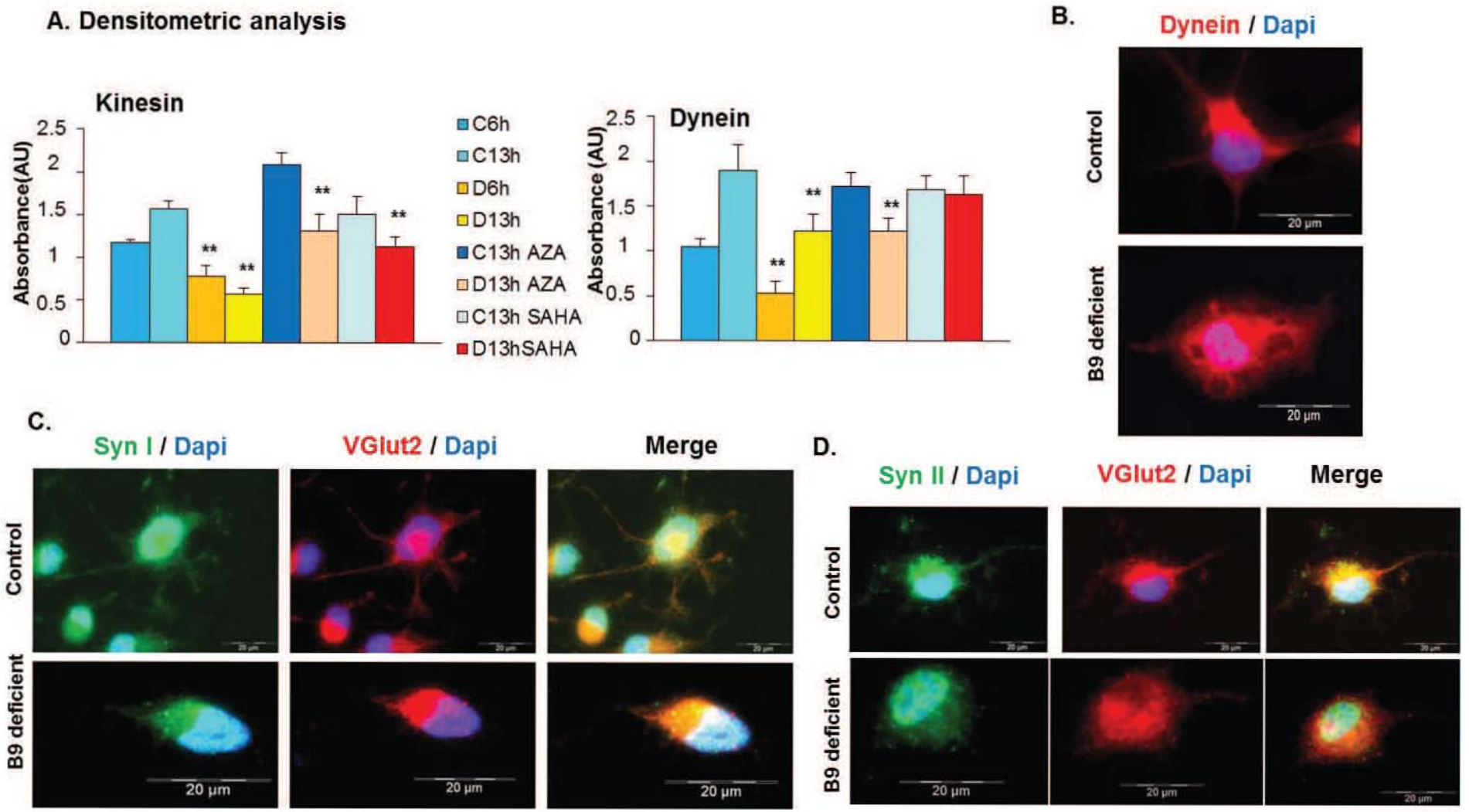


Figure S6, related to Figure 6. Effects of folate deficiency on motor proteins (**A**) Densitometric analyses corresponding to Figure 6A Western blots in the various conditions studied. Data are reported as means ± s.d. and were obtained from three separate experiments. Statistically significant differences between control and folate-deficient cells: $^{**}P < 0.01$. (**B**) Effect of folate deficiency on dynein cell distribution at 13h

after induction of differentiation. **(C,D)** Immunohistological colocalization of synapsins with the vesicular marker VGlut2. Note the restricted perinuclear localization in B9 deficient cells as compared to controls.

	Controls 21days	MDD 21 days
Plasma Homocysteine (µmol/L)	6.3 ± 0.2	42.5 ±3.6 **
Plasma B9 (nM)	74.1 ± 4.5	15.4 ± 1.9 **
Plasma B12 (nM)	648.9 ± 29.1	286.6 ± 17.6 **
Brain tissue SAM / SAH ratio	4.5 ± 0.33	3.1 ± 0.37 *

Figure S7, related to Figure 7: Effects of the dietary regimen in 21-day-old rat pups. Plasma concentrations of homocysteine, vitamins B9 and B12 ($n_C = 17$, $n_{MDD} = 20$) and brain SAM/SAH ratio ($n_C = 6$, $n_{MDD} = 14$). All data are means ± s.d. Statistically significant differences between controls and MDD: *P<0.05 and **P<0.01. MDD = methyl donor deficiency; SAM = S-adenosylmethionine; SAH = S-adenosylhomocysteine.

Supplemental Experimental Procedures

Cultures

H19-7 progenitors were seeded in 24-well plates (Falcon) precoated with poly-L-lysine in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U/mL penicillin, 50 U/mL streptomycin, 2 mM glutamine and 1 mM sodium pyruvate, as previously described (Akchiche et al., 2010) . They were allowed to proliferate at the temperature of 33°C in 95% air/5% CO2. Selection was maintained with 200 μg/mL G418. Folate deficiency was induced by using DMEM lacking vitamin B9 (Invitrogen). After 24h, cells were washed and shifted to the non-permissive temperature (39°C) for induction of their differentiation in high-glucose-DMEM (with or without B9) containing 1% fetal calf serum, N2 supplement (Invitrogen) and 0.11 mg/mL sodium pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mg/mL transferrin, 20 nM progesterone, 0.1 mM putrescine and 30 nM sodium selenite.

Immunohistochemistry

Fixed cells were blocked in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and incubated overnight with an antibody against one of the following proteins: NeuroD (goat polyclonal, 1/300, Santa-Cruz), NeuN (mouse monoclonal, 1/100, Chemicon International), VGluT2 (mouse monoclonal, 1/200, Chemicon International), PSA-NCAM (mouse monoclonal, 1/150, AbCys SA), synapsin I (rabbit polyclonal, 1/100, Calbiochem), synapsin II (rabbit polyclonal, 1/100, Abcam), PSD-95 (rabbit polyclonal, 1/200, Abcam), synaptotagmin I (lumenal domain, clone 604.2, mouse monoclonal, 1/50, Synaptic Systems), HDAC4 (mouse monoclonal, 1/200, Abcam), kinesin, heavy chain, a.a. 420-445, clone H2 (mouse monoclonal, 1/200, Millipore), dynein 74 kDa intermediate chains (mouse monoclonal, 1/200, Millipore), Map2 (rabbit polyclonal, 1/200, Millipore), actin (goat polyclonal, 1/200, Santa-Cruz), α-tubulin (rabbit polyclonal, 1/200, Millipore), acetylated α-tubulin (mouse monoclonal, 1/200, Abcam), β-tubulin (mouse monoclonal, 1/200, Abcam,), vinculin (mouse monoclonal, 1/200, Abcam), homocysteine (rabbit polyclonal, 1/200, Millipore).

After a washing step, immunoreactivity was assessed by incubation in the presence of a matching secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1h at 25°C (1/1,000, Molecular Probes). Control experiments were conducted by omitting the primary antibody. Immunofluorescence visualization and unbiased cell counts in randomly selected fields were performed with a BX51WI microscope (Olympus) and analyzed by Cell® software. Labelled cells were calculated as a percent of total cells after Dapi staining.

Western blotting

Antibodies against the following proteins were used: MTR (goat polyclonal, 1/500, Abcam), MTHFR (mouse monoclonal, 1/3,000, Interchim), PP2Ac (mouse monoclonal, 1/1,000, Cell Signaling Technology), cyclin E (rabbit polyclonal, 1/1,000, Santa-Cruz), Cdk-2 (goat polyclonal, 1/3,000, Santa-Cruz), cleaved caspase-3, Asp175 (rabbit polyclonal, 1/2,000, Cell Signaling Technology), cleaved caspase-9, Asp353 (rabbit polyclonal, 1/2,000, Cell Signaling Technology), NeuroD (goat polyclonal, 1/500, Santa-Cruz), Mash1 (rabbit polyclonal, 1/500, Abcam), Neurogenin3 (rabbit polyclonal, 1/500, Millipore), kinesin (1/1,000), dynein (1/1,000), Map2 (1/1,000), actin (1/1,000), α-tubulin (1/1,000), acetylated α-tubulin (1/1,000), β-tubulin (1/1,000), homocysteine (1/750). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, mouse monoclonal, 1/1,000, Abcam) was used as an internal standard. Polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 1h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1/5,000, Molecular Probes). Quantity One software, associated with the VersaDoc imaging system (Model 1000, Bio-Rad Laboratories), was used to quantify signals.

Quantitative Real-Time PCR

Specific amplifications were performed using as primers: actin forward 5'-ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA-3', reverse 5'-ACGGAGCTCGTTGTAGAAAGT-3' (expected product size 167 bp), HDAC4 forward 5'-AAGGCCACACTGGAAGAG-3', reverse 5'-TATCACTATCCACCCCAACA-3' (expected product size 151 bp),. Quantification was performed with ribosomal protein S29 (RPS29) as an internal standard with the following primers: forward 5'-ATGGGTCACCAGCAGCTCTA-3' and reverse 5'-CATGTTCAGCCCGTATTTGC-3'

(expected product size 114 bp). Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products. PCR cycling for actin was 10 min at 95°C to activate the enzyme, followed by 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Cycling for HDAC4 was 15 min at 95°C followed by 43 cycles consisting of 95°C for 10 s, and 72°C for 10 s. Cycling for RPS29 run was 15 min at 95°C followed by 50 cycles of 94°C for 10 s, 55°C for 20 s and 72°C for 15 s.

Results were expressed as arbitrary units by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of actin and HDAC4 mRNAs and the corresponding internal standard by using the RelQuant software (Roche).

Mass spectrometry

nano-LC-MS/MS: Immunoprecipitated proteins were eluted from the immunoaffinity support and directly identified by nano-LC-MS/MS analysis. The same experiment was repeated three times, and only cellular proteins that were found enriched in the deficiency group were considered. We found large overlaps between all three experiments, thus demonstrating the robustness of the experimental approach.

Mass spectrometry analysis: Search was performed against a non-redundant database of rodent protein sequences from Swissprot to which corresponding random decoy entries were added. Mascot was run in MS/MS Ion search mode with the following parameter settings: no fixed modification, variable modifications (homocysteinylation on lysine and homocysteinylation on cysteine), precursor mass tolerance 10 ppm, fragment ions mass tolerance 0.6 Da, 2 missed cleavages and trypsin as digestion enzyme. Additional filtering was applied after protein and peptide identification for further analysis, using following criteria: for single and multiple peptide hit proteins each Mascot ion score ≥30. Such criteria allowed us to obtain a false-positive rate below 1% for each injection, based on numbering of identified decoy entries.

Behavioral studies

For homogeneity, tests were always performed between 8 and 11 a.m.

Homing test: To monitor the basic learning functions of pups, their abilities to successfully return to their home-cage by using environmental sensitive information were recorded in a T-maze between post-natal days 5 and 14. At each time point studied, rats performed one-trial test consisting in moving freely in a T-maze area (30cm in length for each arm, walls of 10cm high and a corridor of 5cm wide). The home-cage (without the dam) was positioned at the end of one arm and a clean cage of the same size was positioned at the end of the opposite arm. The position of cages was randomly distributed between the right and the left sides of the maze, and the corridor of the maze was carefully washed between each animal. The test was considered successful when the pup returned directly to his home-cage without visiting the arm containing the clean cage and without returning to the starting arm. The duration of the test was limited to 5 min.

Multiple T-maze: Animals were tested for learning and memory (spatial reference memory) in a multiple T-maze with 6 choice points and dimensions of 180 x 110 cm. The alley through which the animals navigated had a height of 35 cm and a width of 8 cm. It is assumed that food deprivation motivates animals to reach the goal box where they would be rewarded with food. Rats deprived of food for 24 hours were trained two times per day for five consecutive days between postnatal days 40 and 44. Time to reach the goal as well as wrong decisions at the choice points (number of errors) were recorded.

SYNTHESE DE LA PUBLICATION 1

Le déficit en folate a été obtenu par l'utilisation de milieux de culture dépourvus en vitamine B9. Ce traitement s'est traduit par une chute de la concentration intracellulaire de folates. Comme dans le modèle animal mis au point dans la laboratoire (*Blaise et al., 2007*) ceci a eu pour conséquence des perturbations des enzymes du métabolisme des monocarbones (MTHFR et MTR), aboutissant à une forte élévation de la teneur en homocystéine. Cette augmentation est de plus amplifiée par l'absence d'activité CBS (voie de catabolisme de l'homocystéine) dans les progéniteurs neuronaux. On observe par ailleurs une chute du ratio SAM/SAH, c'est à- dire de l'index de méthylation, dans les cellules différenciées. Non seulement la carence en B9 affecte la prolifération des progéniteurs avant induction de leur différenciation, mais elle réduit leur capacité de migration. Au cours de la phase de différenciation, le déficit en folates est associé à une diminution de la survie des cellules avec une perte du potentiel de membrane mitochondriale, une plus forte activation des caspases 9 et 3 et une accentuation de la mort des cellules par apoptose. Ce processus ferait intervenir une répression de PP2A, en lien avec une augmentation de la cycline E et une réentrée des neurones différenciés dans le cycle cellulaire, prélude à la mort neuronale.

De manière générale, la carence en folates ne modifie pas le profil d'expression des marqueurs neuronaux. Toutefois, différents arguments suggèrent que la différenciation des cellules est fortement perturbée. Le pourcentage de cellules présentant des prolongements cellulaires ainsi que la longueur des dendrites sont significativement réduits dans les cellules déficientes en folate. De même, la PSA-NCAM – qui est non seulement impliquée dans la migration cellulaire mais régule la croissance axonale – est moins exprimée et sa localisation est davantage restreinte à l'espace périnucléaire. Ce type de localisation ectopique se retrouve également pour le marqueur glutamatergique VGLUT2, attestant d'une perturbation de la répartition cellulaire d'acteurs fonctionnels importants.

Les gènes proneuraux de la famille des bHLH (Mash1, NeuroD et Neurogenine 3) qui interviennent dans le programme neurogénique présentent une expression altérée consécutivement à des dérégulations épigénétiques en lien avec la carence en folates. Le devenir des cellules est d'autant plus perturbé par l'augmentation de HDAC4, les histones désacétylases exerçant des effets répresseurs de la différentiation neuronale.

Ces différentes observations ont conduit à étudier les composants du cytosquelette. En plus de la diminution des différentes protéines constituant les microtubules (β-tubuline, α-tubuline, α-tubuline acétylée, MAP2 A/B), le déficit en B9 entraîne une désorganisation du cytosquelette illustrée par l'apparition de filopodes anormaux, une localisation périnucléaire de ces différents éléments ainsi que l'absence de polarité cellulaire qui requiert la présence d'α-tubuline acétylée. Cette dernière anomalie est partiellement corrigée par un traitement au SAHA, un inhibiteur des histones déacétylase. La carence affecte également une autre protéine majeure du cytosquelette, l'actine, via une N-homocystéinylation sur le résidu lysine 359 confirmée par spectrométrie de masse et associée à une agrégation dans les cellules. De même, il a été mis en évidence des altérations fonctionnelles du transport vésiculaire illustrées par une diminution d'expression des protéines motrices, la dynéine et la kinésine. Alors que les taux cellulaires de ces deux protéines étaient réduits, seule la kinésine était modifiée par

homocystéinylation, ce qui a eu pour conséquence, tout comme pour l'actine, de réduire les interactions avec ses protéines partenaires, en particulier la β-tubuline

Enfin, une altération de la plasticité et de l'activité synaptique est fortement suggérée par l'expression anormale de la synaptotagmine I (pré-synaptique) et du PSD-95 (post-synaptique) pour lequel la formation de clusters, un index de l'activité synaptique, est réduite.

Ces résultats ont été par ailleurs confirmés *in vivo* sur le modèle animal à différents âges (au stade embryonnaire E20, puis aux âges de 21 et 450 jours). Ainsi, au niveau de l'hippocampe, on retrouve une interaction entre l'homocystéine et les deux protéines actine et kinésine. En raison de l'importance de la réorganisation du cytosquelette pour la plasticité synaptique lors des fonctions cognitives, les modifications engendrées par la déficience en folates entraîne des déficits dans l'apprentissage et la mémoire, notamment visuo-spatiale qui fait intervenir l'hippocampe qui perdurent jusqu'au stade du vieillissement.

Après avoir caractérisé les événements cellulaires dans les neurones hippocampiques *in vitro*, nous nous sommes intéressés à une autre structure cérébrale pour laquelle les conséquences d'une carence en donneurs de méthyles sont peu connues. En effet, le cervelet est une des zones du cerveau particulièrement sensible à une accumulation d'homocystéine et des troubles cérébelleux ont été décrits à la suite d'une carence en folates. De plus, lors du vieillissement notamment, des troubles de la marche et de l'équilibre impliquant le cervelet peuvent apparaitre mais le statut nutritionnel des sujets concernés n'est généralement pas documenté.
Les deux publications suivantes aborderont cette problématique à l'âge adulte et lors du vieillissement.

DEUXIEME PARTIE **: Une carence en donneurs de méthyles modifie la neuroplascticité cérébelleuse dépendante des synapsines via une altération de la voie des récepteurs aux œstrogènes**

OBJECTIFS DE LA PUBLICATION 2

De nombreuses études ont montré une association entre une carence en donneurs de méthyles (folates et cobalamine) et des troubles cognitifs illustrés par une accélération du déclin cognitif et une démence (*Clarke.,2006 ;Miller.,2006*). De plus, les risques de développer une maladie d'Alzheimer seraient plus importants chez les personnes âgées qui présentent un taux sanguin élevé d'homocystéine (*Seshadri et al.,2002*). Une carence en donneurs de méthyles d'un point de vue métabolique entraine une accumulation intracellulaire d'homocystéine et une diminution du rapport S-adénosylméthionine/S-adénosylhomocystéine (SAM/SAH) qui représente le déterminant clé des mécanismes épigénétiques (*Battaglia-Hsu et al.,2009 ; Burdge et Lillycrop.,2010*). Malgré ce lien métabolique, beaucoup d'études se sont intéressées aux conséquences cellulaires (apoptose, inflammation, stress oxydant, lésions microvasculaires) (*Troen et al.,2008 ;Daval et al.,2009*) et moins aux mécanismes épigénétiques et épigénomiques (Reynolds.,2006). En clinique, les données concernant les effets de la supplémentation en acide folique et en vitamine B12 sur le déclin cognitif des personnes âgées sont contradictoires (*Durga et al.,2007 ; Stanger et al.,2009*). En outre, les résultats concernant le modèle gestationnelle de carence en donneurs de méthyles chez le rat ont montré une atrophie hippocampique associés à des troubles cognitifs persistants à long terme et cela malgré le retour à une alimentation normale (*Blaise et al.,2007*).

Alors que la connaissance des effets des carences en B12/B9 sur les fonctions mnésiques a progressé, les données sur le cervelet et ses fonctionnalités sont beaucoup plus rares. Le statut nutritionnel a une importance critique sur le développement et la maturation cérébelleuse. En effet, la couche cellulaire intégrative et fonctionnelle la plus importante de cette structure, les cellules de Purkinje, sont très sensible aux conditions environnementales, notamment lors de certaines périodes de la vie qui sont plus à risque de carence en donneurs de méthyles comme la période développemental ou le vieillissement (*Forges et al.,2007 ;Black.,2008*). De plus, le cervelet présente une fenêtre temporelle de maturation plus large que d'autres structures cérébrales comme l'hippocampe (*Tiemeier et al.,2010*). Ce phénomène peut donc conduire à une exposition encore plus longue des cellules de Purkinje au risque de perturbations qui pourraient compromettre leur maturation (synaptogenèse) et leur bon fonctionnement. Afin de mieux comprendre les conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le fonctionnement cérébelleux, nous avons utilisé le modèle gestationnel de rats carencés en vitamine B9, B12 et choline (*Blaise et al., 2007 ; Daval et al., 2009*), le modèle cellulaire neuronal (H19-7) carencé en folates et nous avons corrélé nos résultats avec des données chez l'Homme issue d'une cohorte de personnes âgées présentant des troubles de la coordination locomotrice (*Guéant-Rodriguez et al.,2011*).

Methyl donor deficiency alters synapsin-dependent cerebellum plasticity through impaired pathways of estrogen nuclear receptor alpha

Grégory Pourié,[1] Nicolas Martin,[1,*] Carine Bossenmeyer-Pourié,[1,*] Rosario Spada,[2,*] Nassila Akchiche,[1,] Alexis Lion,[1] Rosa Maria Guéant-Rodriguez,[1] Philippe Perrin,[1] Elise Jeannesson,[1] Lydie Levavasseur,[1] Sarah El Chakour, [1] Stéphanie Dovi Acouetey,[1] Patrick Brachet,[3] Paolo Bosco,[2] Guido Anello,[2] Giuseppe Stella,[2] Violette Koziel,[1] Jean-Marc Alberto,[1] Deborah Helle,[1] Renée Debard,[1] Florence Coste,[1] Brigitte Lehninger,[1] Sylvain Poussier,[4] Pierre-Yves Marie,[5] Maurizio Elia,[2] Antonino Romano,[2] Jean-Luc Daval,[1] Jean-Louis Guéant.[1,2]

[1]Inserm U-954, Nutrition-Genetics and Environmental Exposure, Medical faculty and University Hospital Center, Nancy University, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France.

[2]IRCCS, Oasi Maria S.S. – Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina (EN), Italy

[3]Human Nutrition Unit, UMR 1019 INRA/University of Auvergne, INRA Centre of Theix, Saint-Genès Champanelle, France

[4]NancycloTEP, Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Nancy, Nancy, France

[5]Inserm U-961, Medical faculty and University Hospital Center, Nancy University, Nancy, France

Correspondence should be addressed to Jean-Louis Guéant and Gregory Pourié, Inserm U-954, Nutrition-Genetics and Environmental Exposure, Medical faculty and University Hospital Center, Nancy University, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France (jean-louis.gueant@medecine.uhp-nancy.fr and Gregory.POURIE@iutnb.uhp-nancy.fr)

*Authorship note: N. Martin, C. Bossenmeyer-Pourié and R. Spada contributed equally

The authors declare no competing financial interests.

ABSTRACT

Deficiency in methyl donors leads to dementia and homocysteine predicts neurodegeneration, but their influence on cerebellum is not known. We studied the effects of deficiency during gestation and lactation on the cerebellum of rat offspring. Deficient diet produced a decreased PET activity in cerebellum and altered motor coordination in females, with homocysteine accumulation in Purkinje cells. Lower synapsin expression was the major change in proteomics of cerebellum and in progenitors cultivated in deficient medium. It was related to decreased transcription factor EGR-1 through decreased S-adenosylmethionine /S-adenosylhomocysteine ratio and ERα pathways, with hypomethylation of ERα and its decreased interaction with PGC-1α. This was confirmed by a synergistic inhibiting effect of methyl donor deficiency and ERα antagonist on synapsin protein expression. The reduced ERK1/2-dependent phosphorylation of synapsins produced their peri-nuclear concentration and release from synaptic vesicles. Cerebellum dysfunction and decreased synapsin were also found in adult rats. In elderly human subjects, we reported an association between linear walking deficit and rs795009 polymorphism of syn2 gene only in cases with increased homocysteine. These data provide the first evidence that methyl donor deficiency produces locomotion disorders related to altered cerebellum plasticity through impaired ERα pathways and downstream altered expression and functions of synapsins.

INTRODUCTION

Deficiency in methyl donors, folate and vitamin B12, is associated with accelerated cognitive decline, abnormal brain aging and dementia (1,2,3,4). Homocysteine has been also identified as a predictor of Alzheimer's disease (4). At the metabolic level, the cellular deficiency in methyl donors produces an accumulation of homocysteine and a decreased S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio, which is a key determinant of epigenetic mechanisms (**Supplemental Figure 1A**) (5,6,7). Despite this metabolic link, insufficient attention has been devoted to epigenomic and epigenetic mechanisms of methyl donor deficiency in the brain[8]. Most investigations have been focused on cellular effects of homocysteine on hippocampus, such as apoptosis, inflammation, cellular stress and microvasculature injury (3,9,10). In addition, the deficiency in vitamin B12 and folate disturbs the proper brain development, by impairing neuronal growth and differentiation (3,6). The interventional studies that aimed to evaluate the effect of folate and vitamin B12 supplementations on cognitive decline in the elderly have provided contradictory findings, suggesting that part of the effects could depend on homocysteine level at baseline, and/or could be irreversible and/or have been produced earlier (11,12). Indeed, early vitamin B deprivation in rat pups has been associated with a definitive atrophy of the CA1 pyramidal layer of the hippocampus, with subsequent long-lasting learning and memory disabilities, long after switch to normal food (9,13).

In contrast to their relation with cognitive functions and their effects in hippocampus, the effects of methyl donor deficiency and subsequent increased homocysteine have never been investigated on plasticity of cerebellum and motor control. Beside the hippocampus, the cerebellum is another potential target of pathomechanisms influenced by nutrition during perinatal development and ageing. Cerebellar Purkinje cells display vulnerability to environmental conditions during pregnancy and the early postnatal period as well as during

ageing, the two periods of life that are at high risk of methyl donor deficiency (2,7,14). This makes them particularly sensitive to environmental (15,16,17) and genetic factors (18). Cerebellum is one of the brain structures that still maturates during the postnatal period, with Purkinje cells developing dendrite connections until teenage years (19). Thus, the more cerebellum Purkinje cells extend their dendrites and proceed to synaptogenesis, the more precise the motor coordination becomes.

Here, we report for the first time that methyl donor deficiency alters motor coordination and cerebellum plasticity in rat offspring and adult animals. Impaired transport of synaptic vesicles resulted from decreased expression and phosphorylation of synapsins (20) through a deregulation of ERα genomic/non-genomic pathways (21). Cerebellum dysfunction was also found in elderly human subjects, with an association between linear walking deficit and rs795009 polymorphism of syn2 gene only in cases with increased homocysteine.

RESULTS

The methyl donor's deficient diet decreased the concentration of folate, vitamin B12 and related metabolic markers in plasma and decreased the SAM/SAH ratio in cerebellum.

The methyl donor deficiency was evidenced by decreased plasmatic concentrations of folate and vitamin B12 (**Supplemental Figure 1B, C**), increased concentrations of homocysteine, methylmalonic acid and succinic acid (**Supplemental Figure 1D-F**) and reduced S-adenosylmethionine /S-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio in the cerebellum of 21-day-old rat pups (**Supplemental Figure 1G**).

Metabolic consequences of the methyl deficient diet were investigated by Positron emission tomography (PET) and by immunohistochemistry on the different cell layers of cerebellum. The high level of FDG activity commonly documented in cerebellum area from normal rats was no more observed in deficient animals (Figure 1A). Homocysteine accumulated preferentially at the interface between the molecular and granular layers, and was evidenced in the three major cell compartments of Purkinje cells, i.e. cell body, dendrites and axons, in deficient animals (**Supplemental Figure 2C-E**). The protein expression of key enzymes involved in homocysteine metabolism was also evaluated in pups' cerebellum. Cystathionine beta-synthase was detected in Purkinje cells of animals subjected to the standard diet but not in the deficient animals. In contrast, the protein expression of methionine synthase was not affected by diet (**Supplemental Figure 2F-K**). Apoptosis of Purkinje cells investigated by immunohistochemical detection of cleaved caspase-3 and DNA fragmentation (Apostain) revealed no difference according to diet or gender (**Supplemental Figure 3**).

The methyl donor deficiency altered the motor coordination of rat pups. The two series of tests on the maturation of motor coordination, righting reflex and negative geotaxis,

showed a gender effect, with abnormalities recorded only in females (**Figure 1B-G**). On the first day of test series on righting reflex, the time necessary to come back to a quadruped position was transiently but significantly increased in deficient females, compared with the control group, while no difference was found within male groups. Similar observations were made in the series of negative geotaxis tests.

Methyl donor deficiency impaired the expression of synaptic proteins in cerebellum. The mechanisms underlying the neurobehavioral abnormalities were considered further by investigating the changes in protein expression. Among the proteins evidenced by proteomic analysis, the major change was observed for synapsin II, a protein that plays a central role in functional neuroplasticity (22,23) (**Figure 2A**). There was a 2.2-fold decreased expression in deficient versus control females. Western blotting (**Figure 2B-D**) confirmed the gender-dependent difference produced by the deficient diet, with deficient females exhibiting a significantly lower expression of synapsins I and II, compared to control females, and a symmetrical change in males (**Figure 2C, D**). The expression of synaptotagmin and PSD-95, two other proteins involved in presynaptic and postsynaptic neuroplasticity, respectively, was also investigated. PSD-95 was significantly reduced in both deficient males and females, compared to controls, while quantification of synaptotagmin did not reveal any difference according to gender and diet (**Figure 2E, F**).

We further studied the tissue distribution of synaptic proteins by immunohistochemistry. Synapsin I labeling was evidenced in the dendrites and axons of Purkinje cells, i.e. in both molecular and white matter zones of the cerebellum in control females (**Figure 3A**). Labeling was dramatically reduced in deficient females (**Figure 3A, D**). In contrast, synapsin II was detected and reduced only in the Purkinje cell bodies of deficient females, compared to controls (**Figure 3B and 3E**). The immunolabeling of PSD-95 showed the same distribution as synapsin II protein, with a strong reduction in the cerebellum layers of deficient females,

where the neurofilament-68 marker was present (**Figure 3C, F**). This suggests a balanced effect in post-synapses in response to the pre-synapse disorganization in deficient animals (24).

Methyl-dependent epigenomic deregulation of ERα pathways rather than direct epigenetic mechanisms could explain the decreased expression of synapsins. Real-time quantitative PCR of synapsin mRNAs revealed a significant gender effect between control groups, with females showing higher amounts of transcripts than males. The deficient females exhibited a lower level of transcripts of synapsins, compared to control animals (**Figure 4A**). We then investigated whether changes in transcript levels resulted from epigenetic mechanisms, since promoters of synapsins are regulated by methylation (25,26). The syn1 promoter region presents few CpG islands compared to that of syn2 (4 vs. 78). Sixty five to 93% of the four CpG islands localized in the promoter region of syn1 were methylated and they were more frequently methylated in males than in females, without influence of methyl donor deficiency. The seventy-eight islands of the syn2 promoter were not methylated, whatever gender or diet (**supplemental Figure 4**). The epigenetic regulation of the expression of synapsin genes was investigated further in a cell model of neuronal progenitors. Neither 5-azacytidine, (5-AZA, a DNA methyltranferase inhibitor) nor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, a histone desacetylase inhibitor) produced any significant change in the expression of synapsins in H19-7 progenitors (**Figure 4B**). The zinc finger transcription factor EGR-1/Zif-268 is a target of Estrogen Receptor alpha (ERα). It is the only known transcription factor able to control the expression of the two synapsin genes (27). We further quantified its expression in the cerebellum. Our results revealed a significant decrease in both deficient males and females, compared to controls (**Figure 4C, D**). These results led us to evaluate the influence of the deficient diet on the expression of ERα in the cerebellar tissue. Western blot analysis of ERα showed a significant decrease in deficient female pups as compared to their

controls (**Figure 4C, D**), while no difference emerged in males. In our cell and animal models, the decreased expression of the protein arginine methyltransferase PRMT-1 and decreased SAM/SAH ratio led us to investigate the role of a deregulation of the genomic and non-genomic pathways of ERα (21). The expression of PRMT-1 showed a gender effect, with deficient females exhibiting lower amounts of protein than controls, with no difference between the two male groups (**Figure 4C, D**). The expression of synapsins I and IIa was decreased upon addition of an ERα antagonist in the culture medium of neuronal progenitors, while it remained unchanged in presence of an agonist. In addition, the effect of the ERα antagonist was dramatically increased when the cells were cultivated in deficient medium (**Figure 4E and supplementary Table 1**). This confirmed that ERα influences synapsin expression and that methyl donor deficiency impairs the pathways of ERα (**Figure 4C-E**).

We confirmed the decrease of the non-genomic and genomic pathways of ERα in deficient condition by evidencing (i) the hypomethylation of ERα and its decreased interaction with PGC1α in Purkinje cells (**Figure 5**) and (ii) the imbalanced localization of PGC1α and ERα in the nucleus and cytoplasm of H19-7 progenitors (**Figure 6A**). The non-genomic effects of ERα are linked to the activation of the ERK pathway (i.e. p42/44 MAPK) (28,29). We observed a significant decrease of phospho-ERK1/2 in deficient females, compared with controls, and consequently, a decreased phosphorylation of synapsin proteins. This could be a consequence of the decreased non-genomic pathway of ERα, since the opposite was found in males (**Figure 4C, D**). We further checked the subcellular localization of synapsins and their interactions with synaptic vesicles, in deficient H19-7 progenitors. Synapsins concentrated more in a peri-nuclear location in deficient H19-7 progenitors, while they were detected also in neuritic processes in control conditions (**Figure 6B**). Finally, a defective activity of synapsins was evidenced in deficient cells by their lack of co-localization with the vesicular

glutamate transporter (Vglut), a marker of synaptic vesicles, on which synapsins bind in peri-nuclear areas and in neuronal processes (**Figure 6C**).

Impaired one-carbon metabolism is also involved in locomotor disorders in adult rats and elderly humans. The consequences of prolonged methyl deficient diet in adult female rats were comparable to those reported in pups, with increased plasma concentration of homocysteine and methylmalonic acid and decreased expression of synapsins (**Supplemental Figure 5A, B**). Deficient animals shared an impaired motor coordination that was evidenced by the linear walking test. We recorded an increased total time to perform the test (**Figure 1F**), along with a higher number of small or deep errors committed in paws placement between the rungs (**Figure 1G and Supplementary Video recordings**), compared to control animals.

We aimed therefore to assess whether synapsin polymorphisms are associated with disorders of postural control related with linear walking and whether methyl donors and homocysteine in elderly subjects of the "Oasi cohort" influenced this association. The average age of the 667 participants was 71.5 years, 400 (60.0%) were women. In this population, homocysteine was strongly associated with folate (R= -0.258, 95% CI: -0.328, -0.184, P<0.001) and vitamin B12 (R= -0.253, 95 CI: -0.324, -0.180, P<0.001), but neither with creatinine (P=0.972) nor with C-reactive protein (P=0.572). Among these volunteers, 287 (43.2%) declared to have disorders of postural/locomotor control. Homocysteine, folate and vitamin B12 were also significantly associated with these declared disorders in univariate analysis (**supplemental Table 2**). We selected four polymorphisms (rs2307981, rs2307973, rs308963 and rs795009) with average intervals of approximately 38 kb in the exon/intron regions of the syn2 gene and investigated their association with declared disorders of postural control. The allele frequency according to disorders of postural control is provided in the **supplemental Table 3**. In age adjusted logistic regression, the allele G of rs795009 was the most significant predictor of

postural disorders in the whole population (*P*= 0.033, OR=1.52, 95% CI: 1.01-2.29) and in females (*P*= 0.013, OR=1.86, 95% CI: 1.13-3.06), but not in males (*P*= 0.804, OR=1.08, 95% CI: 0.56-2.10). Among the participants, a sample of 153 elderly people accepted to be further investigated by posturographic seesaw evaluation. No influence of the four synapsin polymorphisms, of folate, vitamin B12 and homocyteine was observed in the tests performed in eyes open condition. In contrast, significant higher sway path (*P*=0.0059) was observed in eyes closed condition for the volunteers who carried the G-allele of rs795009 and who had a serum concentration of homocysteine higher than the median (> 15.6 µmol/L) (**Supplemental Figure 6**).

DISCUSSION

The deficiency in methyl donors, folate and vitamin B12 produced a gender-dependent impairment of motor coordination, which was evidenced in 21 days female pups and in adult deficient females. The delayed acquisition of movement coordination is thought to be in relation with the developmental and post-developmental role of Purkinje cells (30). Indeed, Purkinje cells are the latest neurons that develop their functionality during the maturation of the cerebellum circuitry, installing a crosstalk with downstream motor fibers for modulating the coordination processes of locomotion (31,32). Among the different cerebellar cell types, Purkinje cells were those particularly exposed to the impaired remethylation of homocysteine under methyl donor deficiency, as evidenced by the selective accumulation of homocysteine. The decreased expression of cystathionine beta-synthase in Purkinje cells was an additional metabolic change that certainly contributes to homocysteine accumulation by decreasing its degradation through the trans-sulfuration pathway (7).

Focusing our search on Purkinje cell dysfunctions, analyses of cerebellum tissue led us to identify synapsins as the major hallmark that could be at the origin of locomotion disorders. Additionally, their altered expression was specifically localized in Purkinje cells and the influence of gender was concordant with that observed for locomotion disorders, with a decreased expression in deficient females and an opposite effect in males. The role of synapsin II in synapse function and plasticity may explain the locomotion disorders produced by the methyl donor deficient diet (20,33). Indeed, synapsins modulate neurotransmitter release at the pre-synaptic terminal by reversibly attaching synaptic vesicles to the actin cytoskeleton (20,34).

According to our data, the change in synapsin expression under methyl donor deficiency was not produced by epigenetic mechanisms. The deficient diet had no effect on the promoter methylation of syn genes, and 5-AZA and SAHA had no influence on synapsin expression in neuronal progenitors (35). The zinc finger transcriptional factor EGR-1/Zif-268 was the best candidate among the proteins that regulate the expression of syn1 and syn2 genes. It is encoded by a target gene of ERα, binds to two sites in the regulatory region of syn (36) and acts as a transcriptional activator of syn1 and syn2 (27,37). The decreased expression of EGR-1/Zif-268 and of ERα in deficient condition and the additional influence of methyl deficiency on the effect of ERα antagonist on synapsin expression prompted us to investigate the deregulation of the pathways of ERα (21). Despite lack of data in the brain, there are solid evidences in other tissues that methylation plays a central role in balancing and regulating the genomic and non-genomic effects of ERα (21). Methylation of ERα and its co-regulator, PGC1α depends on PRMT-1 and SAM/SAH ratio and modulates the interaction between ERα and PGC1α and the extra-nuclear and nuclear targeting of ERα, respectively (21). In agreement with these mechanisms, the reduced expression of PRMT-1 and the decreased SAM/SAH ratio led to a decreased methylation of ERα, a decreased interaction between ERα and PGC1α and an imbalanced detection of ERα and PGC1α in the cytoplasm and the nucleus of the deficient cells (38,39). The non-genomic effects of ERα are linked to the activation of the ERK pathway (i.e. p42/44 MAPK) (28,29). Consistently, the hypomethylation of ERα could explain the decreased activation of ERK pathway (21,38,40) and the subsequent decrease of ERK-dependent phosphorylation of synapsins in the cerebellum of deficient females (28,29,41). In males, the ERK pathway is activated by the androgen receptor (42,43). This may explain that the ERK activation was oppositely influenced by methyl donor deficiency in females and males.

The ERK-dependent phosphorylation of synapsins plays a key role in the modulation of their functionality (20). It contributes to the cellular distribution of synapsins, the establishment of functional synaptic connections, the cycling of synaptic vesicles and the release of neurotransmitters (41,44,45). Upon stimulation, phosphorylated synapsins detach from synaptic vesicles and diffuse in the axonal compartments, while ERK inhibition induces synapsin accumulation in the peri-nuclear area (45,46,47). Such effects were observed in our experiments on cells cultivated in methyl deficient medium. In these cells, synapsins were exclusively concentrated in the peri-nuclear area, while they were detected in the neurite processes of cells cultivated in standard conditions. Moreover, this restricted location correlated with the release of synapsins from the synaptic vesicles, as illustrated by the absence of co-localization with a vesicular marker (Vglut), as previously observed in models of ERK inactivation (45,48).

The deficiency in folate and vitamin in B12 produced disorders of motor coordination (linear walking) not only in pups but also in adult animals. We therefore investigated whether disorders of linear walking could be influenced by homocysteine, vitamin B12 and folate, through a mechanism that involves synapsins, in a cohort of elderly subjects. Vitamin B12 and to a lesser extent, homocysteine and folate were significantly associated with declared postural and locomotion disorders. Higher sway path in posturographic evaluation on seesaw, with eyes closed, may indicate a central impairment of linear walking due to cerebellum dysfunction, vestibular dysfunction or both (49). Presently, the deleterious effect of a polymorphism of syn2, rs795009 on linear walking in closed eyes condition was observed only in the volunteers who displayed an increased level of homocysteine. The rs795009 polymorphism is located in an intron, near a splicing site, and could influence the gene transcription and splicing (49). Therefore, both homocysteine and rs795009 had cumulative

negative effects on the expression of synapsin II, in agreement with the mechanisms evidenced in the deficient animals.

In conclusion, our study provides the first evidence that methyl donor deficiency produces disorders of motor coordination related to altered cerebellum plasticity through deregulation of genomic and epigenomic pathways of ERα and down-stream impaired expression and phosphorylation of synapsins. It opens new insights on the relations between nutrition, cerebellum disorders and falls, which is a major public health problem, in the elderly.

METHODS

Animal Treatments. Animal experiments were performed on Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) and were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, in an accredited establishment (Inserm U 954), according to governmental guidelines N86/609/CEE. Adult female rats were maintained under standard laboratory conditions, on a 12-hour light/dark cycle, with food and water available ad libitum. One month before pregnancy, they were fed with either standard food (n = 8) (Maintenance diet M20; Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or with a diet lacking methyl donors, i.e., vitamins B12, B2 and folate (MDD, n = 8) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France), described previously (13). The assigned diet was constantly maintained until weaning of the offspring (i.e., postnatal day 21). Pups and mothers were scarificed at day 21 and day 150, respectively.

Culture of neuronal progenitors. The protocoles are given in supplementary methods

Neurobehavioral development. The tests were performed between post-natal days 3 and 21, in rat pups, as described (13). The procedure used for adult rats is given in supplementary methods

Proteomic analysis of the cerebellum. Proteomic analysis was essentially carried out as described (51), with some modifications. Briefly, this analysis was based on a two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis followed by a quantification of protein changes. Protein change according to the two diet conditions was captured via image alignment, and integrated analysis of expression profiles was performed using the Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne UK). Protein spots showing a significant change in abundance between the two conditions were subsequently analyzed by MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager DE-Pro, Perseptive BioSystems, Farming-ham

MA) in positive-ion reflector mode for peptide mass fingerprinting (PMF) (see supplementary online methods for details).

Tissue immunohistochemistry. Immunohistochemical analyses were performed on cryostat-generated 20-µm sagittal brain sections mounted onto glass slides. Tissue sections were incubated in 0.1% triton X100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 minutes at room temperature. Slides were dipped in PBS for 10 minutes, then in PBS containing 10% bovine serum for 1 hour, and were incubated two days at 4°C with primary antibodies (**see supplementary table 4**) followed by the second-step antibodies adapted to the host of the first antibodies, for 1 hour at room temperature (IgG conjugated to Alexa Fluor, 1/1000; Molecular Probes). Details are given in supplementary methods.

Real-time quantitative RT-PCR of synapsin expression. Total RNA was purified from nitrogen frozen cerebellar tissue from control and MDD (n=5 for each group) pups with the RNeasy Lipid Tissue kit following the manufacturer's recommendations (Qiagen, Courtaboeuf, France), which included treatment with DNase. To check for possible DNA contamination of the RNA samples, reactions were also performed in control condition without Omniscript RT enzyme (Qiagen, Courtaboeuf, France). For primer details see supplemental methods.

Western blot analysis. Nitrogen frozen cerebellum of control (n=4) and MDD (n=4) 21-day-old pups were solubilized in Ripa lysis buffer containing 140 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) SDS, and protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science, Meylan, France). After homogenization, samples were lysed by three cycles of freezing/thawing and finally centrifuged at 4 °C for 30 min at 15,000 x g. The protein concentration in the supernatant was determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Interchim, Monluçon, France). Twenty µg of protein samples were mixed with an

equal volume of 2x Laemmli buffer, denatured by heating the mixture for 5 min at 100 °C, and then resolved by 12% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred using a Mini Trans-Blot cell onto polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P, Millipore Corp., Guyancourt, France), and the membranes were blocked for 1 h with Tris-buffered saline (pH 7.4) and 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST buffer) containing 5% (w/v) bovine serum albumin. For information on antibodies, see supplementary Table 4 and for protein revelation, see supplementary methods.

The OASI cohort. The population study was part of a larger project, the “Oasi cohort”, aiming to determine parameters involved in brain and vascular aging, in elderly people from two mountainous villages, San Teodoro and Cesarò, in the territory of Mounts Nebrodi, Sicily, Italy. The study was approved by the ethical committee of the IRCCS institute for Brain aging of Troina (Sicily) (52,53). All the 667 participants of the “Oasi cohort” gave informed consent. These elderly subjects, aged between 60 and 85, were subjected to a personal interview by a physician on postural control, clinical examination and biological analysis, as reported elsewhere. Among these participants, a sample of 153 elderly people who declared to underwent disorders of postural control (related to static and/or locomotion) was further investigated for posturography (see supplemental methods for details).

Genotyping of syn2 variants. The genotypes of rs795009, rs 2307981, rs2308169, rs308963 and rs2307973 were determined by real time PCR (LightCycler 480, Roche Molecular Biochemicals, Lyon, France). For details on primers, see supplementary methods.

ACKNOWLEDGEMENTS: Institutional grants were received from the French national agency for research (ANR Nutrivigene project) and the Regions of Lorraine (France) and Sicily (Italy).

FIGURES

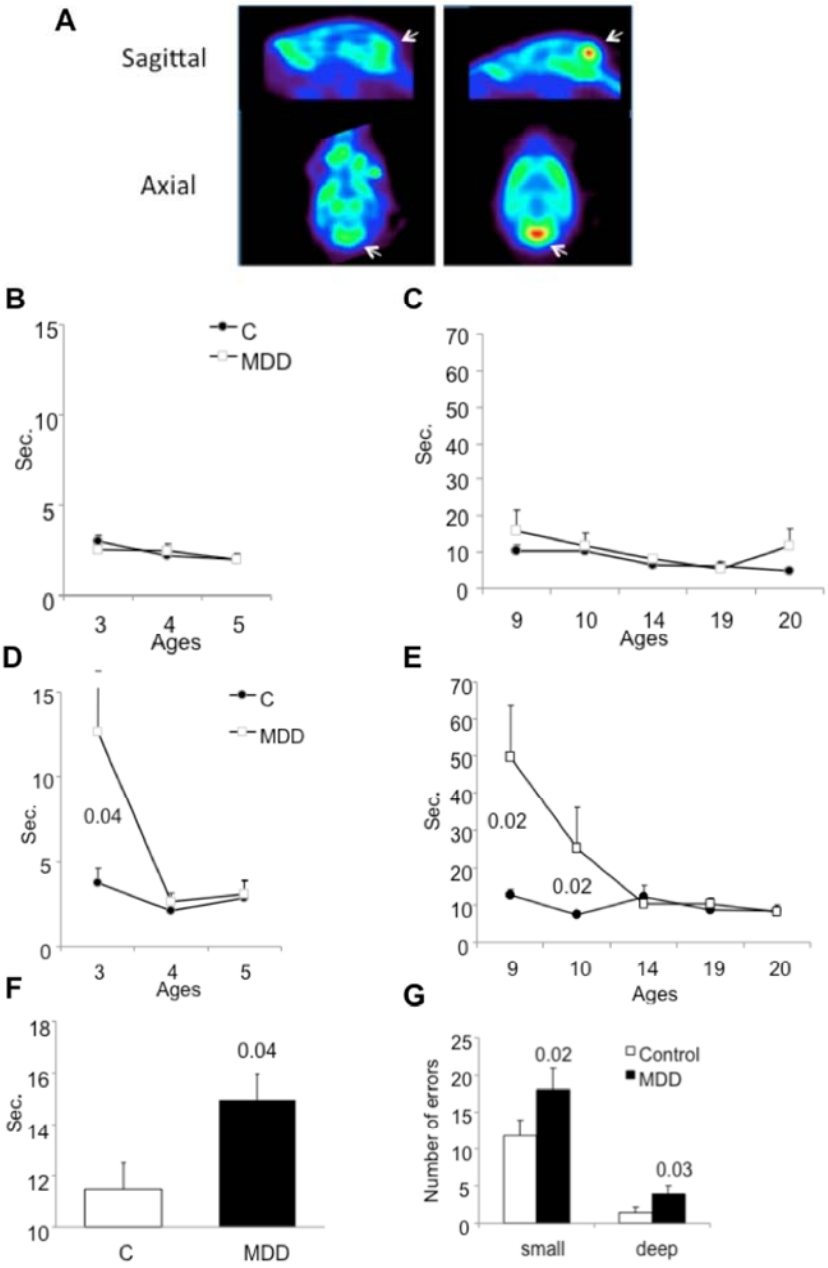


Figure 1: Effects of methyl donor deficiency on metabolic brain imaging and locomotor coordination in rat pups and adult female rats. (**A**) Representative FDG Positron emission tomography (PET) brain images (6 rats per group) from a rat pup fed a deficient diet (left panel) and a rat pup fed a standard diet (right panel). (**B,C**) Effects of methyl donor deficiency on Righting Reflex (N=12 per group) and (**D,E**) on Negative Geotaxis (N=12 per group) of rat pups. (**F,G**) Evaluation of locomotor coordination of adult females in the linear walking test. Total time (sec) to perform the test (panel f) and total number of small or deep errors committed in paws placement between the rungs (panel g). C=controls, MDD=methyl donor deficiency. Score values represent mean times (±SD) to perform each test. **P*=0.04 , ***P*=0.02 (Mann-Whitney *U*-test). *P*-values were obtained from one way ANOVA.

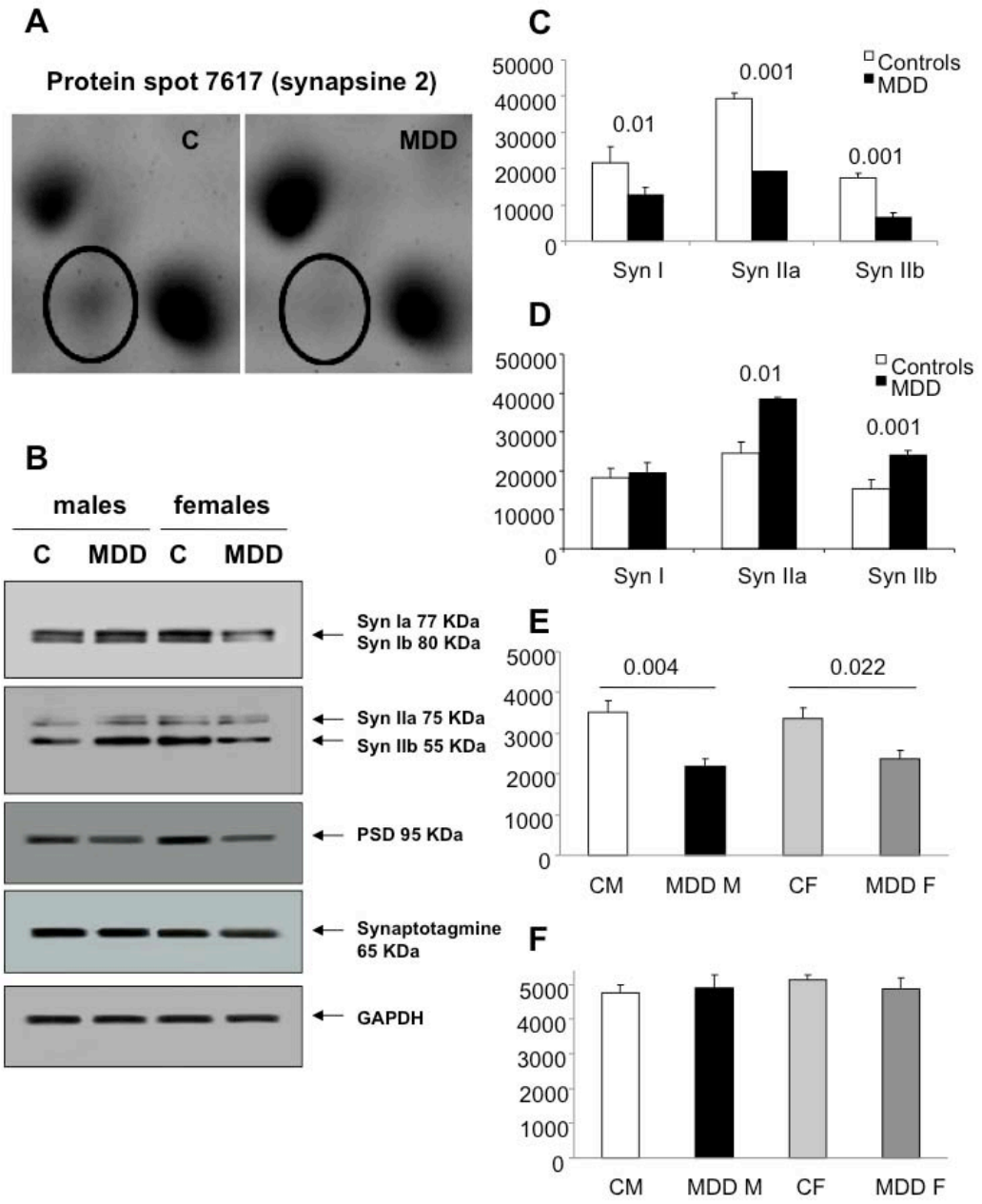


Figure 2: Analysis of synaptic proteins in the cerebellum of rat pups at 21 days of age. (**A**) Proteomic analysis. (**B**) Western blot of synaptic proteins. (**C-F**) Densitometric quantifications of western blots for synapsins in females and males, PSD-95 and synaptotagmin respectively; results are means (arbitrary units) ± standard errors (N= 4 / group, runs in duplicate).

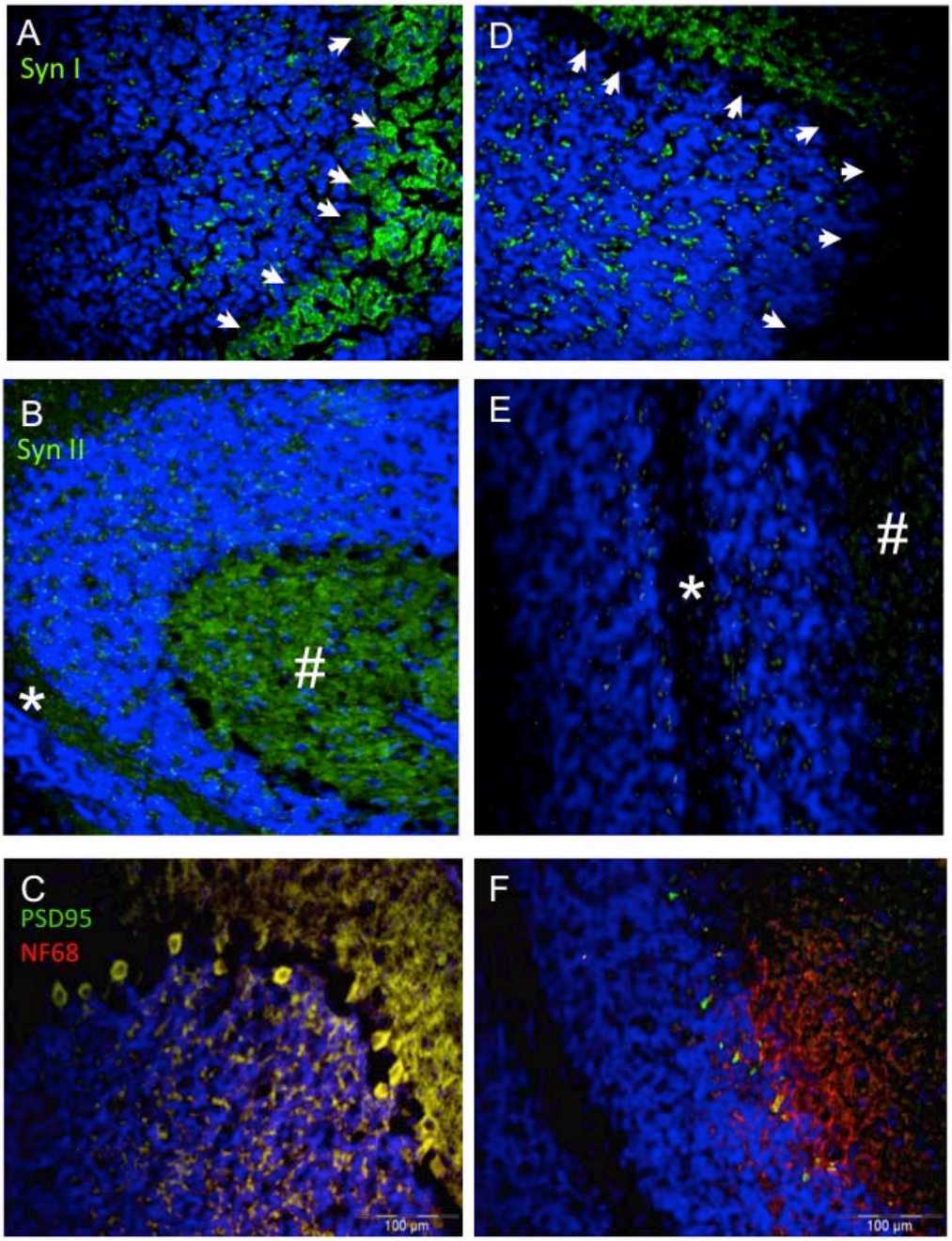


Figure 3: Immunohistochemical localization of synaptic proteins in the cerebellum. (**A,B,C**) control and (**D,E,F**) deficient female pups of 21 days of age. Different zones of interest are shown: * cerebellar white mater (axons of Purkinje cells), # molecular layer (dendrites of Purkinje cells), arrow-heads (cell bodies of the Purkinje cells, immunopositive in controls and immunonegative in deficient rats).

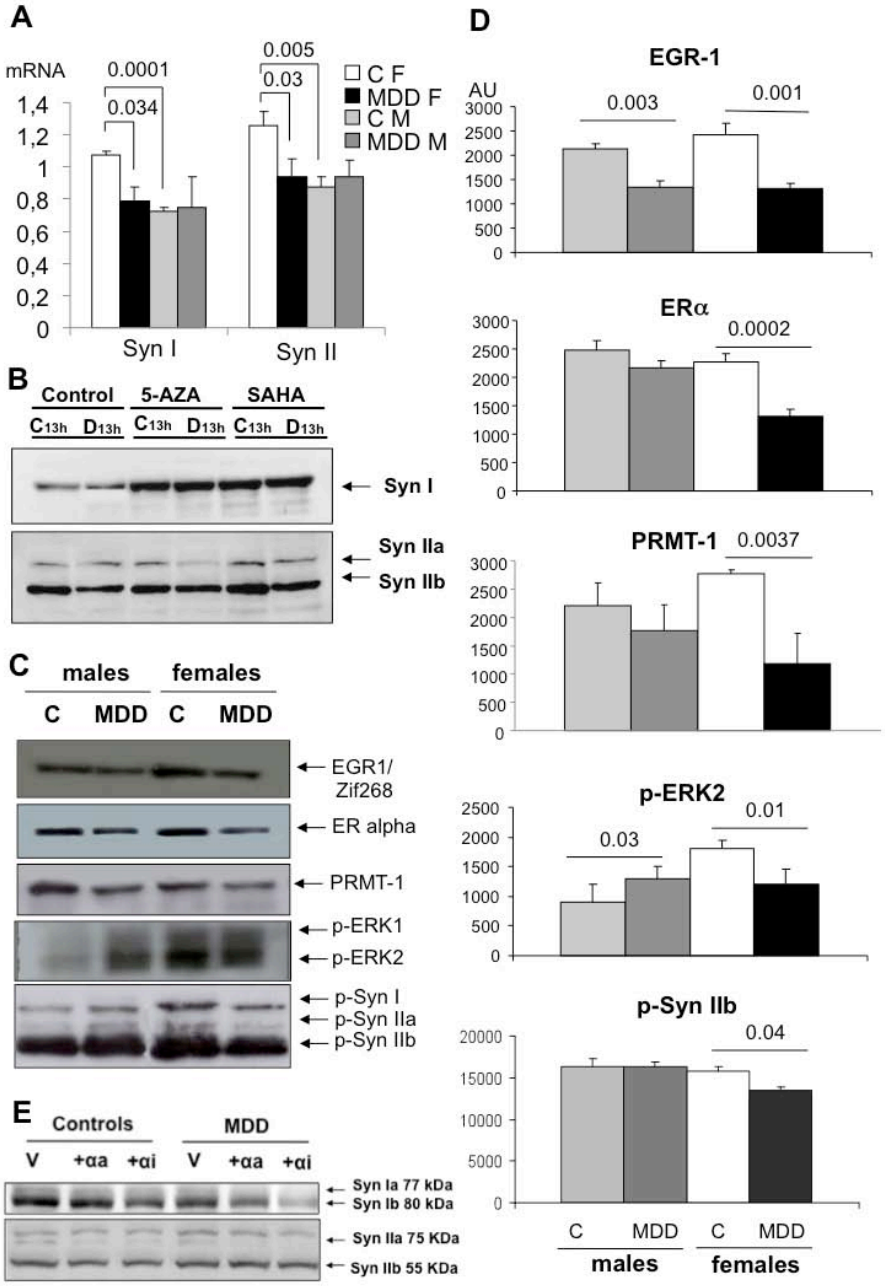


Figure 4: Genomic and non-genomic mechanisms of the expression of synapsins. (**A**) Quantification of synapsin mRNAs (results are expressed as means ± standard errors (arbitrary unit referred to an internal standard), N=5/group, run in duplicate). (**B**) Synapsin expression in H19-7 cells under treatment with 5-azacytidine (5-AZA) or histone deacetylase inhibitor (SAHA) and cultivated for 13h in B9-deficient (D) or control medium (C). (**C**) Western blot analysis of the expression of EGR-1/Zif 268, ERα, PRMT-1, phospho-ERK, phospho-synapsins and GAPDH. (**D**) densitometric quantifications of western blots of EGR-1/Zif 268, ERα, PRMT-1, phospho-ERK2 and phospho-synapsin IIb (top to bottom, respectively). (arbitrary units ± standard errors, N=5/group, run in duplicate). (**E**): Western blot of synapsins in H19-7 cells cultivated in normal (control) versus methyl donor deficient (MDD) medium, with either100nM of ERα agonist (+αa, PPT), 100nM of ERα antagonist ((+αi, MPP) or (V) vehicle only (DMSO was used as solvent for agonist and antagonists).

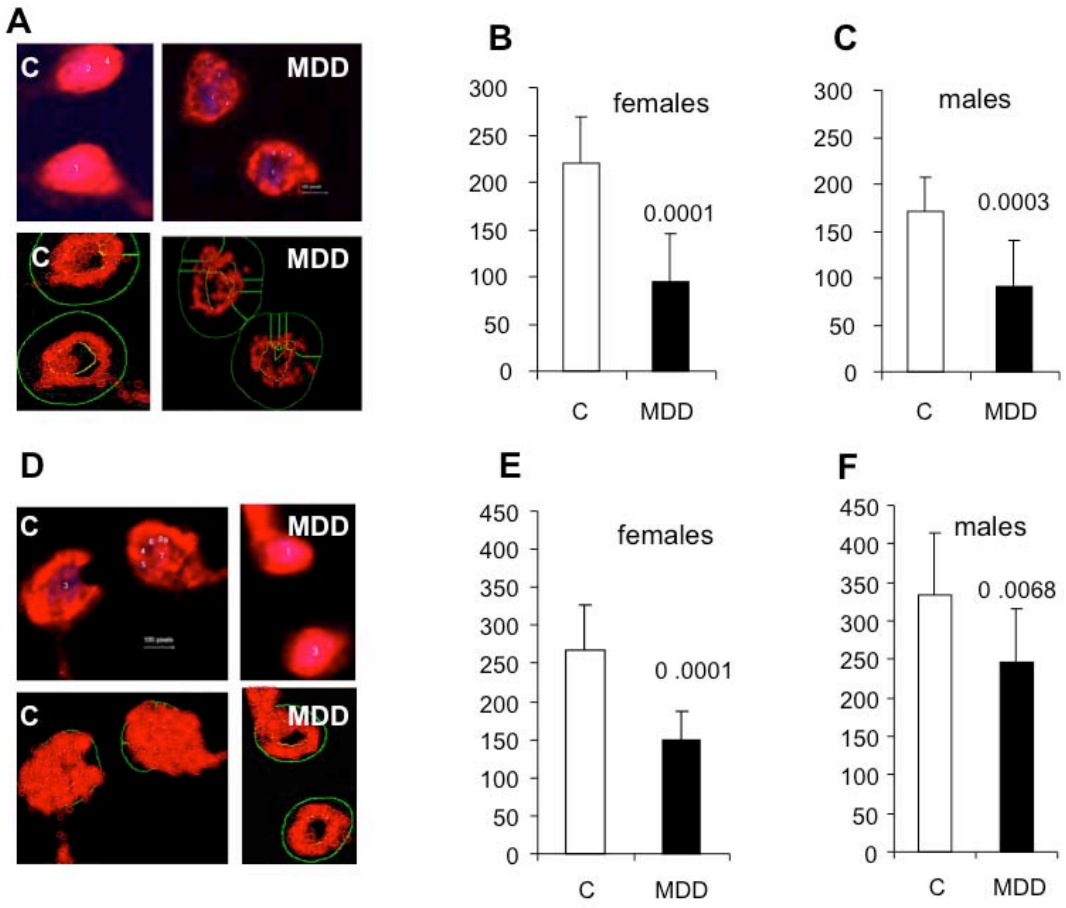


Figure 5: Evaluation of the methylation of ERα protein and of the interaction between ERα and PGC-1α in Purkinje cells of the 21-day-old rats, by the Duo-Link method. (A) example of labeling and Matlab cell design (green line) for methylation in control (C) and methyl donor deficient (MDD) females. Each red dot reveals a methylation of one ERα protein and dimerization between ERα and PGC-1α in the histological views. (**B,C**) Quantification of methylation (in dots per cell) in females and males, respectively. (**D**) example of labeling and Matlab cell design (green line) for dimerization level between ERα and PGC-1α in control (C) and methyl donor deficient (MDD) females. (**E,F**) Evaluation of dimerization levels between ERα and PGC-1α by the Duo-Link method, in the Purkinje cells of the 21-day-old females and males, respectively. Values represent means±SD and compared by ANOVA.

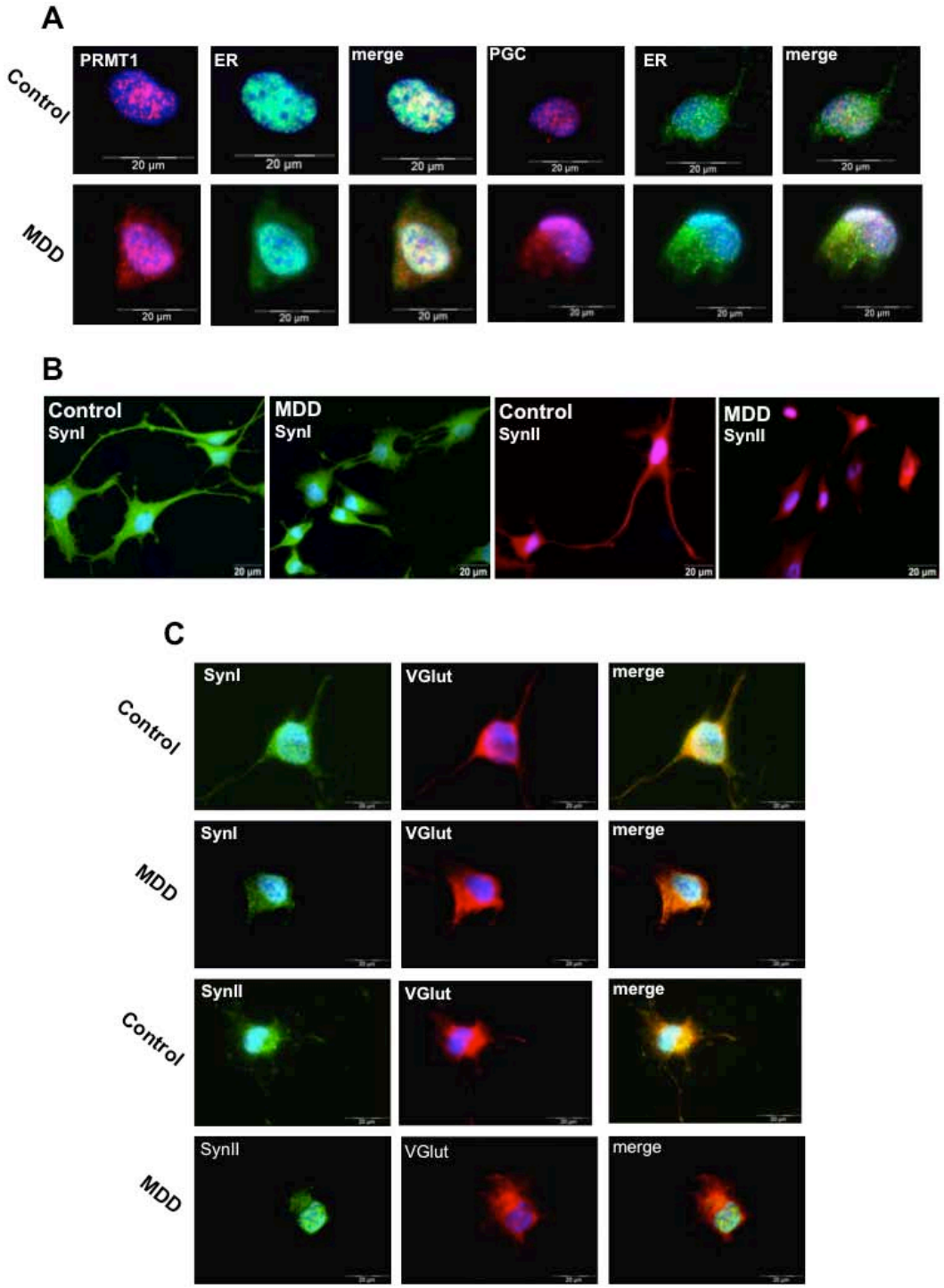


Figure 6: Immunostainings of synapsins and various related markers in H19-7 cells cultured under control or methyl donor deficient (MDD) conditions. (**A**) Co-immunostaining of PRMT1 or PGC-1α with ERα; note the delocalization of these co-effectors and estrogen receptor from nucleus to cytoplasm in B9 deficient cells compared to controls. (**B**) Immunohistological cellular localization of synapsins I and II; note the restricted peri-nuclear localization in B9 deficient cells compared to controls. (**C**) Immunohistological of cellular co-localization of synapsins and a vesicular marker (VGlut); note the restricted peri-nuclear co-localization in B9 deficient cells compared to controls.

REFERENCES

1. Clarke R. Vitamin B12, folic acid, and the prevention of dementia. *N Engl J Med.* 2006;2006;354::2817-2819.

2. Miller JW. Assessing the association between vitamin B-12 status and cognitive function in older adults. *Am J Clin Nutr*. 2006;2006;84::1259-1260.

3. Scalabrino G. The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. *Prog Neurobiol.* 2009;2009;88::203-220.

4. Seshadri S, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med.2002;* 2002;346::476-483.

5. Burdge GC, ,Lillycrop KA. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. *Annu Rev Nutr*. 2010;2010;30::315-3339..

6. Battaglia-Hsu SF, ,et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;2009;106::21930-21935.

7. Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2007;2007;13::225-238.

8. Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 2006;2006;5::949-960.

9. Daval JL, Blaise S, Guéant JL. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;2009;6::106.

10. Troen AM, Shea-Budgell M, Shukitt-Hale B, Smith DE, Selhub J, Rosenberg IH. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;2008;105::12474–12479.

11. Durga J,, et al. Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *Lancet.*2007;2007;369::208-216.

12. Stanger O,, et al. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother*. 2009;2009;9::1393-1412.

13. Blaise SA, Alberto JM, Audonnet-Blaise S, Guéant JL, Daval JL. Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats. *Am J Pathol*. 2007;2007;170::667–679.

14. Black MM. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull.* 2008;2008;29::S126-S131.

15. Karaçay B, Li S, Bonthius DJ. Maturation-dependent alcohol resistance in the developing mouse: cerebellar neuronal loss and gene expression during alcohol-vulnerable and -resistant periods. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;2008;32:1439-1450.

16. Noguchi KK, Walls KC, Wozniak DF, Olney JW, Roth KA, Farber NB. Acute neonatal glucocorticoid exposure produces selective and rapid cerebellar neural progenitor cell apoptotic death. *Cell Death Differ*.2008; 2008;15::1582-1592.

17. Suárez I, Bodega G, Rubio M, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fernández B. Prenatal cannabinoid exposure down- regulates glutamate transporter expressions (GLAST and EAAC1) in the rat cerebellum. *Dev Neurosci* 2004;2004;26::45-53.

18. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, McGinnis W, Koibuchi N. Brain Region-Specific Changes in Oxidative Stress and Neurotrophin Levels in Autism Spectrum Disorders (ASD). *Cerebellum*.. IIn press..

19. Tiemeier H, Lenroot RK, Greenstein DK, Tran L, Pierson R, Giedd JN. Cerebellum development during childhood and adolescence: A longitudinal morphometric MRI study. *Neuroimage* 2010;2010;49::63-670.

20. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol*. 2010;2010;91::313-348.

21. Teyssier C, Le Romancer M, Sentis S, Jalaguier S, Corbo L, Cavaillès V. Protein arginine methylation in estrogen signaling and estrogen-related cancers. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;2010;21::181-189.

22. Tallent MK, *et al*. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2009;284:174-181.

23. Velho TA, Mello CV. Synapsins are late activity-induced genes regulated by birdsong. *J. Neurosci.* 2008;28:11871-11882.

24. Yoshida J, Kubo T, Yamashita T. Inhibition of branching and spine maturation by repulsive guidance molecule in cultured cortical neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;372:725-729.

25. Murphy BC, O'Reilly RL, Singh SM. DNA methylation and mRNA expression of SYN III, a candidate gene for schizophrenia. *BMC Med. Genet.* 2008;9:115.

26. Ekici M, Hohl M, Schuit F, Martínez-Serrano A, Thiel G. Transcription of genes encoding synaptic vesicle proteins in human neural stem cells: chromatin accessibility, histone methylation pattern, and the essential role of rest. *J. Biol. Chem.* 2008;283:9257-9268.

27. Petersohn D, Schoch S, Brinkmann DR, Thiel G. The Human synapsin II gene promoter. *J. Biological. Chem.* 1995;270:24361-24369.

28. Puri V, *et al*. Effects of oestrogen on trigeminal ganglia in culture: implications for hormonal effects on migraine. *Cephalalgia* 2006;26:33-42.

29. Ohtani-Kaneko R, *et al*. Effects of estrogen on synapsin I distribution in developing hypothalamic neurons. *Neurosci. Res.* 2010;66:180-188.

30. Chintala S, *et al*. The Vps33a gene regulates behavior and cerebellar Purkinje cell number. *Brain Res.* 2009;1266:18-28.

31. Chen X, *et al.* Disruption of the olivo-cerebellar circuit by Purkinje neuron-specific ablation of BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:12323-12328.

32. Hoebeek FE, Witter L, Ruigrok TJ, De Zeeuw CI. Differential olivo-cerebellar cortical control of rebound activity in the cerebellar nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:8410-8415.

33. Hall AC, Lucas FR, Salinas PC. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 2000;100:525-535.

34. Benfenati F, Valtorta F, Chieregatti E, Greengard P. Interaction of free and synaptic vesicle-bound synapsin I with F-actin. *Neuron*. 1992;8:377-386.

35. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* 2008;60:961-974.

36. Thiel G, Schoch S, Petersohn D. Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/egr-1. *J. Biol. Chem*. 1994;269:15294-15301.

37. Al-Sarraj A, Day RM, Thiel G. Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J. Cell. Biochem*. 2005;94:153-167.

38. Le Romancer M, *et al*. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol. Cell*. 2008;31:212-221.

39. Teyssier C, Ma H, Emter R, Kralli A, Stallcup MR. Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev.* 2005;19:1466-1473.

40. Wessler S, Otto C, Wilck N, Stangl V, Fritzemeier KH. Identification of estrogen receptor ligands leading to activation of non-genomic signaling pathways while exhibiting only weak transcriptional activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2006;98:25-35.

41. Kushner SA, *et al*. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J. Neurosci*. 2005;25:9721-9734.

42. Hatanaka Y, *et al*. Androgen rapidly increases dendritic thorns of CA3 neurons in male rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;381:728-732.

43. Revest, J.M. *et al*. The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-Ia/Ib. *Mol. Psychiarty*. 2010;15:1140-1151.

44. Vara H, Onofri F, Benfenati F, Sassoè-Pognetto M, Giustetto M. ERK activation in axonal varicosities modulates presynaptic plasticity in the CA3 region of the hippocampus through synapsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009;106:9872-9877.

45. Giachello CN, *et al*. MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. *J. Cell. Sci.*2010;123:881-893.

46. Chi P, Greengard P, Ryan TA. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. *Neuron* 2003;38:69-78.

47. Schenk U, *et al*. A novel pathway for presynaptic mitogen-activated kinase activation via AMPA receptors. *J. Neurosci.* 2005;25:1654-1663.

48. Dominguez R, Jalali C, de Lacalle S. Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci*. 2004;24:982-990.

49. Mbongo F, Patko T, Vidal PP, Vibert N, Tran Ba Huy P, de Waele C. Postural control in patients with unilateral vestibular lesions is more impaired in the roll than in the pitch plane: a static and dynamic posturography study. *Audiol. Neurootol*. 2005;10:291-302.

50. Chen Q, *et al.* Positive association between synapsin II and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2004;56:177-181.

51. Chanson A, *et al*. Proteomic analysis reveals changes in the liver protein pattern of rats exposed to dietary folate deficiency. *J. Nutr.* 2005;135:2524-2529.

52. Guéant-Rodriguez RM, *et al*. Homocysteine is a determinant of ApoA-I and both are associated with ankle brachial index, in an Ambulatory Elderly Population. *Atherosclerosis.* 2011;214:480-485.

53. Spada RS, *et al*. Prevalence of dementia in mountainous village of Sicily. *J. Neurol. Sci*. 2009;283:62-65.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Methyl donor deficiency alters synapsin-dependent cerebellum plasticity through impaired pathways of estrogen nuclear receptor alpha

Grégory Pourié,[1] Nicolas Martin,[1,*] Carine Bossenmeyer-Pourié,[1,*] Rosario Spada,[2,*] Nassila Akchiche,[1,] Alexis Lion,[1] Rosa Maria Guéant-Rodriguez,[1] Philippe Perrin,[1] Elise Jeannesson,[1] Lydie Levavasseur,[1] Sarah El Chakour, [1] Stéphanie Dovi Acouetey,[1] Patrick Brachet,[3] Paolo Bosco,[2] Guido Anello,[2] Giuseppe Stella,[2] Violette Koziel,[1] Jean-Marc Alberto,[1] Deborah Helle,[1] Renée Debard,[1] Florence Coste,[1] Brigitte Lehninger,[1] Sylvain Poussier,[4] Pierre-Yves Marie,[5] Maurizio Elia,[5] Antonino Romano,[2] Jean-Luc Daval,[1] Jean-Louis Guéant.[1,2]

[1]Inserm U-954, Nutrition-Genetics and Environmental Exposure, University Hospital Center and Nancy-Université, 54500, Vandoeuvre lès Nancy, France.

[2]IRCCS, Oasi Maria S.S. – Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina (EN), Italy

[3]Human Nutrition Unit, UMR 1019 INRA/University of Auvergne, INRA Centre of Theix, Saint-Genès Champanelle, France

[4]NancycloTEP, Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Nancy, Nancy, France

[5]Inserm U-961, Medical faculty and CHU of Nancy, Nancy University, Nancy, France

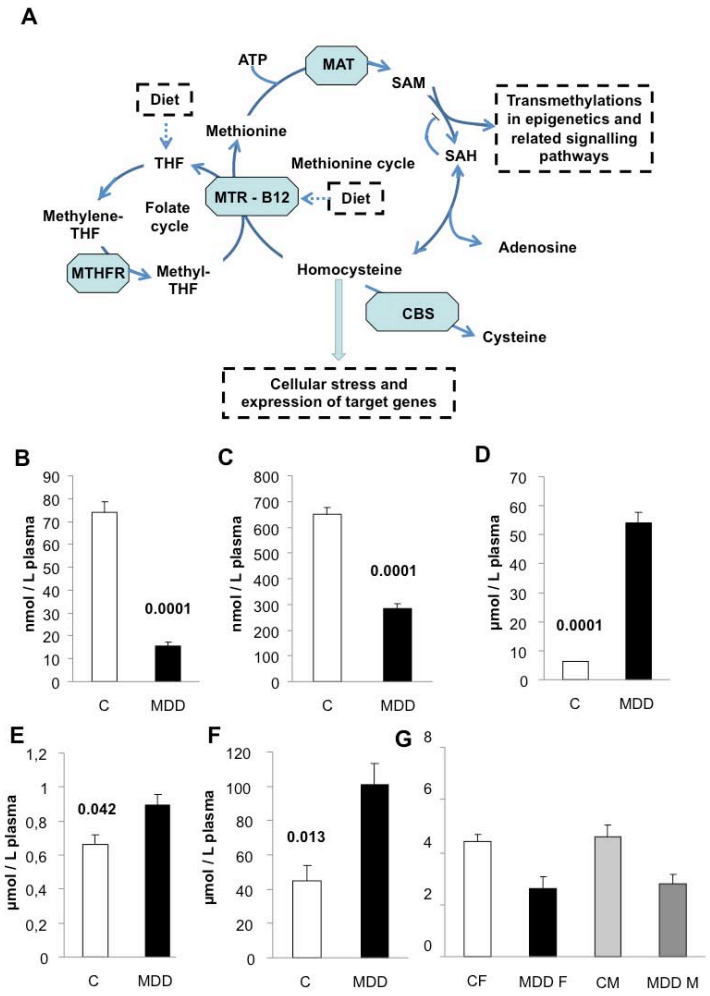


Figure S1: (**A**) The one-carbon metabolism. Homocysteine (Hcy) originates from the hydrolysis of S-adenosyl-homocysteine (SAH), a product of transmethylation reactions through S-adenosyl-methionine (SAM). It is the substrate of a re-methylation pathway catalyzed by methionine synthase (MTR). The co-substrate, methyltetrahydrofolate (methyl-THF) is synthesized by methyl-tetrahydrofolate-reductase (MTHFR). Consequently, the deficiency in folate and/or vitamin B12 increases the SAH and Hcy levels and decreases SAM level in tissues. SAM is synthesized by the methionine S-adenosyl transferase (MAT). The main cellular consequences of the methyl deficient diet on the one-carbon metabolism are boxed. (**B-G**) Concentrations of folate (panel B, with N_C=35, N_{MDD}=18), vitamin B12 (panel C, with N_C=38, N_{MDD}=18), homocysteine (panel D, with N_C=35, N_{MDD}=17), methylmalonic acid (panel E, with N_C=7, N_{MDD}=17) and succinic acid (panel F, with N_C=7, N_{MDD}=17) in the plasma of 21-day-old rats. The results from males and females were pooled because no significant differences emerged. C=controls, MDD=methyl donor deficiency. *P*-values were obtained from one-way ANOVA. (**G**), S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine (SAM/SAH) ratio in the cerebellum (N=10/group). Abbreviations, CF: control females, MDD F: methyl donor deficient females, CM: control males, MDD M: methyl donor deficient males. *P*-values were obtained from one-way ANOVA.

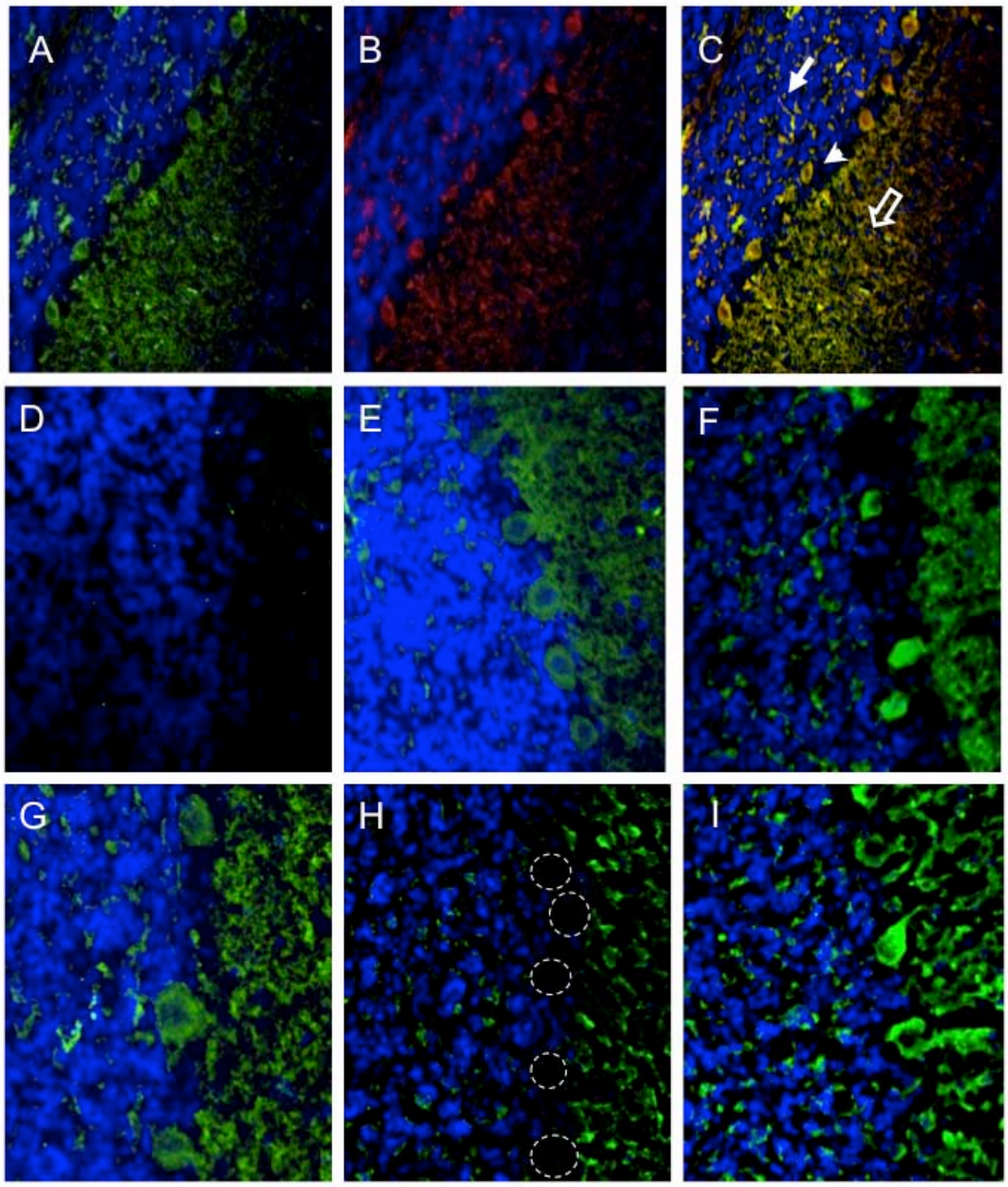


Figure S2: Immunohistochemistry of metabolic markers of the one-carbon metabolism in cerebellum. (**A-C**) Localization of homocysteine accumulation in MDD pups (a: homocysteine in green; b: calbindin-D28, a marker for Purkinje cells; c: merge); the Purkinje cell were revealed by their soma (arrow head), dendrites (empty arrow) and axons (white arrow). (**D-I**) Expression of homocysteine, cystathionine beta-synthase and methionine synthase in controls (D, E and F, respectively) and MDD (G, H and I, respectively).

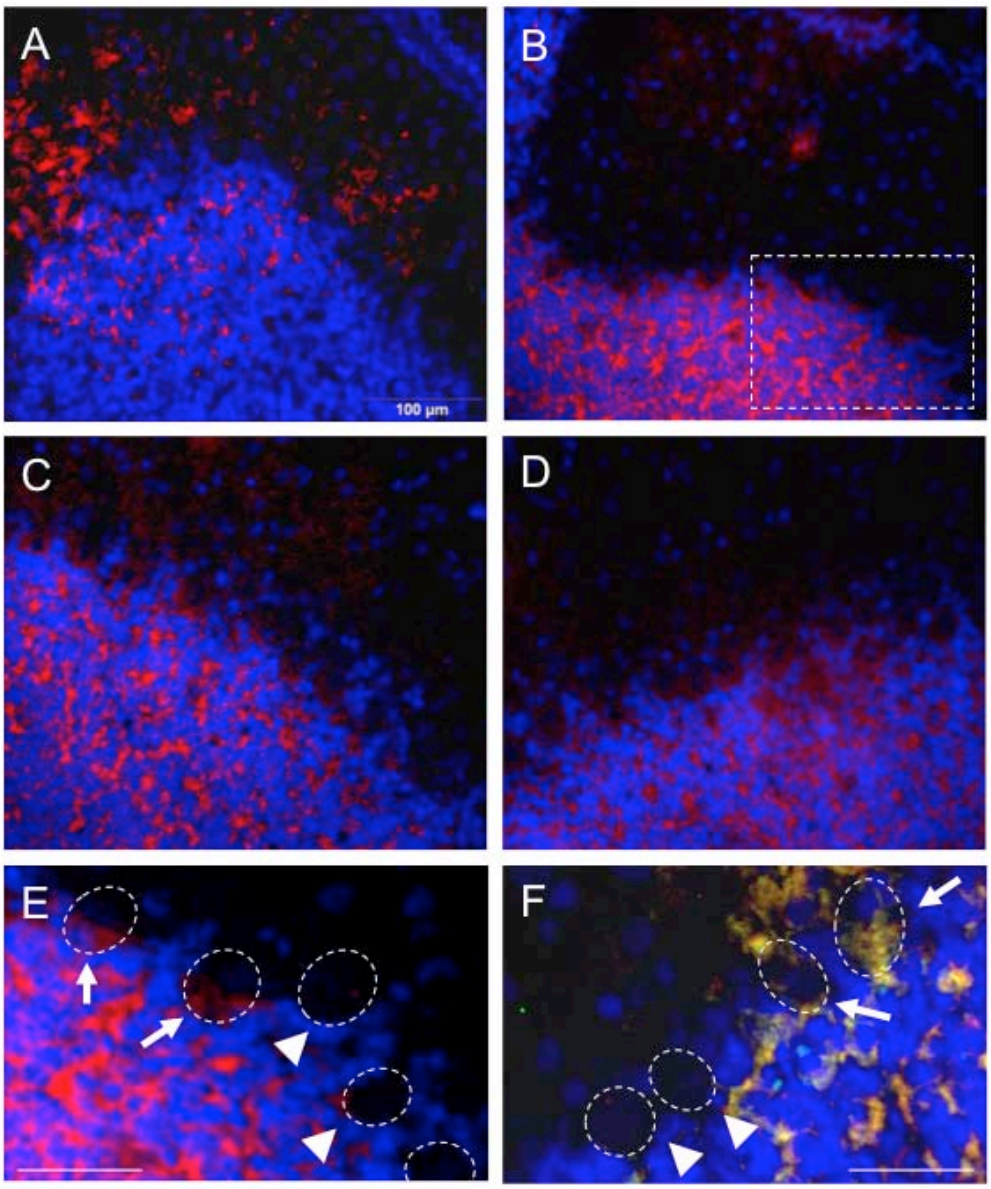


Figure S3: Evaluation of apoptosis in the cerebellum of 21-day-old pups submitted to either a control or a deficient diet. (**A, B**) Assessment of apoptosis (apostain, in red) in control and deficient females respectively; (**C, D**) Assessment of apoptosis (apostain, in red) in control and deficient males respectively. (**E**) Enlargement of the surface underlined on panel **a** showing the Purkinje cell layer; note that the body of some Purkinje cells are slightly labeled for apoptotic death (red, arrows), and others not (arrow-heads)(bar=20µm). (**F**) Representation of merge (yellow) labeling between cleaved caspase-3 (green) and calbindin-D28 (red). Caspase labeling was found in all pups whatever the diet and gender with some cells slightly labeled (arrows) and others not (arrow-heads) (bar=20µm).

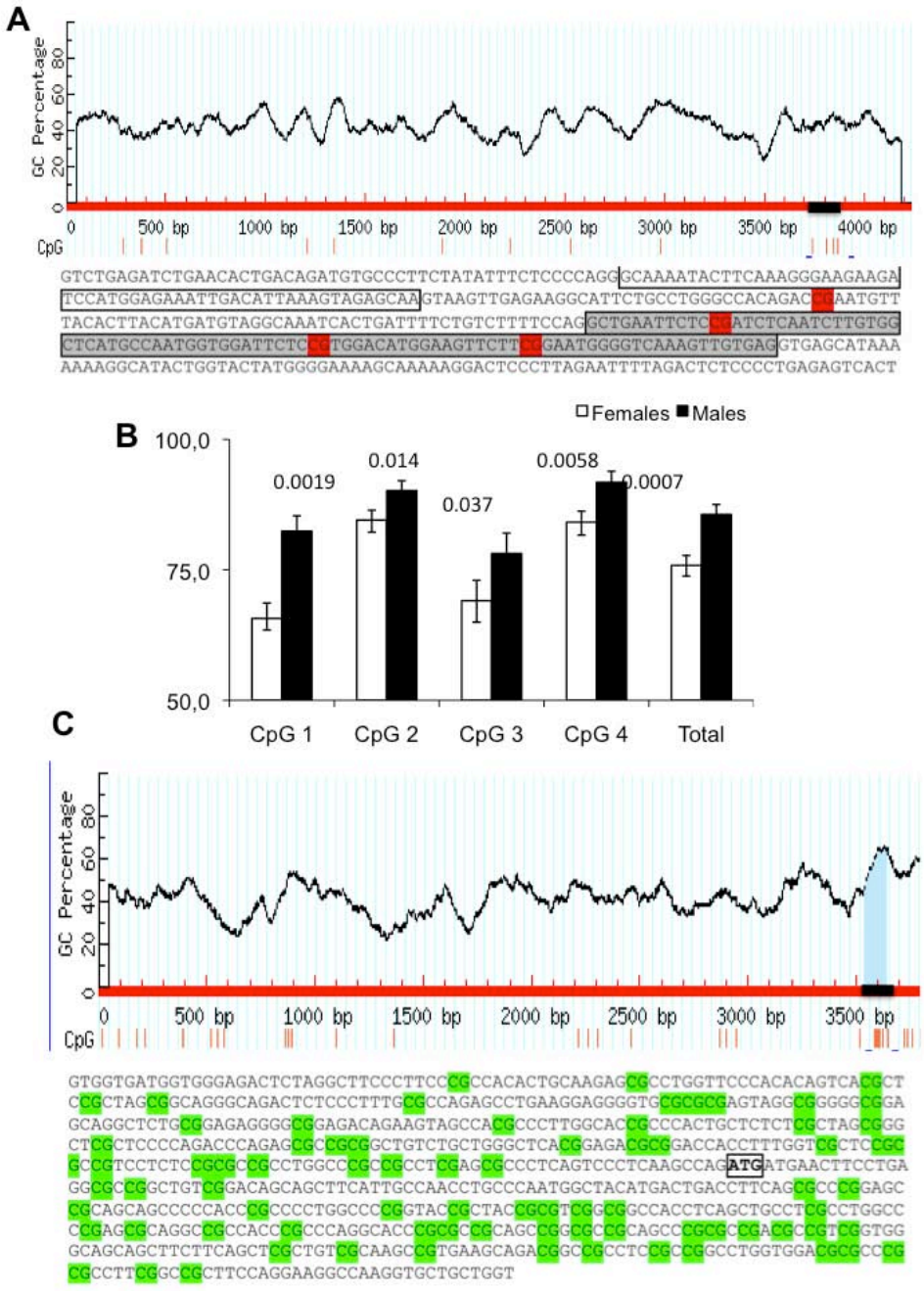


Figure S4: Methylation of the promotor regions of syn1 and syn2 according to methyl donor deficiency in H19-7 progenitors. (a,b) ***syn II*** **and (c)** ***syn I*****.** The CpG in promotor regions are indicated by vertical bars (**A, C**). Methylation of the promotors of *syn II* (**A**) and *syn I* (**C**) was studied by bisulfitation and sequencing of amplicons. The analyzed sequence in each promoter is indicated in black and the hypomethylated and hypermethylated CpG are labeled in green and red, respectively. (**B**) The rate of methylation of *syn I* promoter was considered according to gender (n=6 per group)

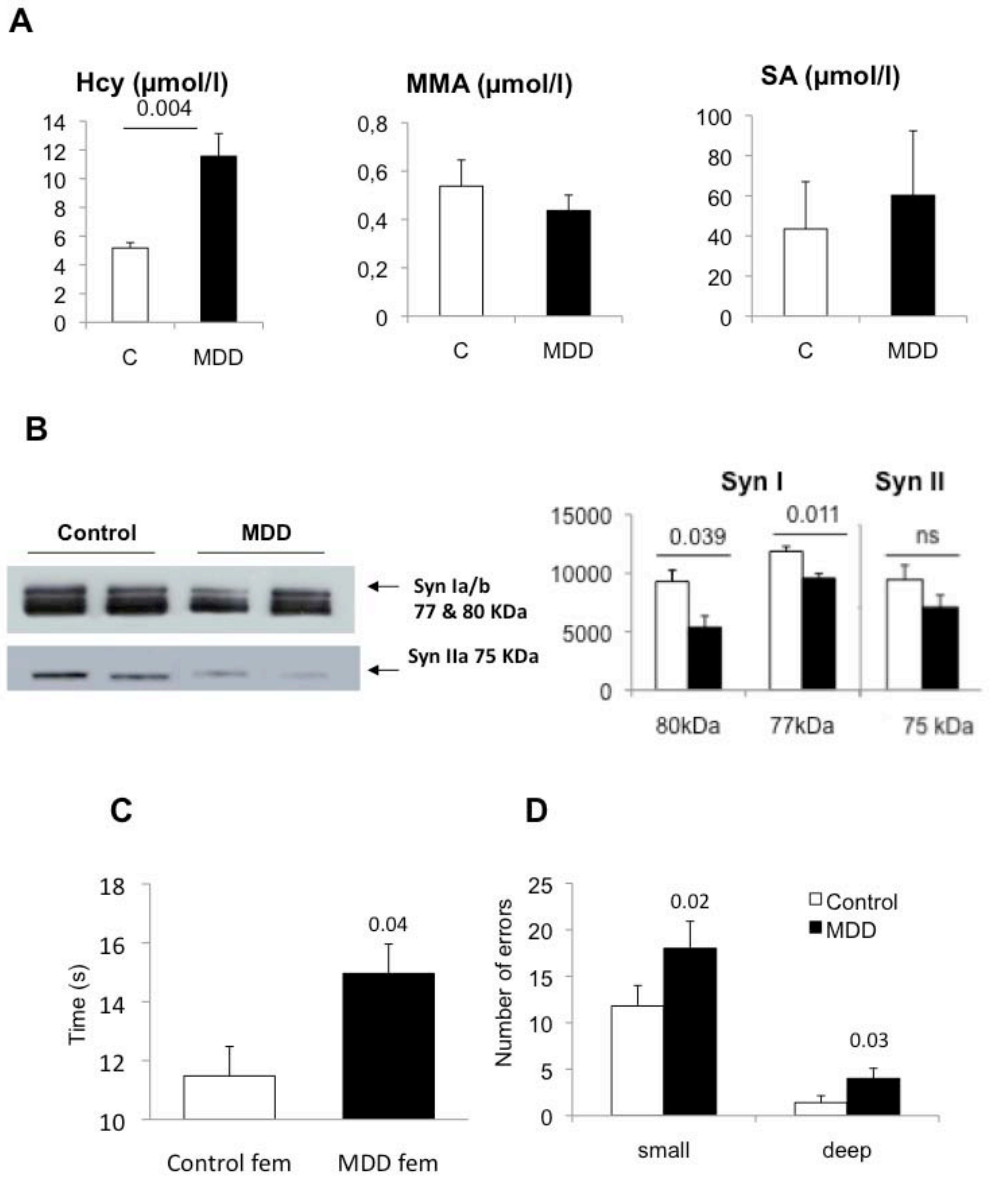


Figure S5: (A) Plasma levels of biochemical parameters (homocysteine (Hcy), methylmalonic acid (MMA) and succinic acid (SA)) in adult female rats. (**B**) Western blot of synapsins in the cerebellum of adult female rats. (**C**, **D**) Linear walking test on rungs, with time (sec) (c) and number of errors (d) in adult females.

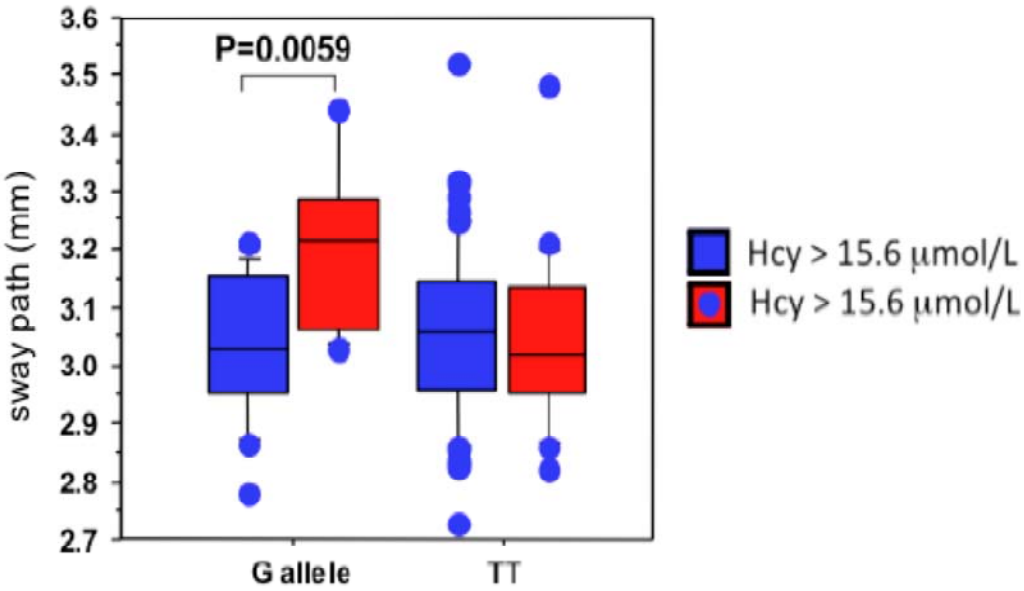


Figure S6: Posturographic evaluation of the elderly subjects. Sway path is travelled by the center of foot pressure, eyes closed and seesaw between the feet and the platform; participants with G allele (GG and GT genotypes, left side) and TT genotype (right side) alleles. Subjects without hyperhomocysteinemia (blue) and with hyperhomocysteinemia (red).

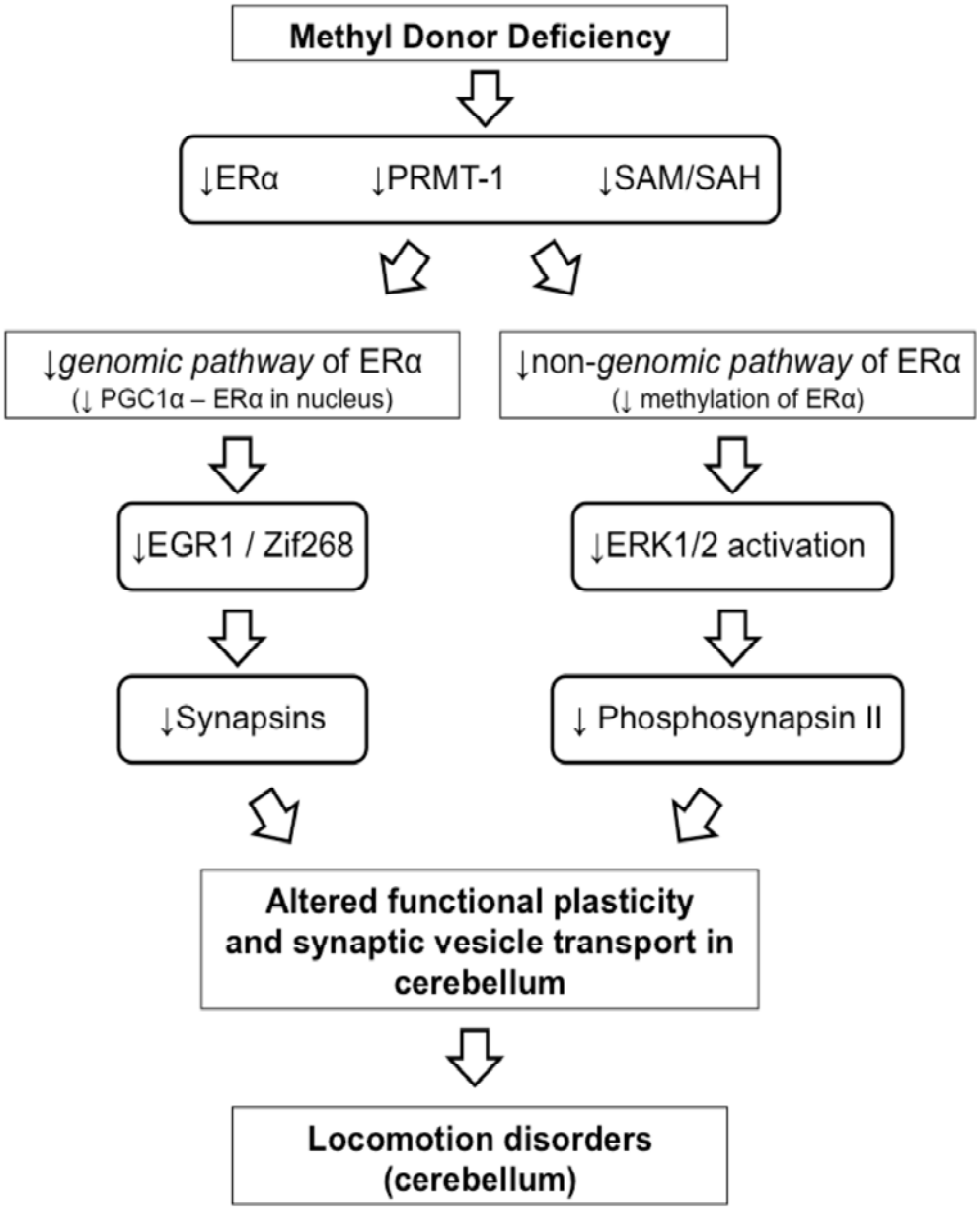


Figure S7: Effects of the methyl donor deficiency on synapsin expression through impaired pathways of ERα.

Supplementary Video 1: Motor coordination tested by linear walking of adult rat females fed a standard diet.

Supplementary Video 2: Motor coordination tested by linear walking of adult rat females fed a methyl donor deficient diet.

Table S1. Metabolic markers of the one-carbon metabolism in H19-7 progenitors according to the culture conditions of H19-7 cells (control vs methyl donor deficiency).

	control	deficient	p
B12 (pM/µg)	654 ± 70	842 ± 88	ns
B9 (mM/µg)	168 ± 11.3	31.8 ± 17.3	0.001
Hcy (µM/µg)	0.53 ± 0.07	1.31 ± 0.04	0.001
SAM (µg/mg)	1435 ± 148	492 ± 166	0.001
SAH (µg/mg)	7.72 ± 3.59	21.93 ± 10;03	0.0029
SAM/SAH	185.6 ± 41.0	22.4 ± 16.0	0.0001

Each parameter was presented as mean quantity (± sd) for an amount of extracted protein (in µg or mg) from the cultures, after 13h of differentiation. Data were obtained from three wells of two different cultures for each condition (n=6/condition, control or deficient). Statistical analysis were performed with one-way ANOVA followed by fischer's PLSD.

Table S2. Biological parameters in function of declared postural and/or locomotor disorder

Parameter	With postural disease	Without postural disease	Age adjusted *P*-value
Folates (nmol/L)	13.6 ± 8.6	13.9 ± 7.7	0.011
B12 vitamin (pmol/L)	334.9 ± 224.5	368.9 ± 250.2	0.001
Homocysteine (mmol/L)	16.1 ± 6.6	16.6 ± 14.5	0.039
Methyl malonic acid (mmol/L)	0.2 ± 0.1	1.4 ± 19.1	0.518

Table S3. Allele frequencies of *syn II* polymorphisms in subject with and without declared postural/locomotor disorders.

		Number of alleles (frequency, 95% confidence intervals)			
Reference variant	Allele	All	With declared disorder	Without declared disorder	*P*-value
rs308963	G C	563 (0.81, 0.78-0.84) 131 (0.19, 0.15-0.22)	336 (0.79, 0.75-0.82) 90 (0.21, 0.17-0.25)	227 (0.85, 0.80-0.89) 41 (0.15, 0.11-0.20)	0.056
rs795009	T G	615 (0.81, 0.78-0.84) 143 (0.19, 0.16-0.22)	362 (0.78, 0.75-0.82) 98 (0.21, 0.18-0.25)	253 (0.85, 0.81-0.89) 45 (0.15, 0.11-0.19)	0.033
rs2307973	WT deletion	231 (0.19, 0.17-0.21) 985 (0.81, 0.79-0.83)	133 (0.19, 0.16-0.22) 561 (0.81, 0.78-0.84)	98 (0.19, 0.15-0.22) 424 (0.81, 0.78-0.85)	0.864
Rs2307981	WT deletion	1067 (0.80, 0.78-0.82) 261 (0.20, 0.18-0.22)	600 (0.80, 0.77-0.82) 154 (0.20, 0.18-0.23)	467 (0.81, 0.78-0.85) 107 (0.19, 0.15-0.22)	0.418

Table S4: Informations on antibodies used in western blotting and immunohistochemistry

Antibodies	**Used for (IHC, WB)**	**Dilution**	**Host**	**Supplier**
Hcy	IHC	1/200	rabbit	Chemicon Int., Temacula, CA
Calbindin-D28	IHC	1/200	mouse	Santa-Cruz Biot., Santa-Cruz, CA
CBS	IHC	1/200	mouse	Abnova, Taiwan
MS	IHC	1/200	mouse	Abnova, Taiwan
Synapsin-I	IHC, WB	1/200 (IHC), 1/2000 (WB)	rabbit	Chemicon Int., Temacula, CA
Synapsin-II	IHC, WB	1/200 (IHC), 1/2000 (WB)	rabbit	Abcam, Cambridge, UK
ERalpha	IHC, WB	1/200 (IHC), 1/500 (WB)	mouse	Santa-Cruz Biot., Santa-Cruz, CA
PRMT-1	IHC, WB	1/200 (IHC), 1/700 (WB)	rabbit	Cell Signaling, Beverly MA, USA
PGC-1	IHC, WB	1/200 (IHC), 1/1000 (WB)	rabbit	Cell Signaling, Beverly MA, USA
EGR-1	WB	1/1000	rabbit	Cell Signaling, Beverly MA, USA
ERK 1/2	WB	1/2000	rabbit	Cell Signaling, Beverly MA, USA
Phospho-synapsin	WB	1/1000	rabbit	Cell Signaling, Beverly MA, USA
Phospho-ERK 1/2	WB	1/1000	rabbit	Cell Signaling, Beverly MA, USA
Vglut2	IHC	1/200	mouse	Abcam, Cambridge, UK

SUPPLEMENTARY METHODS

Neurobehavioral development. In the static righting reflex, the time needed by the pup to right itself in a supine position was recorded for 3 consecutive days (postnatal days 3 to 5). The negative Geotaxis was tested at postnatal days 8, 9, and 10. The rat was positioned with the head downward on an inclined plane with a 20% slope. The time needed for the pup to turn completely and reach a position with the head upward on the plane was measured. The duration of the test was limited to 120 seconds.

Biochemical analyses. Plasma concentrations of vitamin B12 and folate were determined by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB, ICN, Costa Mesa, USA). Homocysteine, Methylmalonic acid and Succinic acid concentrations were measured by High Performance Liquid Chromatography (Waters, St Quentin, France) coupled to mass spectrometry (Api 4000 Qtrap Applied Biosystems, Courtabœuf, France), as previously described (1) The measurement of SAM and SAH concentrations was performed as described (2). Proteins were precipitated with 0.2 N $HCLO_4$, centrifuged, and the supernatant was filtered through 0.45 μm before injection on the column (Lichrospher, 100 RP-C18, 5μm, 250 x 4mm I.D.).

Positron emission tomography (PET). PET scans were performed using an animal small monitoring and gating system M 1025T (Inveon Siemens Medical Inc., USA). The animals (6 per group, according to diet) were anaesthetized and injected with 74 MBq of ^{18}F-Labeled FDG (Fluorodesoxyglucose). PET scans were acquired at 30 min after injection. Rats were acclimated to the system for 7 days. The readings were averaged from single sessions of 8-10 acceptable readings.

Proteomic analysis. Frozen cerebellum was pulverized under liquid nitrogen with a mortar and pestle and the resulting powder was homogenized at 4°C in extraction buffer supplemented with 50 mM DTT instead of tributylphosphine using a 2-ml all-glass mini-

Potter homogenizer. Then, the homogenate was centrifuged at 18000 g for 15 min and the protein concentration of the supernatant was determined using the RC DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, France). Extracted proteins (500 µg/gel) were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE). The buffer used for strip rehydration before the first dimension contained 7M urea and 2M thio-urea instead of 9M urea. Following the second dimension, separate protein spots were visualised on gels by 0.02% (w/v) colloidal Coomassie Blue and images were captured on an image scanner (Amersham Image Scanner, GE Healthcare, Orsay, France). Quantification of protein changes across triplicates of the two conditions analyzed was captured via image alignement and analysis, and integrated analysis of expression profiles using the Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne UK). In addition to technical repeats, biological replicates were carried out to address individual variability using myocardium from 6 control and 6 methyl donor-deficient rat pups. Results were expressed as means ± SD. Tailored multivariate statistical analysis facilities incorporated into the Progenesis SameSpots software were used for image analysis with $P < 0.05$ considered significant. Spots showing a significant change in abundance between the two conditions were subsequently analysed by MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager DE-Pro, Perseptive BioSystems, Farming-ham MA) in positive-ion reflector mode for peptide mass fingerprinting (PMF). Monoisotopic peptide masses were assigned and used from NCBI database searches with the MASCOT (V.2.2, Matrix Science) [http://www.matrixscience.com/search_form_select.html] search engine.

Tissular immunohistochemistry. All slides were counterstained with the nuclear fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.5 µg/ml in PBS; Sigma). Slides were observed under fluorescence microscopy (BX51WI; Olympus, Japan) at a × 40 magnification and pictures were performed through a digital camera and the cell^{F} software (Soft Imaging

System, Olympus). In order to assess the methylation level of ERα protein or the level of dimerization of ERα with PGC-1, we performed "proximity ligation" assays (Duolink® *in situ* PLA^{TM} reagents, Olink Bioscience) to visualise and quantify protein interactions *in situ*. A pair of oligonucleotide labelled secondary antibodies (PLA probes) generates a signal only when the two probes have bound in close proximity. The signal from each detected pair is visualised as an individual fluorescent dot. The PLA signals can be counted and assigned to a specific subcellular location based on microscopy images (Olympus BX51WI microscope with BlobFinder freeware from the Centre for Image Analysis, Uppsala University).

Real-time quantitative RT-PCR of synapsines expression. Specific amplifications were performed using the following primers, forward: 5'-GAGGCCCTCCACAACCAG-3', and reverse: 5'-CTGCTGTGGGACTTGGTAGG-3', for synapsin I, and forward: 5'-CATGGGTGTTTGCTCAGATG-3', and reverse: 5'-TCTCTCGGTGATTGGGGTAG-3', for synapsin II. For more details see supplemental methods. Expected product size was 147 base pairs for synapsin 1, and 96 base pairs for synapsin II. Quantitation was performed using ribosomal protein S29 (RPS29) as an internal standard with the following primers: forward, 5'- ATGGGTCACCAGCAGCTCTA-3' and reverse: 5'-_CATGTTCAGCCCGTATTTGC -3'. Expected product size was 114 base pairs. Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products. Temperature cycling for both synapsine runs was: 15 min at 95 °C to activate the enzyme, followed by 50 cycles: 94°C for 10 s, 58 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. Temperature cycling for RPS29 run was: 15 min at 95 °C to activate the enzyme, followed by 50 cycles consisting of : 94°C for 10 s, 55°C for 20 s and 72°C for 15 s. Then melting curves analyses were performed by increasing temperature from 65 to 95°C, with 0.1 °C per second. Calculation of the results was done with the RelQuant software (Roche Diagnostics, Manheim, Germany). Results were expressed as

arbitrary units (AU) by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of mRNA and internal standard.

Methylation of syn1 and syn2 promoters. The bisulfitation experiment was performed as described before (Lu et al, 2007). Briefly, DNA was extract from 20 mg of cerebellum of 21-day-old pups, using a QIAamp DNA mini kit (Qiagen). One µg of extracted DNA was subjected to bisulfitation, using a EZ DNA methylation-gold kit (Zymo Research). DNA amplification was performed using the following primers: for syn1, forward 5'-TGAGAAGGTATTTTGTTTGGGTTATA-3' and reverse 5'-AAAATCCTTTTTACTTTTCCCCATA-3', and for syn2 in three fragments, forward 5'-TGGTGATGGTGGGAGATTTT-3', 5'-GTTAGAGTTTGAAGGAGGGGTG-3', 5'-TTAATGGTTATATGATTGATTTTTAG-3' and reverse 5'-AAAATCCTTTTTACTTTTCCCCATA-3', 5'-TCAATCATATAACCATTAAACAAA-3', 5'-CCAACAACACCTTAACCTTCCTA-3'. Temperature cycle was: 2 min at 95 °C for DNA denaturation, followed by 40 cycles: 95°C for 30 s, 56°C to 51°C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Amplicons were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen) for sequence analysis.

In vitro experiments with neuronal progenitors. H19-7/IGF-IR progenitor cell line (ATCC# CRL-2526) was conditionally immortalized from embryonic rat brain with a temperature sensitive SV40 large T antigen. Cells were cultured and allowed to differentiate as previously described (1). Cells were allowed to proliferate at the temperature of 33°C in 95% air/5% CO2. Selection was maintained with 200 µg/mL G418. Folate and vitamin B12 deficiency was induced by using DMEM (containing traces amount of B12) lacking vitamin B9 (Invitrogen). After 24h, cells were washed and shifted to the non-permissive temperature (39°C) for induction of their differentiation in high-glucose-DMEM (with or without B9) containing 1% fetal calf serum, N2 supplement (Invitrogen) and 0.11 mg/mL sodium

pyruvate, 2 mM glutamine, 0.1 mg/mL transferrin, 20 nM progesterone, 0.1 mM putrescine and 30 nM sodium selenite This differentiation condition fits with the developmental animal model since the cerebellar cells present a large window of maturation (i.e. differentiation and plasticity) prolonged of several weeks after birth.

In order to investigate the role of estrogen receptors, cells were cultured in a medium complemented with ER agonist or antagonist (purchase from TOCRIS, Southampton, UK) in a final concentration of 100 nM. ERα agonist was 4,4',4''-(4-Propyl-[1*H*]-pyrazole-1,3,5-triyl)*tris*phenol (PPT), ERα antagonist was 1,3-*Bis*(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1*H*-pyrazole dihydrochloride (MPP). MG132 (a proteasome inhibitor, Enzo Life Sciences) and PD98059 (a MEK inhibitor, Calbiochem) were also used and added to the differentiation medium and kept until 13h of differentiation. 5-aza, (a DNA methyltransferase inhibitor, Sigma-Aldrich) and SAHA, (a histone deacetylase inhibitor, Aton Pharma) were used too for epigenetic investigations.

Western blot analysis. The polyvinylidene fluoride membrane were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in TBST buffer containing 5% bovine serum albumin (syn-1, polyclonal, Chemicon and syn-2 poyclonal, Abcam, 1/2000). After being washed with TBST buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibodies (1/5000). Subsequently, immunoreactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence protocol (ECL kit, Amersham Biosciences, Orsay, France). Quantity One software, associated with the VersaDoc imaging system (Model 1000, Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France), was used to quantify signals and densitometric analysis obtained from at least 3 separate experiments were done in arbitrary units (AU).

Posturography of elderly subjects of the OASI cohort. All participants were asked to stand barefoot and upright on the seesaw, the inner border of the feet parallel and 2.36 inches (6 cm) apart, remaining as stable as possible and breathing normally with arms along the sides in eyes open and eyes closed conditions. Feet were positioned in such a way that the mean orientation of the seesaw remains approximately horizontal during balancing. For further details see supplemental methods. The seesaw, made of a square plate (15.75 inches (40 cm) long on each side) mounted 1.96 inches (5 cm) above two circular ridges (radius: 21.65 inches (55 cm)), was aimed to allow pitching movement along the anteroposterior axis. The seesaw was laid on a vertical force platform mounted on three strain-gauge force transducers (Satel, Blagnac, France), providing description of the body sway in terms of displacement of the centre of foot pressure in a two dimensional horizontal plane (recording time: 25.6 s, acquisition frequency: 40 Hz). Seesaw's movements were supposed to be without any friction with the force platform (3,4) The sway path (in mm) travelled by the displacements of the centre of foot pressure was recorded during posturographic evaluation, high values indicating postural impairments (3,4).

Genotyping of syn2 variants. The two PCR primers and the Fu and FC probes were respectively: 5'ggCTCAgCAgACAgACCC3' (forward), 5'TCAACTCACCTgTCTgACATgg3' (reverse), TTCTggAAAgTTTCATgCCC-FL3', and 3'AAggAATggAAAAAAgAgTgggAgACAg5' (rs795009), ggATgAATATggTggTCTCAggTA, TgTAgCTgTTATTTCTgACAACTTCC, TgCAATATgAgAgCAACAACACCCT-FL, CAgAgATAgAATgTAgAATgCACACCCggTgg (rs 2307981), CCgCTACCTTCTATTTTggTCT, ggCTATAAAACgCATCTAgAAATAgg, AAACTAAAAATCCAAgggTggATACC-FL, AgAAAACCATAgTAAAACgAAggATCAAggAAAA (rs308963),

AgCTTAAggTTTTggTTTgTTTATT, TgAACTgTgAgTCAgAggCAgA, TTACAAAgAAAgAAACACACACAAAgA-FL, AAggAATggAAAAAAgAgTgggAgACAg (rs2307973). Overall average genotyping success was greater than 98.6%. Quality control was ensured by including a random 10% of the samples in the 384-well plates as duplicates and internal controls. For the 1.4% remaining samples, amplicons were sequenced by the dideoxy chain termination reaction.

Statistical Analyses. Statistical analyses were performed using Stata Software version 11.0 SE (Stata Corp, Texas USA). Continuous variables from QT-PCR and densitometry analyses of western blots were reported as mean ± S.D. Raw data were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher test. Regarding behavioral studies, the distribution of the data deviated from normality and variances were not equal. We therefore analyzed the data by Mann-Whitney U-test. The statistical analysis of the population study was designed to test the hypothesis of an association between either metabolic parameters or genetic polymorphisms and the presence of disorders of postural control. The minimal size of our sample was estimated at 100 patients, with a study power $1-\beta = 0.8$ and $\alpha = 0.05$, assuming a 1.5-fold difference in the less frequent alleles between subjects with or without disorders of postural control. Continuous variables were compared by Mann-Whitney U-test. Alleles were expressed as number and frequency with 95% exact confidence interval. A chi-square test was used to assess differences. The $\chi 2$ goodness-of-fit test was used to determine whether the observed genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium. The significance and odds ratios of determinants were determined by stepwise multivariate logistic regression analysis, using a model that included age and the variables that were significantly associated (P-value < 0.10) with postural control in univariate analysis (folates, vitamin B12, homocysteine, rs308963, rs795009). Corrections for multiple comparisons were made using the Bonferroni test.

References

1. Battaglia-Hsu, S.F. *et al*. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009;106, 21930-21935.

2. Delabar, U., Kloor, D., Luippold, G., and 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*. 1999;724:231-238.

3. Rougier, P.R., Mathias, M., Tanzi, A. Short-term effects on postural control can be evidenced using a seesaw. *Neurosci Lett.* 2011;488:133-7.

4. Perrin,Ph.P., Jeandel, C., Perrin, C.A., Béné, M.C. Influence of visual control, conduction, and central integration on static and dynamic balance in healthy older adults. *Gerontology* 1997;43, 223-31.

SYNTHESE DE LA PUBLICATION 2

Les données biochimiques montrent une forte diminution de la concentration plasmatique en vitamine B12 et folate dont la conséquence est un blocage de l'activité des enzymes MTHFR et MTR entrainant une hyperhomocystéinémie. On observe également une chute de l'index de méthylation cellulaire SAM/SAH dans le cervelet des ratons carencés âgés de 21 jours. L'observation histologique du cervelet montre une accumulation préférentielle de l'homocystéine dans les cellules de Purkinje. Alors qu'une étude antérieur a montré que l'accumulation d'homocystéine est corrélée avec l'apoptose dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (*Blaise et al.,2007*), cela n'a pas été observé au niveau des cellules de Purkinje en dépit d'une réduction du nombre de ce type de cellule chez les animaux carencés suggérant plutôt un effet développemental de type « programmation fœtale ». C'est à partir des données fonctionnelles que nous avons mis en évidence un dimorphisme sexuel lors d'une série de test (righting reflex et négative geotaxis) évaluant la maturation de la coordination. En effet, seules les femelles carencées présentaient un retard dans l' acquisition motrice lors des différents essais. Par la suite, afin de clarifier les mécanismes sous-jacents à l'origine de ces anomalies fonctionnelles, les investigations ont été abordées au niveau protéique. Une analyse protéomique a permis de cibler une diminution d'expression de la synapsine II qui est un acteur majeur de la neuroplasticité fonctionnelle et qui s'est avérée être 2,2 fois moins exprimés chez les animaux carencés. Les données transcriptomiques et protéiques ont confirmé le dimorphisme sexuel. Ainsi les synapsines et leurs ARNm sont moins exprimés chez les femelles carencés et présentent une distribution tissulaire modifiée notamment pour la synapsine II. D'autres protéines impliquées dans la neuroplasticité ont été parallèlement étudiées, révélant des changements d'expression et de localisation des protéines synapsine I et PSD95 (Post-synaptic density 95) suggérant une réorganisation fonctionnelle de la fente synaptique en réponse aux perturbations causées par la carence.

Suite au changement des niveaux de transcription des synapsines observé, nous avons cherché à déterminer si les mécanismes épigénétiques étaient impliqués puisqu'il a été démontré que leurs promoteurs étaient riches en ilots CpG (*Sauerwald et al.,1990 ;Chin et al.,1994*). Les études de la méthylation des promoteurs dans le modèle animal et l'utilisation d'inhibiteurs de méthyltransférase et de désacétylase nucléaire dans le modèle cellulaire ont montré que les mécanismes épigénétiques n'étaient pas impliqués dans ces modifications d'expression liée à la carence. De nombreux arguments montrent une altération plus sévère chez les femelles exposées au régime carencé. La protéine EGR-1/Zif- 268 est le seul facteur de transcription connu qui contrôle l'expression des deux synapsines I et II (*Thiel et al.,1994 ; Petersohn et al.,1995*). La carence affecte également l'expression de ce facteur de transcription, aussi bien chez les males que les femelles. Nous nous sommes alors intéressés aux récepteurs aux œstrogènes (ER) et notamment ER alpha dont EGR-1 constitue une de ses cibles (*Al-Sarraj et al.,2005*). De plus, l'éventuelle implication d'ERα pourrait expliquer les différences d'expression des synapsines en fonction du sexe chez les animaux carencés.

L'analyse protéique d'ER α a effectivement révélé une diminution d'expression significative uniquement chez les femelles carencées. De plus, en présence d'antagoniste d'Erα dans le milieu de culture de progéniteurs neuronaux, l'expression des synapsines I et II a significativement diminué. En outre, une carence en folate potentialise l'effet d'antagoniste sur l'expression d'ERα. Ces données confirment donc l'influence d'ERα sur l'expression des synapsines ainsi qu'une altération des voies de régulation d'ERα par une carence en donneurs de méthyles. ERα participe à deux voies de régulation : l'une dite génomique et l'autre dite non-génomique (*Behl.,2002*) qui pourrait agir au niveau de la régulation de l'expression et du fonctionnement des synapsines.

La voie génomique requiert la translocation d'ER α dans le noyau afin qu'il active la transcription de certains gènes via les ERE (element response estrogen). Or, cette translocation nucléaire nécessite la participation du cofacteur transcriptionnel PGC1α méthylé et dont la méthylation se trouve diminué en situation de carence. Ceci expliquerait l'observation d'une localisation plutôt cytoplasmique d'Erα chez les carencés. La conséquence est une diminution de l'expression de sa cible EGR1 chez les animaux carencés.

L'autre voie envisagée fait intervenir la méthyltransférase PRMT1 dont la fonction est le transfert d'un groupe méthyle sur des résidus arginine d'ERα. Une fois de plus, dans une situation de carence, la diminution du potentiel de méthylation via la SAM, conduit à une hyporégulation de cette voie cytoplasmique (non génomique) d'ERα. La littérature a montré un lien entre la voie non génomique d'ERα et l'activation de la voie ERK dont la forme phosphorylée est sous-exprimée chez les femelles carencées. Les synapsines étant des cibles d'ERK (*Giachello et al.,2010*), ceci a pour conséquence une diminution de la phosphorylation des synapsines nécessaire à leur fonctionnement (Figure 28). Un effet inverse a été observé chez les mâles carencés. Outre un défaut de fonctionnalité chez les individus carencés, les synapsines présentent une localisation cellulaire ectopique illustrée par une concentration périnucléaire qui est de plus confirmée par l'absence de colocalisation avec un marqueur de vésicule synaptique (Vglut 2).

Enfin, une carence en folate et vitamine B12 peut produire des altérations de la coordination motrice (marche linéaire) chez le jeune mais également chez l'animal âgé. A cet égard, il a été mis en évidence par une évaluation posturographique d'une cohorte de personnes âgées révélant chez les sujets féminins une corrélation entre des désordres posturaux et locomoteurs, des taux d'homocystéine élevés (>15,6 µmol/L) et le polymorphisme de la synapsine II rs795009.

En conclusion, nous avons montré qu'une carence précoce en donneurs de méthyles engendrait des altérations de la coordination motrice en relation avec une atteinte de la plasticité cérébelleuse via des dysrégulations des voies génomique et épigénomique d'ERα révélant un dimorphisme sexuel en défaveur des femelles.

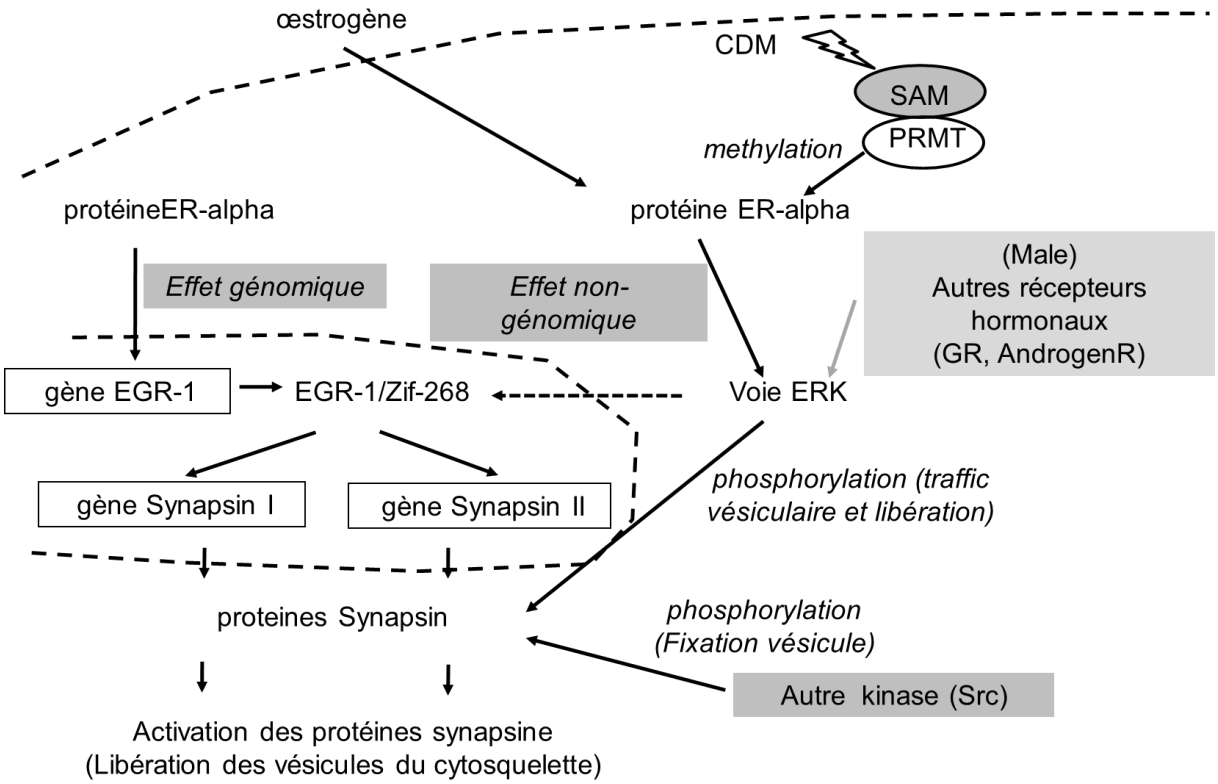


Figure 29 : Schéma mécanistique des voies de régulation d'ERα sur les synapsines

Alors que la première partie traite des conséquences délétères d'une carence nutritionnelle en période périnatale, nous avons voulu caractériser les effets d'un autre facteur environnemental qui peut survenir durant cette même période critique. L'hypoxie néonatale intervient au premier chef dans l'étiologie des asphyxies néonatales aux conséquences délétères. Toutefois, lorsque ce phénomène biologique est appliqué en dessous de son seuil dommageable, sous la forme d'un conditionnement cérébral, il a été montré que l'hypoxie était capable de stimuler une neurogenèse endogène dont les conséquences à long terme n'étaient pas connues.
Aussi, notre objectif était, avec l'étude de ce deuxième type de facteur environnemental, de caractériser sur le long terme un processus apparemment bénéfique en termes de plasticité cérébrale.

Résultats II
Conditionnement hypoxique néonatal

TROISIEME PARTIE: **Un conditionnement hypoxique néonatal bref améliore les fonctions cognitives et les propriétés tissulaires cérébrales chez le rat adulte – Mise en évidence d'un dimorphisme sexuel**.

OBJECTIFS DE LA PUBLICATION 3

Le phénomène d'hypoxie est observé dans le cadre de différentes pathologies, et notamment dans l'asphyxie néonatale qui représente la principale étiologie des lésions cérébrales périnatales. Il s'en suit plusieurs types de lésions à la fois nécrotiques (corps ischémique) et apoptotiques (zone de pénombre). L'hypoxie apparaît alors comme un effecteur particulièrement délétère. Différentes études ont par ailleurs montré que si un stimulus était appliqué en dessous de son seuil dommageable, cela pouvait enclencher des mécanismes de protection intrinsèques capables de prévenir les conséquences néfastes de ce même stimulus appliqué à dose plus forte en induisant une tolérance.
Les premiers travaux (*Bossenmeyer-Pourié et al., 1999 ;Bossenmeyer-Pourié et al., 2002*) qui ont contribué à élucider les mécanismes sous-jacents de la tolérance à l'hypoxie ont porté sur un modèle in vitro de cultures primaires de neurones embryonnaires. Deux stimuli ont été appliqués sur ces cellules : une hypoxie sévère (6 heures) qui se caractérisait par une réduction de la viabilité cellulaire accompagnée d'une augmentation de cellules nécrotiques et principalement apoptotiques. A l'inverse, une hypoxie modérée (3 heures dans ce modèle) entraînait une élévation du taux de viabilité cellulaire, en lien avec la présence de cellules en mitose, conduisant à une neurogenèse réactionnelle. Par la suite, il a été retrouvé des données similaires sur un modèle in vivo d'hypoxie néonatale de 5 minutes chez le rat. Des investigations approfondies sur ce modèle (*Pourié et al., 2006*) ont montré qu'un tel épisode hypoxique stimulait la neurogenèse dans la zone subventriculaire, qui apparaissait maximale à 20 jours post-hypoxie. Certaines cellules issues de cette zone empruntent alors un cordon de migration postérieur afin de s'implanter dans l'hippocampe. Toutefois, les conséquences à long terme sont très peu documentées. Nous avons par conséquent étudié les effets tissulaires et comportementaux de cette même hypoxie néonatale sur les rats, avec une attention particulière pour le facteur sexe des individus.

Author's personal copy

ELSEVIER

SEMINARS IN PERINATOLOGY

Conditioning-like Brief Neonatal Hypoxia Improves Cognitive Function and Brain Tissue Properties with Marked Gender Dimorphism in Adult Rats

Nicolas Martin,* Grégory Pourié, PhD,* Carine Bossenmeyer-Pourié, PhD,* Rozat Jazi, PhD,* Jean-Louis Guéant, MD, PhD,*,† Paul Vert, MD,‡ and Jean-Luc Daval, PhD*

Although recent studies have documented compensatory generation of neurons in adult brains in response to various insults, a noninjurious short episode of hypoxia in rat neonates has been shown to trigger neurogenesis within the ensuing weeks, without apparent brain lesions. Very little is known of the long-term consequences. We therefore investigated the effects of such a conditioning-like hypoxia (100% N_2, 5 min) on the brain and the cognitive outcomes of rats at 40 to 100 days of age. Control and posthypoxic rats developed similar learning capacities over postnatal days 14 to 18, but hypoxia was associated with enhanced scores in a test used to evaluate memory retrieval between 40 and 100 days. A striking sexual dimorphism was observed, with an earlier functional gain observed in female (40 days) compared with male (100 days) rats; gains were associated with matching structural changes in areas involved in cognition, including the hippocampus and frontal cortex. Therefore, it is proposed that brief neonatal hypoxia may exert long-term beneficial effects through neurogenesis stimulation.
Semin Perinatol 34:193-200 © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS rat, neonatal hypoxia, hippocampus, neurogenesis, memory, gender

Hypoxia constitutes the key event of neonatal asphyxia, which remains a major cause of brain injury and neurological disabilities. However, evidence has been provided that the final outcome of cerebral cells may vary considerably according to the severity of the hypoxic episode. In this respect, various reports have documented that a potentially damaging stimulus, when applied below the threshold of injury, can activate protective mechanisms, to finally reduce the deleterious impact of subsequent, more severe stimuli.[1] Such a tolerance phenomenon may be induced by mild hypoxia, both in vitro[2] and in vivo.[3] In past studies,[4,5] in an attempt to depict cell mechanisms underlying hypoxic tolerance, we exposed embryonic rat neurons in primary culture to global hypoxia for either 6 or 3 hours. Neurons subjected to long-lasting hypoxia (6 hours) were committed to die within a few days through an apoptotic mechanism involving the intrinsic mitochondrial pathway. A 3-hour hypoxic stress, however, did not damage cultured neurons, but led to stimulation of cellular mitosis, leading to neurogenesis. Similar observations were reported in vivo in brains of rat pups subjected to sustained (20 minutes) or brief (5 minutes) hypoxia.[6–8] Indeed, exposure of rat neonates to hypoxia for 5 minutes was shown to promote the generation of new neurons issued from the germinative subventricular zone, corroborating previous studies[9,10] in adult animals in which neurogenesis occurred not only as a transient repair mechanism but appeared to be a continuous phenomenon over lifespan.

Although hypoxic preconditioning has been associated with functional benefits,[8,11] very little is known about the long-term effects of hypoxia on neurogenesis stimulation. Therefore, we monitored subsequent brain functional and tissular effects of a brief neonatal hypoxia—which has been demonstrated to trigger neurogenesis—in rats between 40 days (around puberty) and 100 days (adulthood) of age. Because it has been documented that males and females are

*INSERM U954, Nancy-Université, Faculté de Médecine, Nancy, France.
†(EN)IRCCS, Oasi Maria S.S., Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina, Italy.
‡Service de Médecine Néonatale, Maternité Régionale Universitaire, Nancy, France.
The reported work was performed at INSERM U954, Nancy-Université, Faculté de Médecine, Nancy, France.
Address reprint requests to Jean-Luc Daval, PhD, INSERM U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France. E-mail: jean-luc.daval@nancy.inserm.fr

0146-0005/10/$-see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1053/j.semperi.2010.02.003

Author's personal copy

affected differently by hypoxia-ischemia and stroke,[12,13] the 2 genders were investigated separately.

Methods

Exposure to Hypoxia

Experiments were performed on Wistar newborn rats (Charles River, L'Arbresle, France) and were conducted in accordance with internal guidelines for animal care and housing. Litters were reduced to 10 pups for homogeneity. Within 24 hours after birth, half of the litter was placed for 5 minutes in a thermoregulated Plexiglas chamber flushed with 100% N_2, whereas the remaining pups were taken as controls and exposed for the same time to 21% O_2/79% N_2 (a mixture corresponding to air), as previously described.[8] The temperature inside the chamber was adjusted to 36°C to maintain body temperature in the physiological range. All pups were allowed to recover for 20 minutes in normoxic conditions, and they were then returned to their dams. The hypoxic treatment did not result in any animal lethality. In some experiments, indexes of hypoxia were assessed by the measurement of blood gases (P_{O_2}, P_{CO_2}, and pH), as previously described.[6] For this purpose, at the end of exposure to hypoxia (or to normoxia for controls), mixed blood samples were rapidly collected after decapitation, sheltered from ambient air, and rapidly injected into a gas analyzer (Corning Medical and Scientific, Halstead, United Kingdom).

Histopathological Analyses

For tissular investigations, 32 animals were timely killed by decapitation. Brains were quickly harvested and kept at −80°C. Thereafter, sagittal brain sections of 12 μm in thickness were generated by a cryostat, and structures were identified according to the rat brain atlas by Paxinos and Watson.[14] Brain regions interrogated were subfields of the Ammon's horn of hippocampus (CA1 and CA3), dentate gyrus, prefrontal, and frontal cortices. Tissue sections were fixed and stained with Thionin, and morphometric analyses were conducted by a microscope coupled to a computerized image-processing system. Adjacent brain sections were stained with the DNA fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for the measurement of cell density by counting cell nuclei. The presence of apoptosis was selectively analyzed in tissue sections by the Apostain® method by the use of monoclonal antibody to single-stranded DNA (F7-26, AbCys SA, Paris, France) after DNA denaturation by heating in the presence of formamide, as described by Blaise et al.[15]

Neuronal phenotypes were investigated by immunohistochemistry on brain slices incubated overnight at 4°C with one of the following antibodies: antivesicular glutamate transporter 2 (VGlut2, mouse monoclonal, 1/100; Chemicon International, Millipore, Guyancourt, France), anti-glutamate decarboxylase 65/67 (GAD65/67, rabbit polyclonal, 1/100; Chemicon International). After a washing step, immunoreactivity was depicted by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor (1/1000, Molecular Probes, Cergy-pontoise, France). Immunofluorescence visualization and unbiased cell counts were performed with a BX51WI microscope (Olympus, Rungis, France) and analyzed by Cell® analysis software (Olympus).

Regional Brain Metabolism

Overall metabolic activity was evaluated in various brain areas by cytochrome oxidase histochemistry as originally reported by Wong-Riley[16] and slightly modified by Strazielle et al.[17] Brain tissue sections were incubated in the dark for 75 minutes at 37°C in a continuously stirred solution of 0.1-M phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 0.55 mg/mL 3,3′-diaminobenzidine tetrachloride (DAB; Sigma-Aldrich), 0.22 mg/mL horse-heart cytochrome c (Sigma-Aldrich), 0.2 mg/mL catalase (Sigma-Aldrich), and 44.5 mg/mL sucrose. Slides were washed in ice-cold buffer and immersed in a 10% buffered formalin solution for 30 minutes. They were then washed in buffer at room temperature, dehydrated in successive ethanol and xylene baths, and coverslipped with mounting medium. Brain sections from posthypoxic and matched control rats were processed in parallel. Enzyme activity was quantified by densitometric analysis by a computerized image-processing system (Biocom, Les Ulis, France) and by freshly prepared calibrated standards to convert absorbance into enzymatic activity as μmol/min/g of tissue.

Neurobehavioral Studies

Behavioral tests were performed between postnatal days 3 and 100 to evaluate the rats' basic neurodevelopmental abilities[15] and their cognitive performances.[18,19] The data were postanalyzed in the light of gender determined at 21 days of age, with 16 controls (7 male and 9 female rats) and 15 hypoxic rats (9 male and 6 female rats).

Negative Geotaxis

This reflex was tested at postnatal days 3, 6, and 9. The rat pup was positioned with the head downward on an inclined plane with a 20% slope. The time needed for the pup to turn completely and reach a position with the head upward on the plane was measured. The duration of the test was limited to 120 seconds.

Suspension Time

The test was performed at postnatal days 7, 10, 12, and 20. The rat was suspended by its front paws grasping a metal rod (1-mm diameter) that was stretched between the 2 poles of a frame at 20 cm above the table. A Plexiglas sheet was placed in front of the rat to prevent it from turning around the rod. The time the animal remained on the bar was recorded.

Multiple T-Maze

Animals were tested for learning and memory (reference memory) in a multiple T-maze with 6 choice points and dimensions of 180 × 110 cm. The alley through which the animals navigated had a height of 35 cm and a width of 8 cm. It is assumed that food deprivation motivates animals to reach the goal box where they would be rewarded with food. Rats deprived of food for 24 hours were trained 2 times per day for 5 consecutive days between postnatal days 14 and 18. Memory retrieval for this maze was tested at 40, 60, and 100 postnatal days and consisted of 1 single run on those days.

Author's personal copy

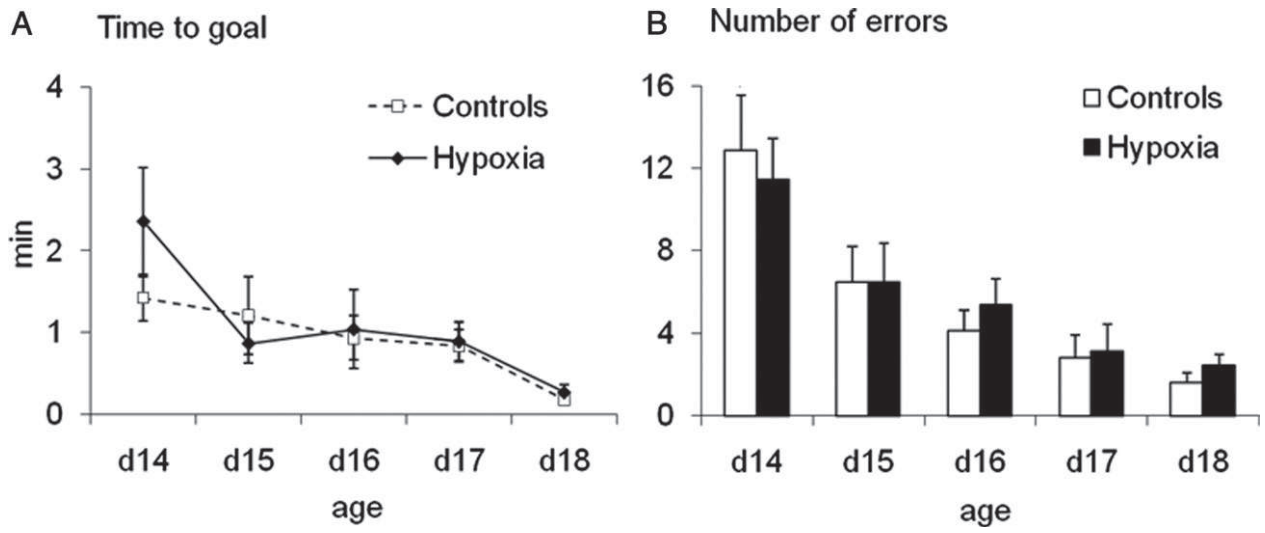


Figure 1 Learning capacities (acquisition of the reference memory) during the multiple T maze test between 14 and 18 days of age: time to reach the goal box containing food, in minutes (A), and number of errors committed at choice points (B). Data are reported as means ± SEM and were obtained from 16 controls and 15 pups previously exposed to neonatal hypoxia. Ages are given as postnatal days. Because no significant differences were found between males and females (ANOVA), results were retrospectively pooled across sex.

Time (in minutes) to reach the goal box as well as wrong decisions at the choice points (number of errors) were recorded. For homogeneity, tests were always performed between 8 and 11 a.m.

Statistics

Data were prospectively collected and analyzed with StatView 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA). Raw data were compared with one-way analysis of variance (ANOVA) with the Fisher's test. For all analyses, a P value <0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Transient hypoxia for 5 minutes was shown to induce a significant hypoxemia (40.6 ± 5.3 vs 62.5 ± 6.1 mm Hg, mean ± SD, n = 5, $P < 0.01$), along with hypercapnia (49.2 ± 6.1 vs 33.7 ± 5.8 mm Hg, $P < 0.05$) and acidosis (7.23 ± 0.04 vs 7.38 ± 0.02, $P < 0.01$).

Neurobehavioral Development: Negative Geotaxis and Suspension Time

No statistically significant differences were found between the 2 experimental groups (ie, controls and hypoxia), either in the percentage of animals that were able to achieve the negative geotaxis test at 3 to 9 postnatal days or in the number of seconds necessary to complete the geotaxis test and the number of seconds of suspension capacities at 7 to 20 postnatal days. Also, the recorded scores were similar in male and female pups (not shown).

Learning Capacities

When rat pups were placed for 5 consecutive days in a multiple T-maze for learning a visuo-spatial task, all were successful, whatever the experimental group concerned. The time spent to achieve goal in the maze decreased progressively between days 14 and 18 (Fig. 1A), with similar improvement observed in control ($P = 0.029$) and hypoxia ($P = 0.0085$) groups. In addition, the number of errors recorded before reaching the goal box was also gradually reduced over time in both groups (Fig. 1B; $P < 0.0001$ for controls and $P = 0.005$ for hypoxic rats). Male and female rats were similar performers in this test (not shown).

Memory Retrieval

Memory retrieval that implies the participation of hippocampus and prefrontal/frontal cortices, was assessed in the same multiple T-maze at 40, 60, and 100 days of age. In these conditions, striking gender differences could be observed. As a whole, scores trended better in control females than in control males at 60 days for escape latencies ($P = 0.042$), but not significantly for the number of errors ($P = 0.18$). This phenomenon was even more apparent at 100 days (Fig. 2; $P = 0.0006$ for escape latencies and $P = 0.008$ for errors). In females, the escape latency was significantly reduced at 40 days in animals exposed to postnatal hypoxia, while the decrease in the number of errors did not reach statistical significance (Fig. 2A, B). Female rats exhibited a tendency to ameliorate their memory retrieval capacities at 60 and 100 days, with no significant group differences. The reverse was observed in male rats. Latencies of controls remained relatively stable but tended to increase between 60 and 100 days of age (Fig. 2C). Finally, the male hypoxia group exhibited significantly lower escape latencies and errors at 100 days (Fig. 2C, D).

Author's personal copy

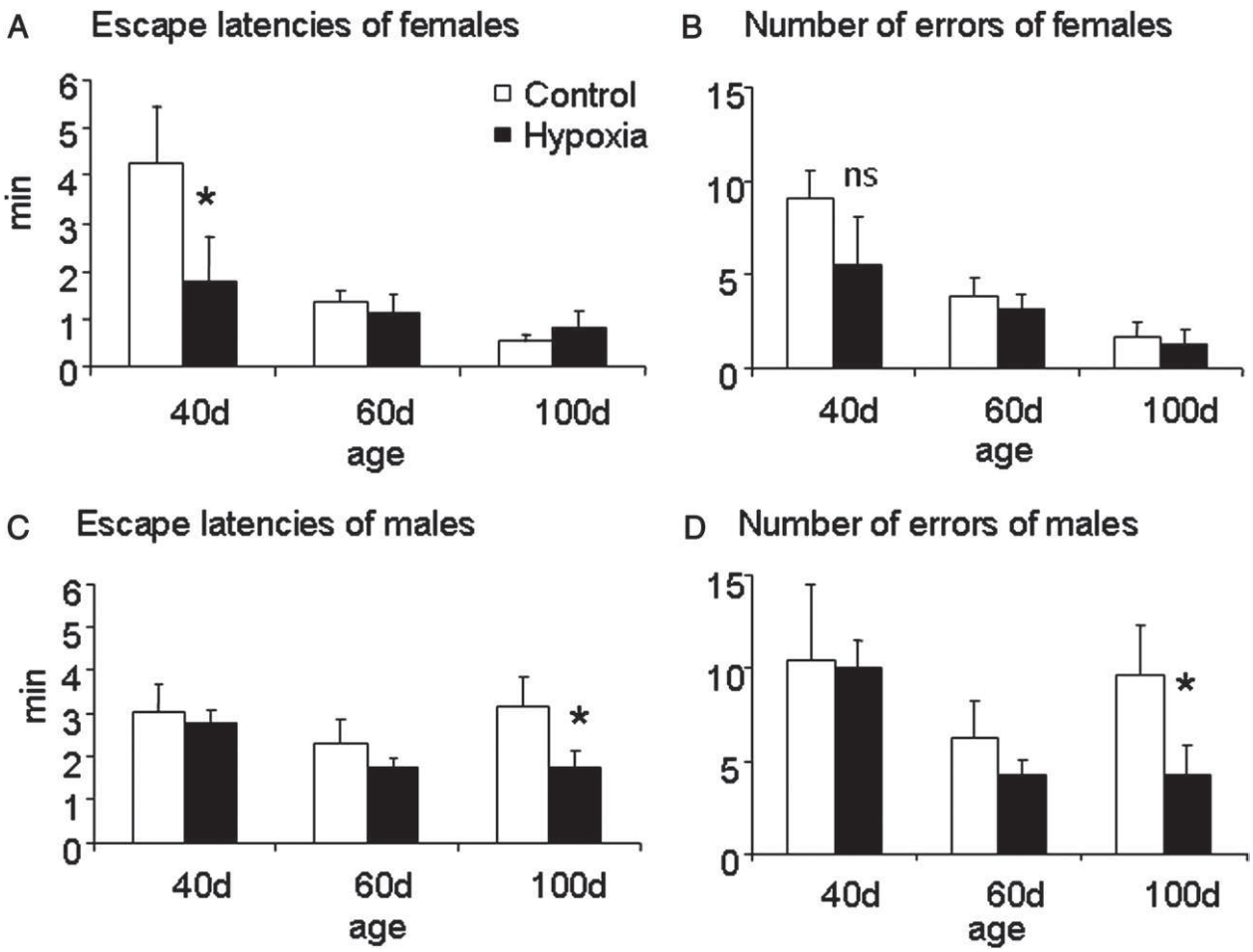


Figure 2 Effects of brief neonatal hypoxia on memory retrieval as a single test in the multiple T maze at 40, 60, and 100 days of age. Females' scores (A and B) and males' scores (C and D). Data are reported as means ± SEM and were obtained from 15 individuals per experimental group. ANOVA summary for comparisons between control and hypoxia groups: $^{*}F_{1.13} = 4.9\text{-}8.3$, $P < 0.05$; $^{ns}F_{1.13} = 3.0$, $P = 0.1$ (ns = not significant).

Anatomopathological and Metabolic Correlates of Functional Observations

Analyses performed on brain slices previously stained with thionin showed that hypoxia was associated with a significantly increased thickness of the hippocampal CA3 layer in female rats at 40 postnatal days (Table 1). At the same age, the thickness of the dentate gyrus was decreased in previously hypoxic males. At 100 days, when hypoxia was related to increased memory retrieval scores in male, but not in female, rats, neonatal hypoxia was not correlated with any structural alteration in females' brains, whereas it was associated with increased thicknesses of the CA1 pyramidal layer and of the dentate gyrus in males (Table 1). In all cases, cell densities (number of cells/μm^2) in the various brain areas studied remained not significantly affected (data not shown).

Apoptosis by group is shown in Table 2. At 40 days,

Table 1 Long-Term Effects of Brief Neonatal Hypoxia on the Thickness of Hippocampal Subregions in Female and Male Rat Brains

	Day 40				Day 100			
	Females		Males		Females		Males	
	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)
CA1 layer	84.6 ± 13.5	85.3 ± 8.9	81.3 ± 4.9	72.9 ± 5.3	71.4 ± 11.2	70.5 ± 15.6	73.7 ± 14.2	112.3 ± 9.9†
CA3 layer	106.2 ± 10.1	128.6 ± 5.5†	107.9 ± 6.0	111.4 ± 9.0	110.5 ± 17.2	101.4 ± 6.7	117.1 ± 18.9	93.2 ± 9.1
Dentate gyrus	91.9 ± 9.4	82.1 ± 6.6	108.9 ± 14.5	83.1 ± 6.4*	70.4 ± 11.6	85.5 ± 11.2	83.1 ± 3.0	101.9 ± 12.9*

Data are expressed as μm (means ± SEM). Measurements were made following staining by Thionin on brain sections collected between 1.5 and 2.5 mm from the zero plane that bisects the brain midsagittally.

CA1 = field CA1 of Ammon's horn, and CA3 = field CA3 of Ammon's horn, according to the stereotaxic atlas of the rat brain by Paxinos and Watson.[14]

Statistically significant differences between control and hypoxia groups (ANOVA, Fisher's test): *P <0.05, †P <0.01.

Author's personal copy

Table 2 Long-Term Effects of Brief Neonatal Hypoxia on Apoptosis in Various Key Brain Areas of Female and Male Rats

	Day 40				Day 100			
	Females		Males		Females		Males	
	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)	Controls (n = 3)	Hypoxia (n = 3)
CA1 layer	9.6 ± 3.5	11.5 ± 4.1	14.6 ± 5.9	16.7 ± 4.3	20.9 ± 8.3	21.2 ± 4.2	14.9 ± 4.0	13.6 ± 3.8
CA3 layer	5.6 ± 2.8	4.0 ± 2.3	7.9 ± 5.1	7.3 ± 3.8	10.3 ± 4.5	12.7 ± 2.2	7.5 ± 2.9	6.0 ± 2.3
Dentate gyrus	12.9 ± 2.9	10.3 ± 3.2	15.0 ± 3.6	13.8 ± 1.9	24.7 ± 3.1	23.5 ± 5.9	28.5 ± 6.3	19.0 ± 3.7†
Prefrontal cortex	5.1 ± 5.9	4.4 ± 3.7	4.5 ± 4.3	5.5 ± 4.7	6.6 ± 5.9	8.9 ± 6.6	7.7 ± 6.9	7.1 ± 4.2
Frontal cortex	7.8 ± 2.8	6.6 ± 2.7	5.4 ± 2.5	8.7 ± 3.3*	10.0 ± 3.3	7.3 ± 3.0	10.3 ± 7.0	6.9 ± 1.9

Apoptosis was analyzed by the Apostain F7-26 specific monoclonal antibody against single-stranded DNA. Data are expressed as number of positive cells per 10^4 μm^2 (means ± SEM). Statistically significant differences between control and hypoxia groups (ANOVA, Fisher's test): *P <0.05, †P <0.01.

increased apoptosis—identified with Apostain immunoreactivity—was found in the frontal cortex of male rats. Apoptosis was less abundant in the dentate gyrus of male rats at 100 days (Table 2).

In good agreement with these findings, immunostaining investigations conducted with antibodies against Vglut2 and GAD65/67 showed that the number of neurons with the glutamatergic phenotype (Vglut2-positive) increased significantly in the CA1 pyramidal layer of posthypoxic female rats at 40 days, with no changes in male rats (Fig. 3). At 100 days of age, greater numbers of glutamateric neurons were specifically found in the dentate gyrus and in the frontal cortex of male rats exposed to neonatal hypoxia, whereas GAD65/67 immunoreactivity, labeling GABAergic neurons, was increased in the CA1 layer and in the dentate gyrus of these animals (Fig. 3). By contrast, Vglut2 immunoreactivity and GAD65/67 immunoreactivity were found to be decreased in hypoxic females' dentate gyrus and CA1 layer, respectively.

Because brain adaptation in response to various environmental conditions may be related, at least partly, to metabolic changes, overall metabolic activity was regionally assessed by the measurement of cytochrome oxidase activity. In these conditions, no significant differences emerged between control and hypoxia groups, whatever the age of animals and the brain structure analyzed (not shown). Nevertheless, multiple comparisons revealed a gender effect in the CA3 layer of the hippocampus as well as in the dentate gyrus, with higher activities (P <0.05, n = 4 per group) in female compared with male rats at all ages studied (between 21 and 100 days).

Discussion

Hypoxia is a common occurrence during early life in mammals. Exposure to moderate hypoxia alone does not cause neuronal death as long as blood pressure and cerebral blood flow are maintained. Moreover, under conditions such as those used in our model, it can promote the generation of new brain cells which have been identified as neurons as they express a variety of neuronal markers.[8] The birth of newly generated cells appeared to be restricted to germinative brain regions, such as the dentate gyrus and the subventricular zone lining the lateral ventricle. However, these cells have been shown to migrate towards specific sites, in particular from the subventricular zone to the hippocampal CA1 layer into which they could integrate.[8]

Because hypoxia in previous studies was not associated with enhanced cell death, this suggests the existence, at least transient, of additional, surnumerary neurons in some brain structures, with many likely functional consequences. Accordingly, we found in the present study various hippocampal regions with increased thickness, long after exposure to brief hypoxia, along with more elevated numbers of neurons expressing specific neurotransmitter phenotypes. In addition, whereas hypoxia did not affect early brain functional maturation, as reflected by negative geotaxis and suspension tests, both control and posthypoxic rats developed similar learning capacities over 14 to 18 postnatal days, suggesting that the presence of additional neurons has no patent deleterious consequences. In contrast, rodents previously subjected to neonatal hypoxia displayed significantly ameliorated scores in the memory retrieval test, indicating that the acute episode of hypoxia around birth can exert lasting effects. The most salient feature of this study corresponds to the marked gender dimorphism that was recorded in response to neonatal hypoxia, with a decreased latency identified for females at 40 days compared with males at 100 days.

Female rats have longer life expectancies compared with age-matched male rats and low rates of cerebral hemorrhage and vascular lesions until an advanced age.[20] Some of these effects can be attributed to hormones inasmuch as estrogen was shown to protect ischemic brain,[21] but other possible mediators may account for these sex differences. Hormone-independent sexual dimorphism has been described in pediatric studies as well as in experimental animal models of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.[22] Male gender is a significant risk factor in childhood stroke and is linked to greater mortality after ischemic stroke in boys relative to girls.[23] Female preterm neonates display better survival, fewer handicaps, and less brain microstructural changes compared with male ones,[24,25] and animal studies have shown clear differences between sexes in outcome in models in which hormone levels are similar.[26] Actually, male and female brain cells show differential gene expression even when no hormonal influences are apparent.[27]

Author's personal copy

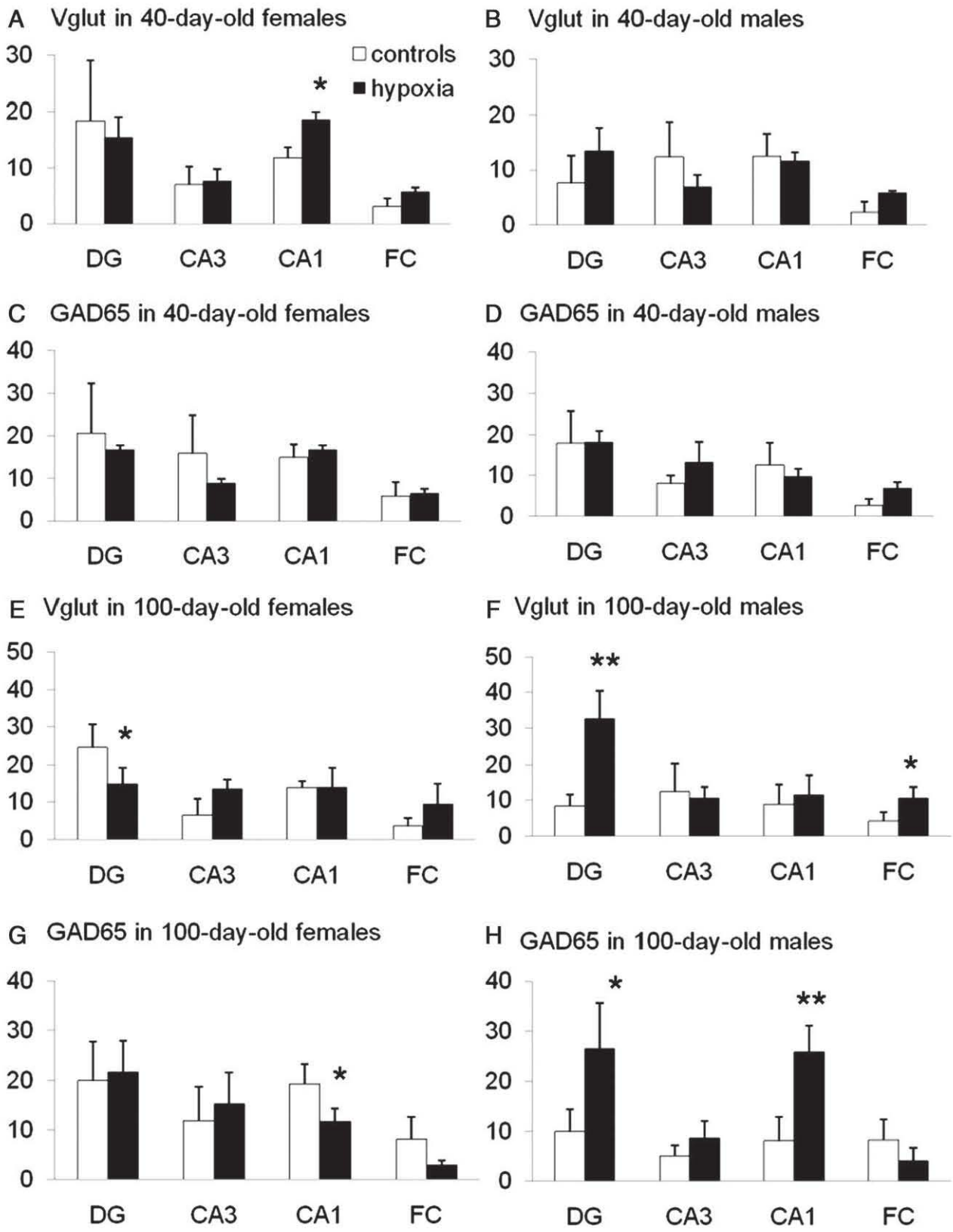


Figure 3 Effect of brief neonatal hypoxia on immunohistochemical densities of glutamatergic neurons (labeled by Vglut) and Gabaergic neurons (labeled by GAD65) in different brain structures, i.e., dentate gyrus (DG), CA3, and CA1 layers of the hippocampus and frontal cortex (FC) in 40- and 100-day-old female and male rats. Data are expressed as numbers of positive cells per 10^4 μm^2 (means ± SEM) and were obtained from 4 individuals in each experimental group. Statistically significant differences between control and hypoxia groups (ANOVA, Fisher's test): $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Author's personal copy

Our study showed that among control animals, memory retrieval scores were poorer in male compared with female rats at 60 days and even more at 100 days. Sex differences have been described in several cerebral regions involved in cognition, such as the hippocampus, amygdala and neocortex.[28] In this respect, the hippocampus, a region most associated with learning and memory, is evidently sexually dimorphic.[29] Extensive evidence demonstrates that male and female hippocampi differ in their anatomical structure, their neurochemistry and their reactivity to stressful situations.[30] For example, both the volume of the CA1 region and the number of pyramidal cells it contains are significantly larger in male than in female rats, as is the density of neurons in the dentate gyrus. Herein, we found a significant sex effect for cytochrome oxidase activity in the CA3 layer and in the dentate gyrus. Evidence also exists for sex differences in many neurotransmitter systems within the hippocampus.[30] Also, sex differences have been reported in the neural substrate for working memory, a function depending on the prefrontal and frontal corticies.[31] These observations may account for the differing performance between the sexes that have been identified on many common learning tasks in both human and animal studies,[32] including in the present work.

Although neurogenesis was not investigated in the present study, existing research suggests a sex difference in hippocampal neurogenesis in the rodent.[33] Interestingly, the authors of a study[34] have provided evidence that early maternal deprivation, referred as withdrawal of the dam from the cage for 24 hours when rat pups are 3 days of age, has opposite effects on neurogenesis in male versus female offspring. Hippocampal neurogenesis at postnatal day 21 was significantly increased in male but decreased in female rats, suggesting that an early stressful event would have a critical influence on establishing sex differences in long-term neural plasticity, as in our own animal model. Although gonadal steroids might contribute to the development of sex differences in neurogenesis per se,[35,36] it remains to be determined whether they are also implicated in the differential long-term effects of environmental events during the perinatal period.

In conclusion, preconditioning-like brief neonatal hypoxia was associated, in our rat model, with long-term improvement of some cognitive functions, along with significant changes of tissue properties occurring in brain regions known to mediate such cognitive functions, ie, the hippocampus and prefrontal/frontal corticies. These findings may be attributable to the previously documented hypoxia-related stimulation of neurogenesis in permissive zones with the ensuing migration of newly generated neurons to specific brain areas involved in cognition.[7,8] This was supported by the lack of changes in cytochrome oxidase activity observed between the 2 experimental groups. Indeed, our findings strongly suggest that the beneficial functional effects associated with neonatal hypoxia would reflect increased cell number rather than enhancement of tissue global metabolic activity. Whether such a valuable phenomenon may concern brain aging and the associated cognitive decline remains to be explored. Finally, a striking gender dimorphism was recorded in this process, with an earlier functional gain specially observed in females relative to males. According to our observations as well as to the data of the literature on the development of preterm infants,[37,38] it should be recommended that any neurodevelopmental study, either experimental or clinical, takes into account gender specificities.

References

1. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM: Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. Trends Neurosci 26:248-254, 2003
2. Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL: Prevention from hypoxia-induced apoptosis by preconditioning: A mechanistic approach in cultured neurons from fetal rat forebrain. Mol Brain Res 58:237-239, 1998
3. Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, et al: Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. Neurosci Lett 168:221-224, 1994
4. Bossenmeyer-Pourié C, Chihab R, Schroeder H, et al: Transient hypoxia may lead to neuronal proliferation in the developing mammalian brain: From apoptosis to cell cycle completion. Neuroscience 91:221-231, 1999
5. Bossenmeyer-Pourié C, Lièvre V, Grojean S, et al: Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. Neuroscience 114:869-882, 2002
6. Grojean S, Schroeder H, Pourié G, et al: Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: A long term follow-up. Neurobiol Dis 14:265-278, 2003
7. Daval JL, Vert P: Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. Semin Perinatol 28:257-263, 2004
8. Pourié G, Blaise S, Trabalon M, et al: Mild, non-lesioning transient hypoxia in the newborn rat induces delayed brain neurogenesis associated with improved memory scores. Neuroscience 140:1369-1379, 2006
9. Hastings NB, Tanapat P, Gould E: Neurogenesis in the adult mammalian brain. Clin Neurosci Res 1:175-182, 2001
10. Lie DC, Song H, Colamarino SA, et al: Neurogenesis in the adult brain: New strategies for central nervous system diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 44:399-421, 2004
11. Ran R, Xu H, Lu A, et al: Hypoxia preconditioning in the brain. Dev Neurosci 27:87-92, 2005
12. Lang JT, McCullough LD: Pathways to ischemic neuronal cell death: Are sex differences relevant? J Transl Med 6:33, 2008
13. Renolleau S, Fau S, Charriaut-Marlangue C: Gender-related differences in apoptotic pathways after neonatal cerebral ischemia. Neuroscientist 14:46-52, 2008
14. Paxinos G, Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (ed. 6). New York, Elsevier/Academic Press, 2007
15. Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, et al: Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. Am J Pathol 170:667-679, 2007
16. Wong-Riley MTT: Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. Brain Res 171:11-28, 1979
17. Strazielle C, Hayzoun K, Derer M, et al: Regional brain variations of cytochrome oxidase activity in Relnrl-oral mutant mice. J Neurosci Res 83:821-831, 2006
18. Hoeger H, Engelmann M, Bernert G, et al: Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. Life Sci 66: 944-962, 2000
19. Hoeger H, Engidawork E, Stolzlechner D, et al: Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. Amino Acids 31:385-396, 2006
20. Yamori Y, Horie R, Handa H, et al: Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. Stroke 7:46-53, 1976
21. McCullough L, Hurn P: Estrogen and ischemic neuroprotection: An integrated view. Trends Endocrinol Metab 14:228-235, 2003

Author's personal copy

22. Johnston M, Hagberg H: Sex and the pathogenesis of cerebral palsy. Dev Med Child Neurol 49:74-78, 2007
23. Fullerton H, Wu Y, Zhao S, et al: Risk of stroke in children: Ethnic and gender disparities. Neurology 61:189-194, 2003
24. Marlow N, Wolke D, Bracewell M, et al: Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. N Engl J Med 352:9-19, 2005
25. Kesler SR, Reiss AL, Vohr B, et al: Brain volume reductions within multiple cognitive systems in male preterm children at age twelve. J Pediatr 152:513-520, 2008
26. Nijboer C, Kavelaars A, van Bel F, et al: Gender-dependent pathways of hypoxia-ischemia-induced cell death and neuroprotection in the immature P3 rat. Dev Neurosci 29:385-392, 2007
27. Dewing P, Shi T, Horvath S, et al: Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. Brain Res Mol Brain Res 118:82-90, 2003
28. Juraska JM: Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain. Psychoneuroendocrinology 16:105-109, 1991
29. Cahill L: Why sex matters for neuroscience. Nat Rev Neurosci 7:477-484, 2006
30. Madeira MD, Lieberman AR: Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. Prog Neurobiol 45:275-333, 1995
31. Duff SJ, Hampson E: A sex difference on a novel spatial working memory task in humans. Brain Cogn 47:470-493, 2001
32. Andreano JM, Cahill L: Sex influences on the neurobiology of learning and memory. Learn Mem 16:248-266, 2009
33. Galea LA: Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. Brain Res Rev 57:332-341, 2008
34. Oomen CA, Girardi CE, Cahyadi R, et al: Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. PLoS ONE 4:e3675, 2009
35. Herrick SP, Waters EM, Drake CT, et al: Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. Brain Res 1121:46-58, 2006
36. Spritzer MD, Galea LA: Testosterone and dihydrotestosterone, but not estradiol, enhance survival of new hippocampal neurons in adult male rats. Dev Neurobiol 67:1321-1333, 2007
37. Reiss AL, Kesler SR, Vohr B, et al: Sex differences in cerebral volumes of 8-year-olds born preterm. J Pediatr 145:242-249, 2004
38. Hintz SR, Kendrick DE, Vohr BR, et al: Gender differences in neurodevelopmental outcomes among extremely preterm, extremely-low-birthweight infants. Acta Paediatr 95:1239-1248, 2006

SYNTHESE DE LA PUBLICATION 3

Le protocole expérimental a consisté à placer les rats nouveau-nés dans une chambre en plexiglas dont l'air est saturé en azote pendant 5 minutes. En parallèle, les animaux témoins étaient maintenus en normoxie. Ce traitement induit des modifications de la gazométrie artérielle illustrée par une hypoxémie, une hypercapnie et une acidose respiratoire. Les deux groupes de ratons ont ensuite retrouvé leur mère jusqu'au sevrage (J21) et ont été sacrifiés à différents temps après un suivi comportemental.

Les premiers tests visant le développement neurocomportemental (J3-J9), negative geotaxis et test de suspension, n'ont montré aucune différence entre les groupes, confirmant qu'une hypoxie brève n'engendre pas d'altérations fonctionnelles précoces mesurables. Les rats ont ensuite été soumis à un labyrinthe multi-T afin d'apprécier leurs performances d'apprentissage/mémoire visuo-spatiale, processus cognitif dépendant de l'hippocampe, du cortex préfrontal et frontal. Alors qu'aucune différence n'a été observée au cours de la phase d'apprentissage (J14-J18), des différences notables sont apparues en fonction du sexe et du traitement lors du processus de rappel de mémoire (J40-J100). Les femelles précédemment exposées à l'hypoxie étaient plus rapides pour réaliser le test à 40 jours, alors que les mâles du groupe « hypoxie » étaient plus performants (en termes de vitesse et de nombre d'erreurs) à l'âge de 100 jours. Ce type d'effet-sexe suggère l'existence d'un délai dans les processus cellulaires mis en jeu.

A 40 jours, les observations morphologiques tissulaires ont montré une corrélation avec les données fonctionnelles. En effet, il a été observé une augmentation significative de l'épaisseur de la couche CA3 des neurones pyramidaux de l'hippocampe chez les femelles du groupe « hypoxie », alors que c'est à 100 jours qu'il a été relevé une augmentation significative de l'épaisseur de la couche CA1 de l'hippocampe et du gyrus denté chez les mâles du même groupe, sans modifications chez les femelles. De plus, l'identification des cellules apoptotiques dans les différentes structures impliquées dans la mémoire visuo-spatiale ont révélé une diminution de l'apoptose dans le gyrus denté des rats mâles du groupe « hypoxie » à 100 jours, en parallèle de leurs performances améliorées. Enfin, en accord avec les données précédentes, le conditionnement hypoxique a été associé à une réorganisation phénotypique neuronale illustrée notamment par un accroissement du nombre de cellules glutamatergiques respectivement chez les femelles à 40 jours et chez les males à 100 jours post-hypoxie.

En conclusion, notre étude a montré qu'une hypoxie néonatale brève, assimilée à un conditionnement, entraînait une amélioration à long terme de certaines fonctions cognitives ainsi que des modifications tissulaires notables des structures cérébrales impliquées dans ces processus mnésiques. Ces observations ont été attribuées, au moins en partie, à la migration et à l'intégration fonctionnelle dans les zones d'intérêt de cellules nouvellement formées en réponse à l'épisode hypoxique (*Daval et Vert, 2004*). De plus, nous avons mis en évidence un dimorphisme sexuel représenté par un gain fonctionnel plus précoce chez les femelles par rapport aux mâles. Ces données soulignent l'importance de prendre en compte les spécificités de genre lors de toute étude sur le développement neurologique, notamment en clinique.

QUATRIEME PARTIE : Une brève hypoxie néonatale confère une résistance à la senescence cérébrale chez les rats mâles âgés associés avec une augmentation de la plasticité synaptique et une amélioration des performances mnésiques

OBJECTIFS DE LA PUBLICATION 4

Des événements délétères au cours de la petite enfance ont été identifiés comme étant prédicteurs de maladies chroniques qui pourraient survenir plus tard dans la vie (*Weaver, 2009*). Inversement, il est documenté que l'exposition postnatale à un environnement enrichi a des conséquences bénéfiques (*Lemaire et al., 2000*). Il a été montré qu'un conditionnement hypoxique entraîne une tolérance aux événements délétères pouvant survenir par la suite, notamment dans le cas d'une ischémie (*Gidday et al., 1994*). Parmi les mécanismes impliqués, différents travaux, à la fois in vitro et in vivo, ont mis en évidence qu'une hypoxie brève était à l'origine d'une augmentation de la neurogenèse dans des zones germinatives comme la zone subventriculaire (ZSV) bordant le ventricule latéral ou le gyrus denté de l'hippocampe (*Bossenmeyer-Pourié et al., 1999 ; Pourié et al., 2006*). Un tel processus favoriserait le réparation tissulaire en cas d'agression cérébrale et persisterait tout au long de la vie (*Lie et al., 2004*). Parallèlement à ces effets, l'hypoxie périnatale améliore les performances de jeunes animaux dans certaines tâches mnésiques hippocampo-dépendantes. Chez ces animaux, alors qu'aucune perte cellulaire secondaire à l'hypoxie n'était apparente, il a été observé une amélioration du statut tissulaire de certaines zones hippocampique suggérant la présence de neurones surnuméraires (*Pourié et al., 2006*). Toutefois, des études ont mis en évidence un lien entre l'hypoxie néonatale et la survenu tardive de différents troubles psychotiques (*Zornberg et al., 2000 ; Dalman et al., 2001*), alors qu'une stimulation excessive de la neurogenèse pourrait nuire au fonctionnement finement régulé de certains circuits neuronaux (*Basovich, 2010*). A notre connaissance aucune étude n'avait évalué les effets à long terme d'une hypoxie néonatale brève jusqu'au stade du vieillissement, Chez ces animaux, nous avons investigué à la fois les mécanismes cellulaires, en particulier au niveau de l'hippocampe, puis les effets à long terme à différents niveaux d'observations (comportementale, tissulaire, cellulaire et moléculaire). Parce qu'il a été montré dans de précédentes études l'existence d'un dimorphisme sexuel vis-à-vis de la réponse cérébrale à différentes situations associant l'hypoxie, mâles et femelles ont été étudiés séparément.

Non-injurious neonatal hypoxia confers resistance to brain senescence in aged male rats, with increased synaptic plasticity and enhanced memory

Nicolas Martin[1,2], Carine Bossenmeyer-Pourié[1,2], Violette Koziel[1,2], Rozat Jazi[1,2], Sandra Audonnet[1,2], Paul Vert[3], Jean-Louis Guéant[1,2,4], Jean-Luc Daval[1,2], Grégory Pourié[1,2]

[1]Inserm U954, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [2]Nancy-Université, Faculté de Médecine, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; [3]Service de Médecine Néonatale, Maternité Régionale Universitaire, Nancy, France ; [4]IRCCS, Oasi Maria S.S., Institute for Research on Mental Retardation and Brain Aging, 94018 Troina (EN), Italy.

Abstract

Whereas brief acute or intermittent episodes of hypoxia have been shown to exert a protective role in the central nervous system and to stimulate neurogenesis, other studies suggest that early hypoxia may constitute a risk factor that influences the future development of mental disorders. We therefore investigated the effects of a neonatal "conditioning-like" hypoxia (100% N_2, 5 min) on the brain and the cognitive outcomes of rats until 720 days of age (physiologic senescence). We confirmed that such a short hypoxia led to brain neurogenesis within the ensuing weeks, along with reduced apoptosis in the hippocampus involving activation of Erk1/2 and repression of p38 and death-associated protein (DAP) kinase. At 21 days of age, increased thicknesses and cell densities were recorded in various subregions, with strong synapsin activation. During aging, early hypoxia was associated with enhanced memory retrieval scores specifically in males, better preservation of their brain integrity than controls, reduced age-related apoptosis, larger hippocampal cell layers, and higher expression of glutamatergic and GABAergic markers. These changes were accompanied with a marked expression of synapsin proteins, mainly of their phosphorylated active forms which constitute major actors of synapse function and plasticity, and with increases of their key regulators Erk1/2, the transcription factor EGR-1/Zif-268, and Src kinase. Thus, early non-injurious hypoxia may trigger beneficial long term effects conferring higher resistance to senescence in aged male rats, with a better conservation of cognitive functions.

Introduction

Adverse environmental conditions during early development have been shown to influence health throughout life (Barker, 1992; McEwen, 2003; Weaver, 2009). The effects of the early cues on subsequent disease risk are not limited to the intrauterine conditions, since the postnatal environment may also influence health outcome as well as subsequent brain functioning. For example, adverse events during early childhood have been found to be a strong predictor of multiple risk factors for various chronic diseases later in life (see for review Weaver, 2009). Conversely, it is documented that postnatal exposure to an enriched environment has beneficial consequences (Lemaire et al., 2000). Neuroadaptations and plasticity may include structural reactions (e.g., neurogenesis or cell death) and/or functional modifications in sensitive brain regions (e.g., long-term potentiation, long-term depression, reorganization of synaptic protein dynamics...). In this respect, exposure to transient oxygen deprivation frequently occurs around birth. If sustained neonatal hypoxia/ischemia remains a major cause of brain injury and neurological disabilities, brief acute or intermittent episodes of hypoxia have been shown to prevent brain damage and to exert a protective role in the central nervous system. Indeed, hypoxic conditioning can prevent the deleterious impact of a subsequent, more severe stimulus, by inducing a tolerance phenomenon (Gidday et al., 1994; Bossenmeyer-Pourié and Daval, 1998). Among the mechanisms involved, it was shown that mild/brief hypoxia triggers the generation of new neurons issued from the germinative areas, such as the dentate gyrus in the hippocampus and the subventricular zone (Bossenmeyer-Pourié et al., 1999; Ong et al., 2005; Pourié et al., 2006), corroborating other studies in adult animals where neurogenesis occurs not only as a transient repair mechanism but appears to be a continuous phenomenon over lifespan (Hastings et al., 2001; Lie et al., 2004). Interestingly, conditioning-like brief postnatal hypoxia was associated in previous studies with improved functional scores in young rats, along with increased size of various hippocampal regions,

suggesting the presence of surnumerary neurons in some brain structures (Pourié et al., 2006; Martin et al., 2010). However, several studies have linked neonatal hypoxia with increased risk of psychotic disorders, such as schizophrenia, later in life (Zornberg et al., 2000; Dalman et al., 2001). Also, the changes triggered in the brain stimulated by "pathologic", excessive neurogenesis may lead to abnormal communications in exquisitely regulated neural networks, which in turn could cause mental diseases, altered cognitive functions or premature brain aging (Basovich, 2010). In this respect, a particular attention should be paid to the relative distribution of the different neuronal phenotypes that constitute brain circuits and govern the balance between excitatory and inhibitory connections. (Wullimann, 2009 ; Failor et al., 2010 ; Cuzon Carlson et al., 2011; Pamenter et al., 2011).

We therefore monitored brain functional outcome and tissular effects of a brief neonatal hypoxia – that has been demonstrated to trigger neurogenesis – in rats until the age of 2 years which corresponds to senescence in normal conditions. Because it has been documented that males and females are affected differently by hypoxia and related pathologic conditions (Lang and McCullough, 2008; Renolleau et al., 2008; Martin et al., 2010), the two genders were investigated separately.

Materials and Methods

Exposure to hypoxia

Experiments were performed on Wistar newborn rats (Charles River, l'Arbresle, France) and were conducted in accordance with internal guidelines for animal care and housing. Litters were reduced to 10 pups for homogeneity. Within 24 hours after birth, half of the litter was placed for 5 min in a thermoregulated Plexiglas chamber flushed with 100% N_2, whereas the remaining pups were taken as controls and exposed for the same time to 21% O_2/79% N_2 (a mixture corresponding to air), as previously described (Pourié et al., 2006). The temperature

inside the chamber was adjusted to 36°C to maintain body temperature in the physiological range. All pups were allowed to recover for 20 min in normoxic conditions, and were then returned to their dams. The hypoxic treatment did not result in any animal lethality. In some experiments, indices of hypoxia were assessed by the measurement of blood gases (P_{O2}, P_{CO2}, and pH), as previously described (Grojean et al., 2003). For this purpose, at the end of exposure to hypoxia (or to normoxia for controls), mixed blood samples were rapidly collected following decapitation, sheltered from ambient air, and rapidly injected into a gas analyzer (Corning Medical and Scientific, Halstead, UK).

Labeling of newly generated cells

To evaluate the rate of cell proliferation in response to hypoxia, bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was solubilized in 0.9% NaCl containing 0.007 N NaOH, and acutely administered intraperitoneally at 50 mg/kg at several ages. Animals were killed 24 h later by decapitation, and their brains immediately frozen in methylbutane at -30°C. With a cryostat, 12-µm sagittal sections were generated, starting from the zero plane that bissects the brain mid-sagittally, and brain structures were identified according to the atlas of Sherwood and Timiras (1970) or to the atlas of Paxinos and Watson (2007). For BrdU immunostaining, DNA was first denatured by incubating brain sections in 2 N HCl for 45 min at room temperature followed by a 10-min neutralization in 0.1 M sodium borate at pH 8.5. Tissue was rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, then in PBS containing 10% goat serum for 1 h, and incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody against BrdU (1/100, Oncogene Research Products, Boston, MA). After washing steps, brain sections were incubated in the presence of a Cy3-conjugated secondary antibody (1/100, Sigma-Aldrich) for subsequent detection of BrdU.

To count BrdU-positive cells, 12 sections collected every 400 µm starting from the appearance of the hippocampus were used for each rat brain. Labeled nuclei were scored in areas delineated by an ocular grid of 1/400 mm^2, and their number was calculated per mm^2.

Histopathological analyses

For further tissular investigations, a total of 32 animals were timely euthanized by decapitation (at 21 or 720 days of age). Brains were quickly harvested, frozen in methylbutane at -30°C, and kept at -80°C. Tissue sections were fixed and stained with thionin, and morphometric analyses were conducted by means of a microscope coupled to a computerized image-processing system. Adjacent brain sections were stained with the DNA fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) for the measurement of cell density by counting cell nuclei.

The presence of apoptosis was selectively analyzed in tissue sections by the Apostain® method using monoclonal antibody to single-stranded DNA (F7-26, AbCys SA, Paris, France) after DNA denaturation by heating in the presence of formamide, as described by Blaise et al. (2007).

Regional brain metabolism

Overall metabolic activity was evaluated in various brain areas by cytochrome oxidase (CO) histochemistry as originally reported by Wong-Riley (1979) and slightly modified by Strazielle et al. (2006). Brain tissue sections were incubated in the dark for 75 min at 37°C in a continuously stirred solution of 0.1 M PBS (pH 7.4) containing 0.55 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB, Sigma-Aldrich), 0.22 mg/mL horse-heart cytochrome c (Sigma-Aldrich), 0.2 mg/mL catalase (Sigma-Aldrich) and 44.5 mg/mL sucrose. Slides were washed in ice-cold buffer and immersed in a 10% buffered formalin solution for 30 min. They were then washed in buffer at room temperature, dehydrated in successive ethanol and xylene

baths, and coverslipped with mounting medium. Brain sections from post-hypoxic and matched control rats were processed in parallel.

Enzyme activity was quantified by densitometric analysis by means of a computerized image-processing system (Biocom, Les Ulis, France), and by using freshly prepared calibrated standards to convert absorbance into enzymatic activity as µmol/min per g of tissue.

Tissue immunochemistry

For immunohistochemical analyses, 12-µm brain sections were incubated in 0.1% triton X100 in PBS for 20 min at room temperature. Slides were dipped in PBS for 10 min, then in PBS containing 10% bovine serum for 1 h, and were incubated overnight at 4°C with a primary antibody against one of the following proteins: vesicular glutamate transporter 2 (VGlut2, mouse monoclonal, 1/100, Chemicon International, Millipore, Guyancourt, France), glutamate decarboxylase 65 (GAD65, rabbit polyclonal, 1/100, Chemicon International), Ox6 (MHC Class II, mouse monoclonal,1/100, AbDserotec, Düsseldorf, Germany),Neurofilament 68 (NF68, rabbit polyclonal, 1/200, USBiological, Euromedex, Souffelweyersheim, France), Neuronal Nuclei (NeuN, mouse monoclonal, 1/200, Chemicon International), Phospho-Synapsin (Pser9-synapsin, 1/200, rabbit polyclonal, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France), Synapsin I (Syn1, rabbit polyclonal,1/200,Calbiochem, Merk, Lyon, France), Synapsin II (Syn2, rabbit polyclonal, Abcam, Paris, France), phospho-tyrosine (mouse monoclonal, Cell Signaling Technology), phospho-serine (mouse monoclonal, Cell Signaling Technology).

After a washing step, immunoreactivity was depicted by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor (1/1 000, Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France). Immunofluorescence visualization and unbiased cell counts were performed with a BX51WI microscope (Olympus, Rungis, France) and analyzed by Cell® analysis software (Olympus).

In addition, the "proximity ligation" assay (Duolink® *in situ* PLA^{TM} reagents, Olink Bioscience, Eurogentec, Angers, France) was used to visualise and quantify synapsin coupling with phospho-Serine^{9} and phospho-Tyrosine^{301}. A pair of oligonucleotide labeled secondary antibodies (PLA probes) generates a signal only when the two probes have bound in close proximity. The signal from each detected pair is visualised as an individual fluorescent dot. The PLA signals can be counted based on microscopy images (Olympus BX51WI microscope with BlobFinder freeware from the Centre for Image Analysis, Uppsala University, Sweden).

Western blot studies

Western blot analyses were performed on nitrogen frozen isolated brain structures. Tissue was solubilized in Ripa lysis buffer containing 140 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) SDS, and protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science, Meylan, France). After homogenization, samples were lysed by three cycles of freezing/thawing and finally centrifuged at 4°C for 30 min at 15,000 x *g*. The protein concentration in the supernatant was determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Interchim, Monluçon, France). Forty µg of protein samples were mixed with an equal volume of 2x Laemmli buffer, denatured by heating the mixture for 5 min at 100°C, and then resolved by 12% SDS-PAGE. The separated proteins were transferred using a Mini Trans-Blot cell onto polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon-P, Millipore, Guyancourt, France), and the membranes were blocked for 1 h with Tris-buffered saline (pH 7.4) and 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST buffer) containing 5% (w/v) bovine serum albumin. The polyvinylidene fluoride membrane were then incubated overnight at 4 °C with a primary antibody against one of the following proteins: Akt (C67E7, rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology, Beverly MA, USA), phospho-Akt (D9E, rabbit monoclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), p38 (rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), phospho-p38

(28B10, rabbit polyclonal, 1/1000, Cell Signaling Technology), Erk1/2 (rabbit polyclonal, 1/5000, Cell signaling Technology), phospho-Erk (Thr^{202}/Tyr^{204}, rabbit monoclonal, 1/500, Cell signaling Technology), phospho Death associated protein kinase (clone DKPS308, mouse monoclonal, 1/500, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), Death associated protein kinase (clone DAPK-55, mouse monoclonal, 1/1000, Sigma-Aldrich), EGR-1 (rabbit polyclonal, 1/500, Cell Signaling Technology), synapsin I (rabbit polyclonal, 1/2000, Calbiochem), synapsin II (rabbit polyclonal, 1/2000, Abcam), Src (36D10, rabbit monoclonal, 1/1000,Cell Signaling Technology), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, mouse monoclonal, 1/1,000, Abcam) was used as an internal standard. Polyvinylidene difluoride membranes were incubated for 1h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1/5000, Molecular Probes). Quantity One software, associated with the VersaDoc imaging system (Model 1000, Bio-Rad Laboratories), was used to quantify signals.

Real-Time quantitative RT-PCR

Total RNA was purified from nitrogen frozen brain tissue with the RNeasy Lipid Tissue kit following the manufacturer's recommendations (Qiagen, Courtaboeuf, France), which included treatment with DNase. To check for possible DNA contamination of the RNA samples, reactions were also performed in control condition without Omniscript RT enzyme (Qiagen).

Specific amplifications were performed using the following primers, forward: 5′-AGCTCCAGGATAAGGGAGGA-3′, and reverse: 5′-TGCCACGTGAAGAGCTGTC-3′ (expected product size: 140 bp) for death-associated protein kinase (DAPK); forward: 5′-GAGGCCCTCCACAACCAG-3′, and reverse: 5′-CTGCTGTGGGACTTGGTAGG-3′ (expected product size: 147 bp) for synapsin I, and forward: 5′-CATGGGTGTTTGCTCAGATG-3′, and reverse: 5′-TCTCTCGGTGATTGGGGTAG-3′

(expected product size: 96 bp) for synapsin II. Quantitation was performed using ribosomal protein S29 (RPS29) as an internal standard with the following primers: forward, 5′-ATGGGTCACCAGCAGCTCTA-3′ and reverse: 5′-GCCCGTATTTACGGATCAGA-3′ (expected product size: 106 bp). Real-time polymerase chain reaction was performed using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of polymerase chain reaction products. Temperature cycling for the DAPK run was 15 min at 95°C to activate the enzyme, followed by 50 cycles of 95°C for 10 seconds, 58°C for 15 seconds, and 72°C for 10 seconds. Temperature cycling for the synapsin I run was 15 min at 95°C to activate the enzyme, followed by 43 cycles of 95°C for 10 seconds, 57°C for 15 seconds, and 72°C for 10 seconds. Temperature cycling for the synapsin II run was 15 min at 95°C to activate the enzyme, followed by 43 cycles of 95°C for 10 seconds, 57°C for 15 seconds, and 70°C for 15 seconds. Temperature cycling for RPS29 run was 15 min at 95°C to activate the enzyme, followed by 43 cycles consisting of 95°C for 10 seconds, 57°C for 15 seconds, and 72°C for 10 seconds. Then melting curves analyses were performed by increasing temperature from 67 to 94°C. Calculation of the results was done with the RelQuant software (Roche Diagnostics, Manheim, Germany). Results were expressed as arbitrary units by calculating the ratio of crossing points of amplification curves of sample mRNAs and internal standard.

Neurobehavioral studies

Behavioral tests were performed between postnatal days 14 and 720 in order to evaluate the rats' abilities and their cognitive performances as already described (Hoeger et al., 2000, 2006). The data were analyzed in the light of gender, with a total of 16 controls (7 males and 9 females) and 15 previously hypoxic rats (9 males and 6 females).

Open-field test: To monitor psychomotor capacities, general activity was measured in an open-field test from 180 to 720 days of age. At various time points, each rat performed a one-trial test consisting in behave freely in a circular area (90cm in diameter and walls of 35cm

high). Four objects were suspended over the area in order to increase the interest of animals. These objects, corresponding to geometric forms, were changed in size and colour between trials. Their height position was chosen to be easily seen by rats without any contact possible. The open field was carefully washed between every animal assay. The total time for each test was fixed at 3 min and two parameters were collected: the total time spent by rats in locomotor activity (corresponding to the total time of the test minus the total time of immobility) and the total amount of rearing behaviours (counted each time the rat leaved the ground with his front paws).

Multiple T-maze: Animals were tested for learning and memory (reference memory) in a multiple T-maze with 6-choice points and dimensions of 180 x 110 cm. The alley through which the animals navigated had a height of 35 cm and a width of 8 cm. It is assumed that food deprivation motivates animals to reach the goal box where they would be rewarded with food. Rats deprived of food for 24 h were trained two times per day for five consecutive days between postnatal days 14 and 18. Memory retrieval for this maze was tested at various ages, from 180 to 720 days, by one single run. Time to reach the goal as well as wrong decisions at the choice points (number of errors) were recorded. For homogeneity, tests were always performed between 8 and 11 a.m.

Statistical analyses

Data were prospectively collected and analyzed with Statview 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley, CA). Raw data were compared by using one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. For all analyses, a P value < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

Results

Short-term effects of transient hypoxia

In these experiments, both males and females rats were included.

Blood gases: In our experimental conditions, acute hypoxia for 5 minutes strongly reduced P_{O2} (40.6 ± 5.3 *vs* 62.5 ± 6.1 mm Hg, means ± s.d., n = 5, $P<0.01$), while it increased P_{CO2} (49.2 ± 6.1 *vs* 33.7 ± 5.8 mm Hg, $P<0.05$) and pH (7.23 ± 0.04 *vs* 7.38 ± 0.02, $P<0.01$).

Key proteins involved in cell death and survival: Transcript amounts of the developmental death-associated protein kinase (DAPK) progressively decreased after exposure to hypoxia in the brain structures investigated, suggesting a protective mechanism (Fig. 1A). This observation was confirmed at the protein level by Western blotting (Fig. 1B), with a reduced expression of the active form, i.e. phospho-DAPK (Fig. 1C,D).

Three hours after hypoxia, tissue amounts of Erk1/2 MAP kinases were not significantly affected, but expression of phopho-Erk1/2 was significantly increased in response to hypoxia. The reverse was observed for phospho-p38, whereas phospho-Akt did not vary (Fig. 1C,D).

Medium-term effects of early transient hypoxia

Cell proliferation: As shown in Fig. 2A, the number of BrdU-positive cells within the subventricular zone (SVZ) was found to be increased in rats previously exposed to hypoxia as compared to controls, with the strongest BrdU incorporation recorded by three weeks post-exposure. At the same time point, the number of BrdU-positive cells in the subgranular layer of the dentate gyrus increased from 115 ± 52 in controls to 427 ± 91 cells/mm^2 in rats exposed to hypoxia (n=5 per group, $P<0.001$). Although not investigated in the present study, previous experiments showed that hypoxia-associated cell proliferation gave rise to functional neurons (Pourié et al., 2006). Concomitantly, thicknesses of hippocampal CA1, CA3 layers and dentate gyrus were significantly augmented in 21-day-old hypoxic rats compared to controls (Fig. 2B), whereas cell density was found higher in all structures examined (Fig. 2C). Finally, both glutamatergic and GABAergic phenotypes appeared to be increased in most structures following hypoxia, as shown by the number of cells expressing either the vesicular glutamate

transporter 2 (VGluT2) or the glutamate decarboxylase 65 (GAD65) GABAergic synaptic isoform (Fig. 2D,E).

Functional synaptic markers: Transcripts of neuronal plasticity proteins synapsins were significantly more elevated as early as 1 hour (30 min?) after exposure to hypoxia in the SVZ for synapsin I and in hippocampus and SVZ for synapsin II (Fig. 3A,B). At 21 days of age, synapsin I, synapsin II and phospho-synapsins (Ser^{9}) were more elevated in the hippocampus of rats previously exposed to hypoxia, as illustrated by immunochemistry in the CA1 layer (Fig. 3C). In addition, the "proximity ligation" assay (Duolink®) confirmed hypoxia-associated increased expression of phospho-synapsins (Ser^{9} and Tyr^{301}) in both CA1 layer and frontal cortex for synapsin I , and in the CA1 layer for synapsin II (Fig. 3D-I).

Long-term effects during aging of early hypoxia

Locomotor capacities, learning, memory, and metabolic activities: Regarding spontaneous activity in the open-field between 180 and 720 days of age, no statistically significant differences were found between the two experimental groups (i.e. controls and hypoxia), either in the exploration time or in the number of rearings. In addition, the recorded scores were similar in males and females (Fig. 4A-D).

When rat pups were placed for 5 consecutive days (between 14 and 18 days of age) in a multiple T-maze for learning a visuo-spatial task, all of them were successful, whatever the experimental group concerned, in good accordance with previous report (Martin et al., 2010). The time spent to goal as well as the number of errors gradually decreased over time similarly in control and hypoxia groups. In addition, male and female rats were similar performers in this test (not shown).

Memory retrieval, involving the participation of hippocampus and prefrontal/frontal cortices, was then assessed in the same multiple T-maze between 180 and 720 days of age. As a whole, scores tended to be better in control females than in control males, a phenomenon that reached

statistical significance starting from 450 days, when males began to need longer time to escape the maze (Fig. 4E,F). Whereas no significant difference in escape latency emerged at any time between control and hypoxic females, males early exposed to transient hypoxia displayed significantly higher scores than controls at 540 days (P=0.0001). Scores tended to be better at 720 days, but statistical significance could not be reached (P=0.08), probably because of age-related mortality (3 among 7 in controls and 2 among 9 in hypoxia group) that reduced the number of animals for statistical analysis. Regarding numbers of errors, they increased with age (from 1.00±0.46 to 2.83±0.98 in control females, from 1.67±0.49 to 2.67±0.99 in hypoxic females, from 2.67±1.14 to 5.29±1.29 in control males, from 1.43±0.47 to 4.80±1.36 in hypoxic males), with no significant differences between control and hypoxia groups.

Because brain adaptation in response to various environmental conditions may be related, at least partly, to metabolic changes, overall metabolic activity was regionally assessed by the measurement of cytochrome oxidase activity at 540 and 720 days of age. As shown in Table 1, no significant differences emerged between control and hypoxia groups, whatever the brain structure analyzed. Nevertheless, ANOVA revealed a sex effect in the CA3 layer of the hippocampus, the dentate gyrus as well as in the frontal and prefrontal cortices, with higher activities in females ($P < 0.05$). Interestingly, a significant correlation ($P = 0.037$) was found between cytochrome oxidase activity in the dentate gyrus − a critical structure for memory retrieval − and functional scores reached by the four experimental groups, i.e., males and females, subjected or not to early hypoxia (Fig. 4G).

Since early hypoxia was shown to exert long-term “beneficial” effects on cognitive functions specifically in male rats, with enhanced memory, regardless of locomotor abilities, the subsequent experiments performed at 720 days of age included only males.

Histological correlates: As observed in 21-day-old animals, increased layer thickness could be still depicted at 720 days in CA1, CA3 and dentate gyrus in the brains of male rats early exposed to hypoxia (Fig. 5A,B), with no changes in cell densities in the various brain areas examined (Fig. 5C). In addition, increases of glutamatergic and/or GABAergic markers could be observed in most areas involved in hippocampus-dependent learning and memory processes (Fig. 5D-H).

Concomitantly, apoptosis and inflammation, as depicted by Apostain and Ox-6, respectively, were lower in aged males previously subjected to hypoxia (Fig. 6A,B,D), whereas transcription of the apoptosis-promoting developmental kinase DAPK was significantly reduced in the subventricular zone, where neurogenesis is known to persist over lifespan (Fig. 6C).

Synaptic function and plasticity: In parallel to improved cognition and persisting brain histological changes associated with early hypoxia, mRNA amounts and protein expression of synapsins were found to be increased in various brain structures, especially in the hippocampus (Fig. 7A-C). Moreover, as illustrated by histochemistry and documented by Duolink®, synapsin phosphorylation differed between control and hypoxia groups (Fig. 7D-H). Augmented Tyr^{301} phosphorylation of synapsin I was evidenced in the CA1 layer and frontal cortex, whereas higher Ser^{9} phosphorylation was observed in CA1 (Fig. 7E,F). Regarding synapsin II, only Tyr^{301} phosphorylation was significantly augmented in CA1, while its phosphorylation at both residues (i.e., Ser^{9} and Tyr^{301}) was reduced in the frontal cortex (Fig. 7G,H).

The Erk-dependent serine phosphorylation of synapsins plays a key role in the modulation of their functionality (Cesca et al., 2010). It contributes to the cellular distribution of synapsins, the establishment of functional synaptic connections, the cycling of synaptic vesicles and the release of neurotransmitters (Vara et al., 2009; Giachello et al., 2010). Furthermore, synapsins

are downstream targets for the zinc finger transcription factor EGR-1/Zif-268 that regulates the expression of their genes (Thiel et al., 1994; Petersohn et al., 1995), and it was reported that Erk1/2 pathway stimulates expression and biological activity of the transcriptional regulator EGR-1 (Kaufmann et al., 2001). Finally, it has been shown that Tyr^{301} phosphorylation of synapsin I by Src kinase regulates synaptic-vesicle trafficking (Messa et al., 2010). We therefore additionally assessed the expression of these various proteins in the brain of 720-day-old male rats. In good agreement, Src, phospho-Erk (mainly phopho-p42), and EGR-1 were found to be increased in the hypoxia group, especially in the key structure corresponding to the hippocampus (Fig. 7C). These observations may explain the downstream increased expression and phosphorylation of synapsins.

Discussion

Contrary to the long-held dogma, evidence has been provided that neurogenesis occurs throughout the life in mammals, and that neural stem cells reside in the adult central nervous system (see for review Taupin, 2006). Moreover, it has been documented that brain injuries, depending on their characteristics, can trigger neurogenesis (Ohira, 2011). In recent studies, we showed that a short (5 min) neonatal hypoxia in rats can activate endogenous brain neurogenesis that secondarily gives rise to a significant functional gain (Pourié et al., 2006; Martin et al., 2010). In good agreement, Lu et al. (2009) reported that postnatal exposure to mild intermittent hypoxia (16% O2, 4 h/day for 4 weeks) enhances spatial learning and memory in developing mice. However, whereas cell mechanisms involved remain poorly understood, no information was available on the long-term consequences on the aging brain of the surnumerary neurons produced in early life. In the present work, we first showed that within a few hours following hypoxia (evidenced by a significant P_{O2} decrease), specific brain areas such as the subventricular zone and the hippocampus achieved a reduction of

pathways involved in cell death, such as those mediated by p38 MAP kinase and DAP kinase (Xia et al., 1995; Bialik and Kimchi, 2006). By the same time, ERK1/2 pathway was upregulated, and this could be related to cell survival and cell proliferation reflected by increased BrdU incorporation (Pourié et al., 2006), whereas the pro-survival Akt pathway would not be involved in our model. The presence of surnumerary cells was confirmed at 21 days of age by enlarged size of various cell layers in the hippocampus, increased cell density, and augmentation of both excitatory and inhibitory cell phenotypes, along with increased synaptic plasticity reflected by synapsins and phosphosynapsins (Cesca et al., 2010). Although the birth of newly generated cells appeared to be limited to the known germinative areas, i.e. the subventricular zone and the subgranular zone of the dentate gyrus, several lines of evidence suggest that new neurons may migrate widely from these neurogenic regions to be then broadly located in the brain (Pourié et al., 2006; Ohira, 2011).

Aging is normally associated with brain functional decline, especially cognitive decline, which involves various mechanisms. Although these mechanisms usually begin to occur earlier, during adulthood, behavioral parameters are the latest characteristics giving evidence of functional decline, and may be considered as alert signals of neurodegeneration (Taffe et al., 2004). In this respect, we report for the first time that male rats previously subjected to neonatal hypoxia displayed significantly higher scores than controls in a memory retrieval test during senescence, independently of their locomotor capacities. In fact, our data showed that these animals reached females' scores, which were less affected by aging. Different studies using both cellular and functional markers have shown that, in physiological conditions, females present a higher resistance to senescence than males (Wiederholt et al., 1993; Coffey et al., 1998). Also, it has been documented that female rats have longer life expectancies compared to age-matched males and low rates of cerebral hemorrhage and vascular lesions until an advanced age (Cahill, 2006). Furthermore, obvious sex differences have been

described in several brain regions involved in cognition such as the hippocampus (Juraska, 1991; Cahill, 2006).

At the tissular level, our observation is in good correlation with the level of cytochrome oxidase activity in the dentate gyrus, a structure involved in memory. Actually, this measurement showed that aged males initially subjected to short hypoxia are closer to females than to matched control males in terms of global metabolic activity and memory scores. In addition, we showed that previously hypoxic 2-year-old males exhibited a better preservation of their brain integrity than controls, especially at the hippocampus level, with reduced age-related apoptosis, larger hippocampal cell layers, and higher expression of glutamatergic and GABAergic markers known to be involved in cognition. These changes were accompanied with a marked expression of synapsin proteins, mainly of their phosphorylated active forms which constitute key actors of synapse function and plasticity (Turner et al., 1999; Cesca et al., 2010). As shown in the present study, this latter observation does not only reflect the presence of a higher number of cells, but the activation of various, interdependent functional pathways, involving Erk1/2 MAP kinases, the transcription factor EGR-1/Zif-268, and Src kinase with, ultimately, enhanced synapsin functions. Moreover, our data are in good agreement with the demonstration that synaptic activity reduces apoptosis and promotes neuronal survival(Léveillé et al., 2010).

Taken together, our data show that an acute episode of hypoxia around birth can trigger neurogenesis associated with long lasting, beneficial rather than deleterious effects on the brain. This is of particular interest with regard to the recent review by Simon N. Basovich (2010) that questions about the capacity of early hypoxia to increase mental capacity and, as a possible consequence, its role in the etiology of mental disorders. The present results suggest that in some brain areas, such as the hippocampus, of old males having experienced early hypoxia, the quantity of neurons with increased synaptic functioning and plasticity could

remain above a minimum threshold to confer higher resistance to senescence, with a better preservation of cognitive functions.

References

Alvarez-Buylla A, Herrera DG, Wichterle H. The subventricular zone: source of neuronal precursors for brain repair. Prog Brain Res. 2000; 127:1-11.

Barker DJ. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. Proc Nutr Soc. 1992;51: 135-144.

Basovich SN. The role of hypoxia in mental development and in the treatment of mental disorders: a review. Biosci Trends. 2010 4: 288-296.

Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. Annu Rev Biochem 2006; 75: 189-210.

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

Bossenmeyer-Pourié C, Chihab R, Schroeder H, Daval JL. Transient hypoxia may lead to neuronal proliferation in the developing mammalian brain: from apoptosis to cell cycle completion. Neuroscience 1999; 91: 221-231.

Bossenmeyer-Pourié C, Daval JL: Prevention from hypoxia-induced apoptosis by preconditioning: A mechanistic approach in cultured neurons from fetal rat forebrain. Mol Brain Res 1998; 58: 237-239.

Cahill L: Why sex matters for neuroscience. Nat Rev Neurosci 2006; 7: 477-484.

Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. Prog Neurobiol. 2009;88:41-63.

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. Prog Neurobiol. 2010; 91: 313-348.

Coffey CE, Lucke JF, Saxton JA, Ratcliff G, Unitas LJ, Billig B, Bryan RN. Sex differences in brain aging: a quantitative magnetic resonance imaging study. Arch Neurol. 1998; 55: 169-179.

Coronas V. Endogenous regulation of neural stem cells in the adult mammalian brain. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 2009; 9: 110-118.

Cuzon Carlson VC, Seabold GK, Helms CM, Garg N, Odagiri M, Rau AR, Daunais J, Alvarez VA, Lovinger DM, Grant KA. Synaptic and morphological neuroadaptations in the putamen associated with aong-term, relapsing alcohol drinking in primates. Neuropsychopharmacology. 2011, Jul 27. doi: 10.1038/npp.2011.140. [Epub ahead of print].

Dalman C, Thomas HV, David AS, Gentz J, Lewis G, Allebeck P. Signs of asphyxia at birth and risk of schizophrenia. Population-based case-control study. Br J Psychiatry. 2001; 179:403-408.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci. 1997; 17: 5046-5061.

Failor S, Nguyen V, Darcy DP, Cang J, Wendland MF, Stryker MP, McQuillen PS. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia impairs plasticity in rat visual cortex. J Neurosci. 2010; 30: 81-92.

Fan Y, Liu Z, Weinstein PR, Fike JR, Liu J. Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. Eur J Neurosci. 2007; 25: 38-46.

Fréchette M, Rennie K, Pappas BA. Developmental forebrain cholinergic lesion and environmental enrichment: behaviour, CA1 cytoarchitecture and neurogenesis. Brain Res. 2009; 1252:172-182.

Giachello CN, Fiumara F, Giacomini C, Corradi A, Milanese C, Ghirardi M, Benfenati F, Montarolo PG. MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. J. Cell. Sci. 2010; 123: 881-893.

Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. Neurosci Lett 1999; 168: 221-224.

Gobeske KT, Das S, Bonaguidi MA, Weiss C, Radulovic J, Disterhoft JF, Kessler JA. BMP signaling mediates effects of exercise on hippocampal neurogenesis and cognition in mice. PLoS One. 2009; 4: e7506.

Grojean S, Schroeder H, Pourié G, Charriaut-Marlangue C, Koziel V, Desor D, Vert P, Daval JL. Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: a long term follow-up. Neurobiol Dis 2003; 14: 265-278.

Hastings NB, Tanapat P, Gould E. Neurogenesis in the adult mammalian brain. Clin Neurosci Res 2001; 1: 175-182.

Hoeger, H., Engelmann, M., Bernert, G., Seidl, R., Bubna-Littitz, H., Mosgoeller, W., Lubec, B., and Lubec, G. Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. Life Sci. 2000; 66: 947-962.

Hoeger, H., Engidawork, E., Stolzlechner, D., Bubna-Littitz, H., and Lubec, B. Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. Amino Acids 2006; 31: 385-396.

Juraska JM: Sex differences in 'cognitive' regions of the rat brain. Psychoneuroendocrinology 1991; 16: 105-109.

Kalluri HS, Dempsey RJ. Growth factors, stem cells, and stroke. Neurosurg Focus. 2008;24:E14

Kaufmann K, Bach K, Thiel G. The extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. Biol Chem. 2001; 382: 1077-1081.

Lang JT, McCullough LD: Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant? J Transl Med 2008; 6: 33.

Lazic SE, Grote HE, Blakemore C, Hannan AJ, van Dellen A, Phillips W, Barker RA. Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. Eur J Neurosci. 2006; 23: 1829-1838.

Leal-Galicia P, Castañeda-Bueno M, Quiroz-Baez R, Arias C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. Neurobiol Learn Mem. 2008; 90: 511-518.

Lemaire, V., Lamarque, S., Moal, M. L., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. Biological Psychiatry 2006; 59: 786–792.

Léveillé F, Papadia S, Fricker M, Bell KF, Soriano FX, Martel MA, Puddifoot C, Habel M, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Tolkovsky AM, Hardingham GE. Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. J Neurosci. 2010; 30: 2623-2635.

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

Lu XJ, Chen XQ, Weng J, Zhang HY, Pak DT, Luo JH, Du JZ. Hippocampal spine-associated Rap-specific GTPase-activating protein induces enhancement of learning and memory in postnatally hypoxia-exposed mice. Neuroscience. 2009; 162: 404-414.

Martin N, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Jazi R, Guéant JL, Vert P, Daval JL. Conditioning-like brief neonatal hypoxia improves cognitive function and brain tissue

properties with marked gender dimorphism in adult rats. Semin Perinatol. 2010; 34: 193-200.

Mathieu P, Battista D, Depino A, Roca V, Graciarena M, Pitossi F. The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. J Neurochem. 2010; 112:1368-1385.

McEwen B.S. Early life influences on life-long patterns of behavior and health, Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2003; **9**: 149–154.

Messa M, Congia S, Defranchi E, Valtorta F, Fassio A, Onofri F, Benfenati F. Tyrosine phosphorylation of synapsin I by Src regulates synaptic-vesicle trafficking. J Cell Sci. 2010; 123(Pt 13): 2256-2265.

Ohira K. Injury-induced neurogenesis in the mammalian forebrain. Cell Mol Life Sci. 2011; 68: 1645-1656.

Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. Pediatr Res. 2005 58: 600-606.

Pamenter ME, Hogg DW, Ormond J, Shin DS, Woodin MA, Buck LT. Endogenous GABAA and GABAB receptor-mediated electrical suppression is critical to neuronal anoxia tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108: 11274-11279.

Paxinos G, Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (ed 6). New York, Elsevier/Academic Press, 2007.

Petersohn D, Schoch S, Brinkmann DR, Thiel G. The human synapsin II gene promoter. Possible role for the transcription factor zif268/egr-1, polyoma enhancer activator 3, and AP2. J Biol Chem. 1995; 270: 24361-24369.

Pourié G, Blaise S, Trabalon M, Nédélec E, Guéant JL, Daval JL. Mild, non-lesioning transient hypoxia in the newborn rat induces delayed brain neurogenesis associated with improved memory scores. Neuroscience. 2006; 140: 1369-1379.

Renolleau S, Fau S, Charriaut-Marlangue C: Gender-related differences in apoptotic pathways after neonatal cerebral ischemia. Neuroscientist 2008; 14: 46-52.

Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich DW 3rd, Bullock MR. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. J Neurosurg. 2010 ; 112:1125-1138.

Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. Nature. 2004; 427: 740-744.

Sherwood NM, Timiras PS. A stereotaxic atlas of the developing rat brain. Berkeley: University of California Press, 1970.

Shioda N, Han F, Fukunaga K. Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis following brain ischemia. Int Rev Neurobiol. 2009;85:375-387.

Steiner B, Wolf S, Kempermann G. Adult neurogenesis and neurodegenerative disease. Regen Med. 2006;1:15-28.

Strazielle C, Hayzoun K, Derer M, Mariani J, Lalonde R. Regional brain variations of cytochrome oxidase activity in Relnrl-orl mutant mice. J Neurosci Res 2006; 83: 821-831.

Sun D, Bullock MR, Altememi N, Zhou Z, Hagood S, Rolfe A, McGinn MJ, Hamm R, Colello RJ. The effect of epidermal growth factor in the injured brain after trauma in rats. J Neurotrauma. 2010;27:923-938.

Taupin P. Adult neurogenesis in mammals. Curr Opin Mol Ther. 2006; 8: 345-351.

Thiel G, Schoch S, Petersohn D. Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/egr-1. J Biol Chem. 1994; 269: 15294-15301.

Turner KM, Burgoyne RD, Morgan A. Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. Trends Neurosci. 1999; 22:459-464.

Vandenbosch R, Borgs L, Beukelaers P, Belachew S, Moonen G, Nguyen L, Malgrange B. Adult neurogenesis and the diseased brain. Curr Med Chem. 2009; 16: 652-666.

Vara H, Onofri F, Benfenati F, Sassoè-Pognetto M, Giustetto M. ERK activation in axonal varicosities modulates presynaptic plasticity in the CA3 region of the hippocampus through synapsin I. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009; 106: 9872-9877.

Weaver IC. Shaping adult phenotypes through early life environments. Birth Defects Res, 2009, 87: 314-326.

Wiederholt WC, Cahn D, Butters NM, Salmon DP, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. Effects of age, gender and education on selected neuropsychological tests in an elderly community cohort. J Am Geriatr Soc. 1993; 41: 639-647.

Wong-Riley MTT: Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. Brain Res 1979; 171: 11-28.

Wullimann MF. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. Integr Zool. 2009; 4:123-133.

Wurm F, Keiner S, Kunze A, Witte OW, Redecker C. Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain. Stroke. 2007; 38: 2833-2640.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995 ; 270: 1326-1331.

Zhang JX, Chen XQ, Du JZ, Chen QM, Zhu CY. Neonatal exposure to intermittent hypoxia enhances mice performance in water maze and 8-arm radial maze tasks. J Neurobiol. 2005; 65: 72-84.

Zornberg GL, Buka SL, Tsuang MT. Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study. Am J Psychiatry. 2000; 157:1 96-202.

Legends to Figures

Figure 1: Short-term changes in major signaling proteins in response to transient hypoxia. (**A**) Temporal profiles of DAPK mRNAs in frontal cortex, hippocampus and subventricular zone (SVZ) following hypoxia and in matched controls. Data are reported as means ± s.d. (n=3). Statistically significant differences between hypoxia and controls: $^{**}P<0.01$. (**B**) Temporal profiles of total DAPK expression in the hippocampus after hypoxia (H) and matched controls (C). Experiments were performed three times with similar results. (**C**) Expression profiles of total and phosphorylated Erk1/2 (p44 and p42) MAP kinases, Akt and phospho-Akt, p38 and phospho-p38, DAPK and phospho-DAPK, 3 hours after exposure to hypoxia (H) and matched controls (C) in frontal cortex (cx) and hippocampus (hip). Experiments were performed five times with similar results. (**D**) Corresponding densitometric analyses of phospho-proteins in arbitrary units (AU). Data are reported as means ± SD (n=5). Statistically significant differences between hypoxia and controls: $^{**}P<0.01$.

Figure 2: Medium-term changes in 21-day-old rat brains after transient neonatal hypoxia. (**A**) Temporal changes in the number of BrdU-positive cells in the subventricular zone of control rats and those exposed to brief hypoxia after birth. Numbers of labeled nuclei were counted in four distinct areas of the subventricular zone delineated by an ocular grid of 1/400 mm^2. Results are expressed as cell numbers per mm^2 (n=5). Statistically significant difference between hypoxia and controls: $^{**}P<0.01$. (**B,C**) Layer thicknesses (μm) and cell densities per 10 000 μm^2 in various brain structures (DG = dentate gyrus, FCx = frontal cortex, PFCx = prefrontal cortex), n=5, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. (**D,E**) Numbers of glutamatergic (VGluT2-positive) cells and of GABAergic (GAD65-positve) cells, n=5, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

Figure 3: Changes in synaptic functional markers, synapsins I and II, in response to hypoxia. (**A,B**) Synapsins I and II mRNA levels in various brain structures of rats one hour (30 minutes?) after exposure to hypoxia and their matched controls (n=3, **P<0.01). (**B**) Immunohistological detection of synapsin I, synapsin II and phospho-synapsins (Ser^9) in the CA1 layer of 21-day-old rats previously exposed to hypoxia and their matched controls (cells were counterstained by DAPI (blue) and by the neuronal protein NeuN (red). (**D-G**) *In situ* coupling between synapsins with phospho-Ser^9 and phospho-Tyr^{301}, as monitored by the Duolink® "proximity ligation" assay: number of dots per cell in CA1 and frontal cortex of 21-day-old control and hypoxic rats. Experiments were performed in triplicate (*P<0.05, **P<0.01). (**H,I**) Illustration of *in situ* association between synapsin I and phospho-Ser^9 in the CA1 layer and the frontal cortex (Cx) of control and hypoxic rats, as revealed by red fluorescent dots in the Duolink® "proximity ligation" assay. Experiments were performed in triplicate, leading to similar results.

Figure 4: Effects of early hypoxia on behavioral capacities between 180 and 720 days of age. (**A-D**) Analysis of spontaneous lomotor activity in the open-field, with total exploration times for females (A) and males (B), and numbers of rearings for females (C) and males (D). (**E,F**) Memory retrieval scores in the multiple-T maze, as shown by escape latency, with females' scores (E) and males' scores (F). Data are reported as means ± s.d. and were obtained from 15 individuals per experimental group, except at 720days. **P<0.01, n.s. = not significant (P=0.08). (**G**) Significant correlation obtained at 720 days between cytochrome oxidase (CO) activity in the dentate gyrus and the functional scores in the multiple T-maze reflected by escape latencies for males (black), females (white), previously exposed (circles) or not (squares) to hypoxia.

Figure 5: Effects of early hypoxia on brain histological characteristics in 720-day-old male rats. (**A-C**) Layer thicknesses (μm), illustration in the hippocampal CA1 layer after thionin tissue coloration, and cell densities per 10 000 μm^2 in various brain structures, n=5, **P*<0.05, ***P*<0.01. (**D-H**) Numbers of glutamatergic (VGluT2-positive) cells and of GABAergic (GAD65-positve) cells in various brain areas of control and hypoxic male rats (PF = prefrontal, F = frontal, DG = dentate gyrus), n=5, **P*<0.05, ***P*<0.01.

Figure 6: Decreased brain apoptosis and neuroinflammation in 720-day-old male rats early exposed to transient hypoxia. (**A**) Apoptotic cells in various key brain areas analyzed by means of the Apostain F7-26 specific monoclonal antibody against single-stranded DNA. Data are expressed as number of positive cells per 10 000 μm^2 (means ± s.d.) and were obtained from 3 individuals in each group. Statistically significant differences between control and hypoxia groups: **P*<0.05, ***P*<0.01. (**B**) Illustration in the prefrontal (PF) cortex. (**C**) DAP kinase mRNA levels in various brain structures, with a significant decrease in the neurogenic subventricular zone (***P*<0.01). (**D**) Noticeable hypoxia-associated decreased neuroinflammation in the CA1 layer and in the prefrontal cortex in male rats belonging to the hypoxia group, as shown by the use of Ox-6 antibody (cells were counterstained by DAPI and the neuronal marker NF68).

Figure 7: Effects of early hypoxia on synapsin-related synaptic function and plasticity in 720-day-old male rats. (**A,B**) Synapsins I and II mRNA levels in various brain structures in control and hypoxia groups (n=3, **P*<0.05, ***P*<0.01). (**C**) Western blot analysis of synapsins and related proteins in frontal cortex and hippocampus. (**D**) Immunohistological detection of phospho-synapsins (Ser^9) in the CA1 layer and the dentate gyrus (cells were counterstained with DAPI and NeuN). (**E-H**) *In situ* coupling between synapsins with phospho-Ser^9 and

phospho-Tyr^{301}, as monitored by the Duolink® "proximity ligation" assay: number of dots per cell in CA1 and frontal cortex of 720-day-old control and hypoxic male rats. Experiments were performed in triplicate (*P<0.05, **P<0.01).

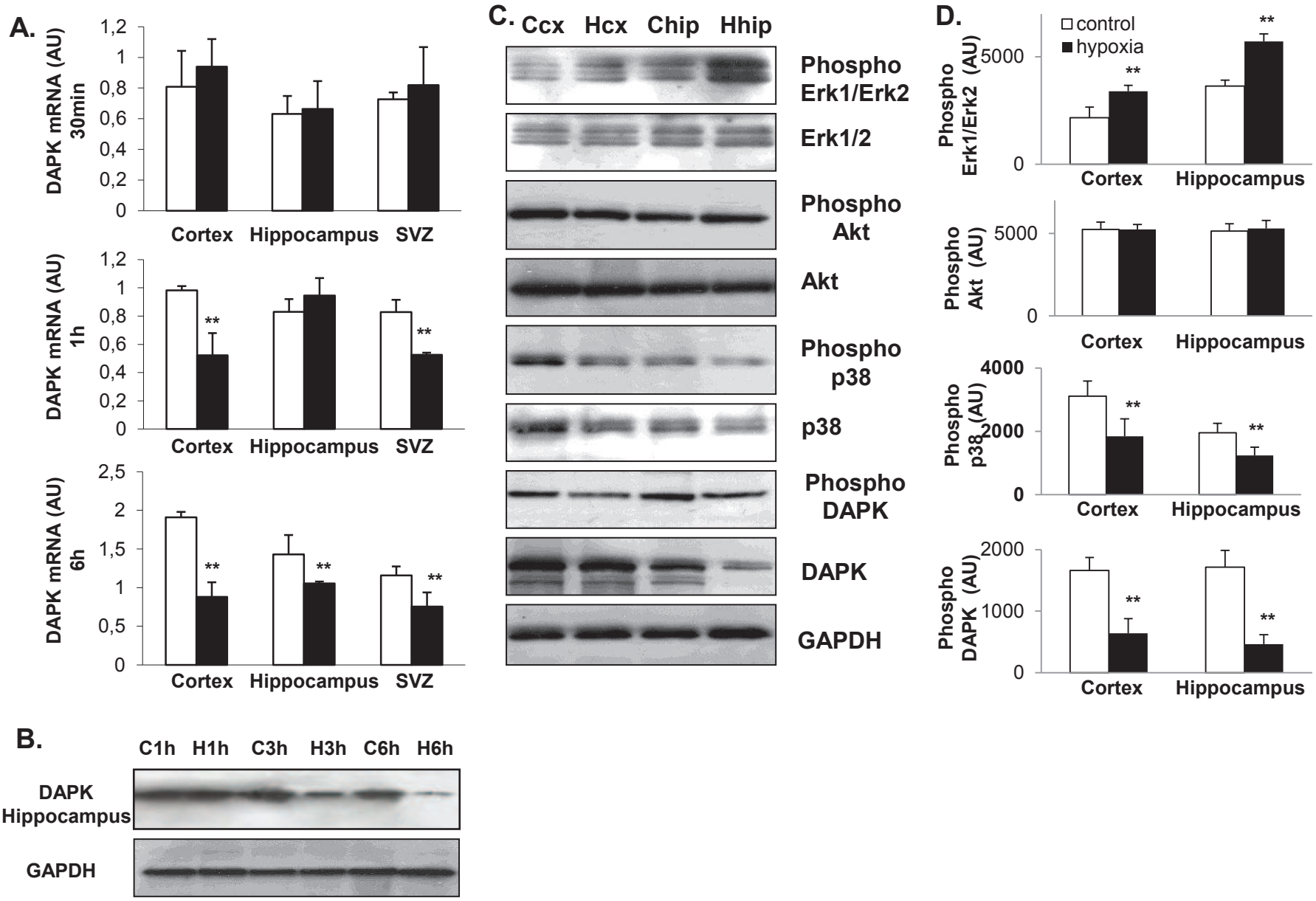

A.
DAPK mRNA (AU) 30min
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
Cortex
Hippocampus
SVZ
DAPK mRNA (AU) 1h
**
DAPK mRNA (AU) 6h
2,5
2
1,5
0,5
B.
C1h
H1h
C3h
H3h
C6h
H6h
DAPK Hippocampus
GAPDH
C.
Ccx
Hcx
Chip
Hhip
Phospho Erk1/Erk2
Erk1/2
Phospho Akt
Akt
Phospho p38
p38
Phospho DAPK
DAPK
GAPDH
D.
control
hypoxia
Phospho Erk1/Erk2 (AU)
5000
Phospho Akt (AU)
Phospho p38 (AU)
4000
2000
Phospho DAPK (AU)
1000

Fig1

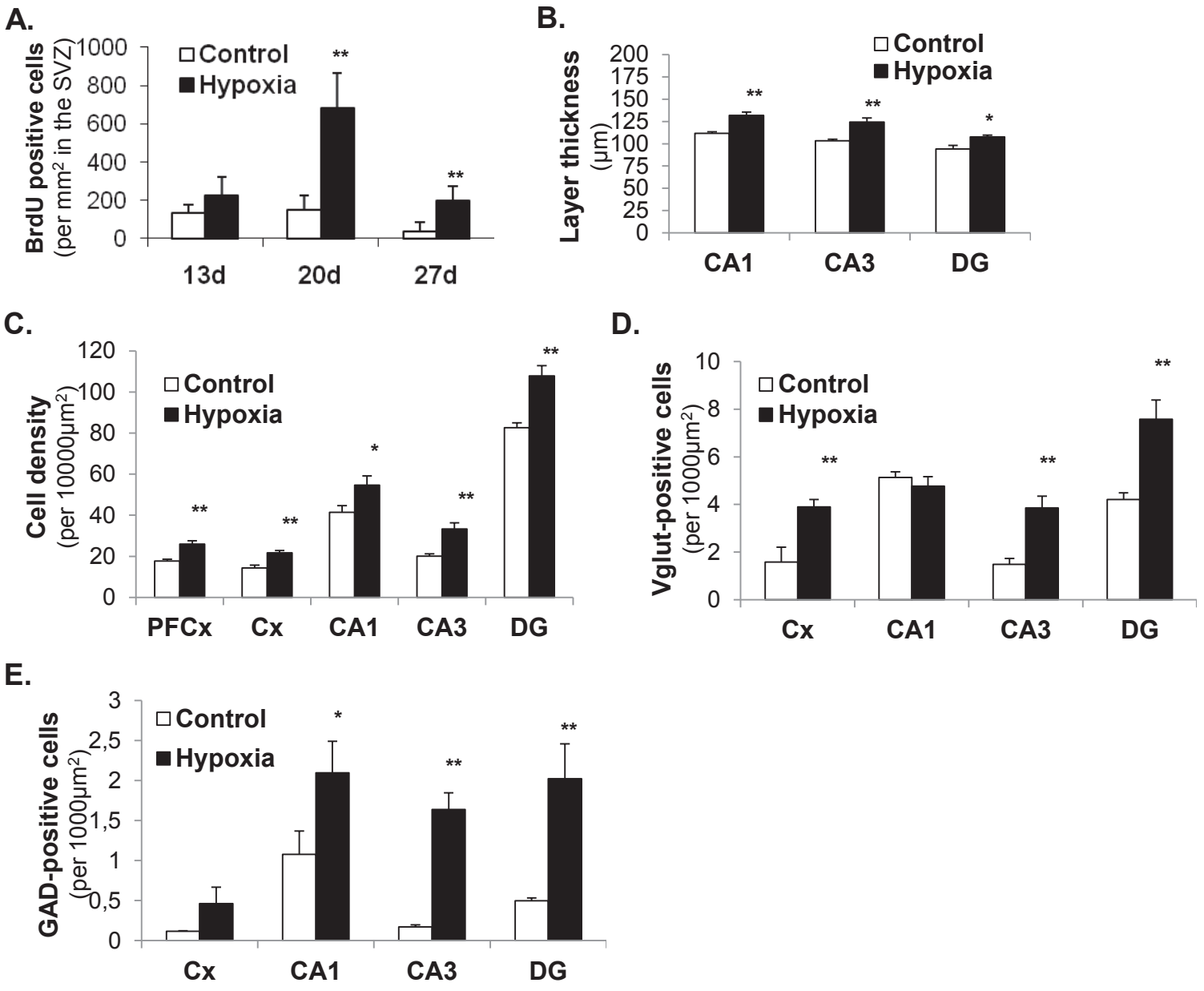


Fig 2 (21 jours)

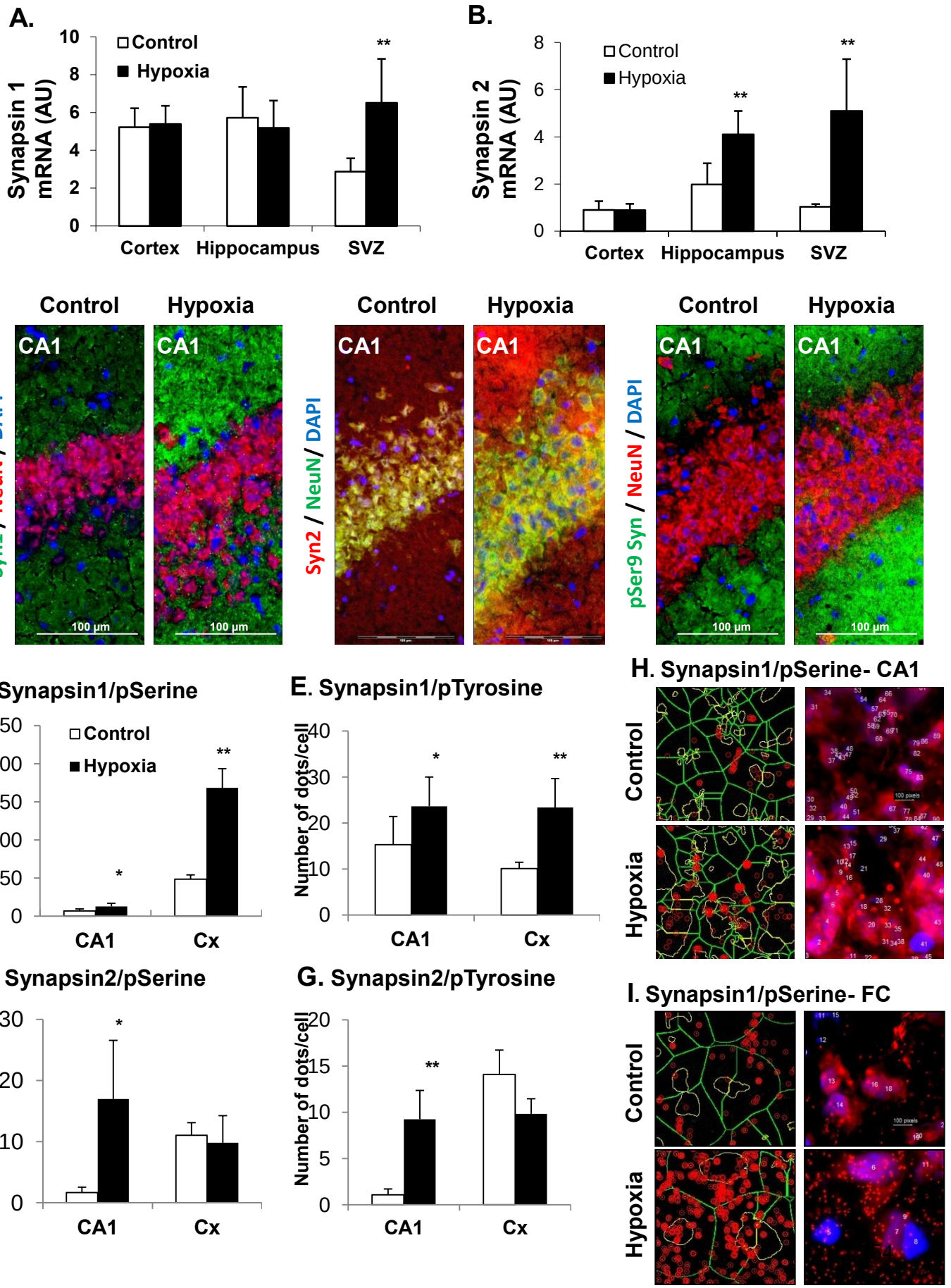


Fig3 (21 jours)

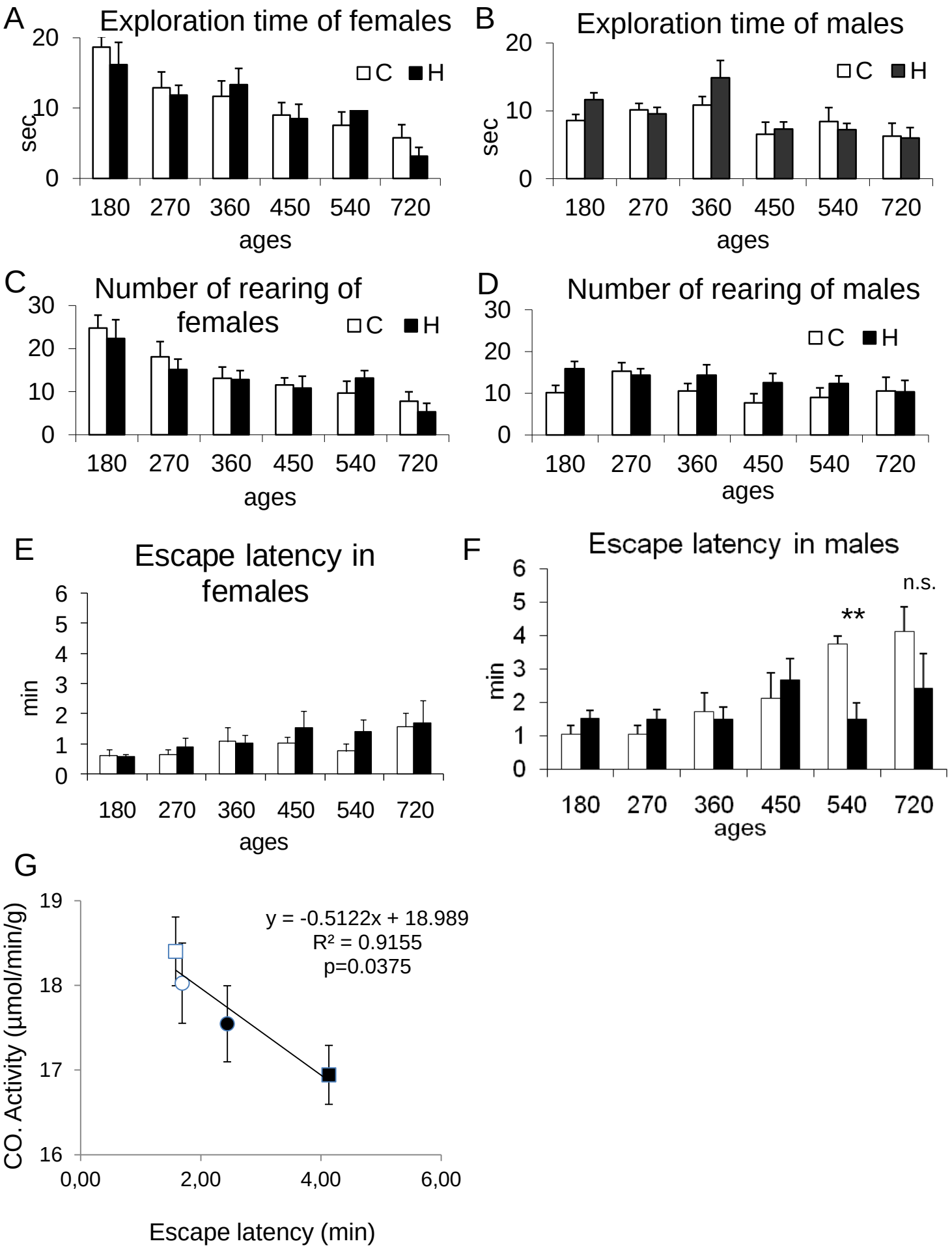

A
Exploration time of females
sec
20
10
0
C
H
180
270
360
450
540
720
ages
B
Exploration time of males
sec
20
10
0
C
H
180
270
360
450
540
720
ages
C
Number of rearing of females
30
20
10
0
C
H
180
270
360
450
540
720
ages
D
Number of rearing of males
30
20
10
0
C
H
180
270
360
450
540
720
ages
E
Escape latency in females
min
6
5
4
3
2
1
0
180
270
360
450
540
720
ages
F
Escape latency in males
min
6
5
4
3
2
1
0
n.s.
**
180
270
360
450
540
720
ages
G
CO. Activity (µmol/min/g)
19
18
17
16
y = -0.5122x + 18.989
R² = 0.9155
p=0.0375
0,00
2,00
4,00
6,00
Escape latency (min)

Fig 4

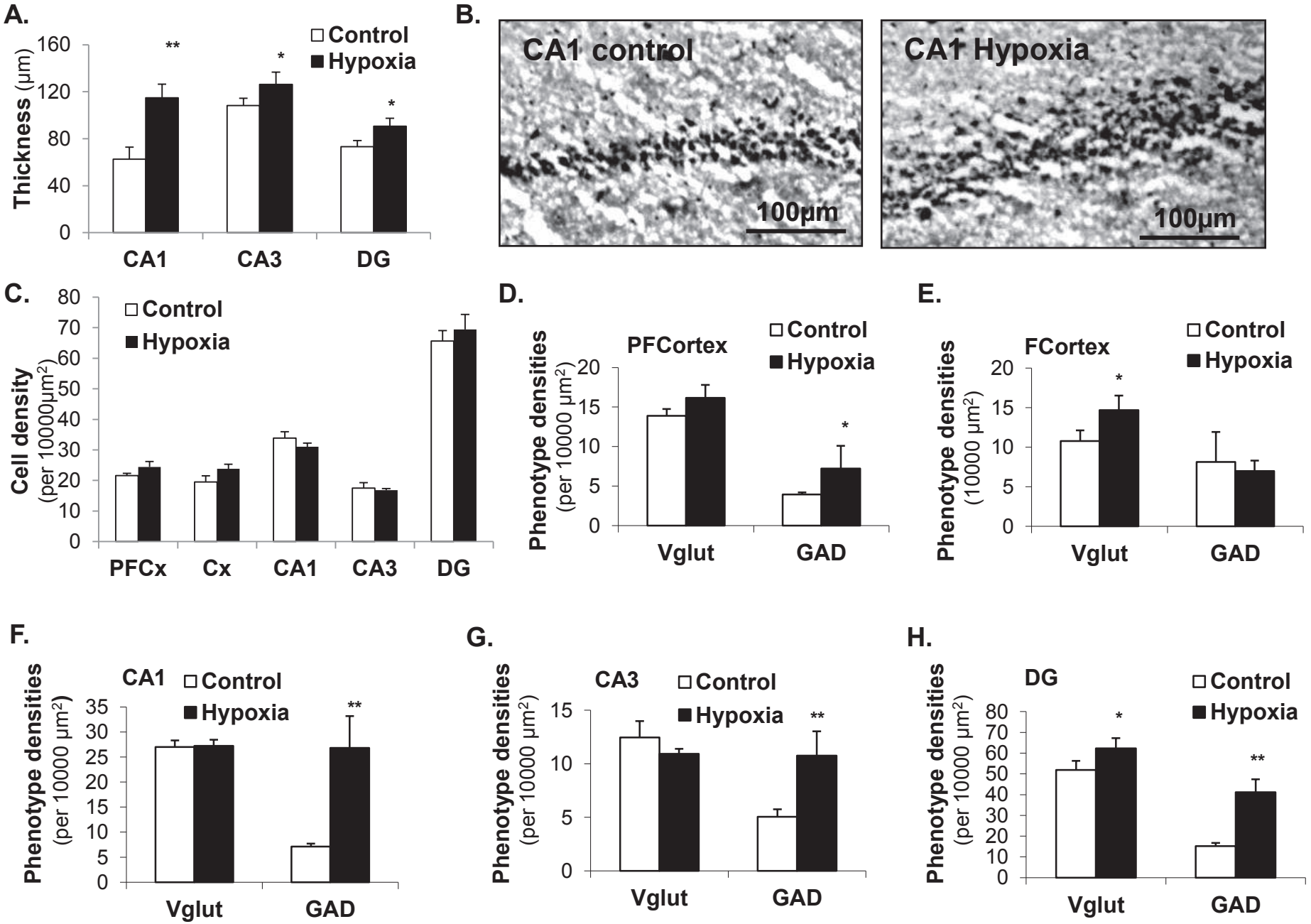

A.
Thickness (µm)
160
120
80
40
0
Control
Hypoxia
**
*
*
CA1
CA3
DG
B.
CA1 control
100µm
CA1 Hypoxia
100µm
C.
Cell density
(per 10000µm²)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Hypoxia
PFCx
Cx
CA1
CA3
DG
D.
PFCortex
Phenotype densities
(per 10000 µm²)
20
15
10
5
0
Control
Hypoxia
*
Vglut
GAD
E.
FCortex
Phenotype densities
(10000 µm²)
20
15
10
5
0
Control
Hypoxia
*
Vglut
GAD
F.
CA1
Phenotype densities
(per 10000 µm²)
35
30
25
20
15
10
5
0
Control
Hypoxia
**
Vglut
GAD
G.
CA3
Phenotype densities
(per 10000 µm²)
15
10
5
0
Control
Hypoxia
**
Vglut
GAD
H.
DG
Phenotype densities
(per 10000 µm²)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Hypoxia
*
**
Vglut
GAD

Fig5 (2ans)

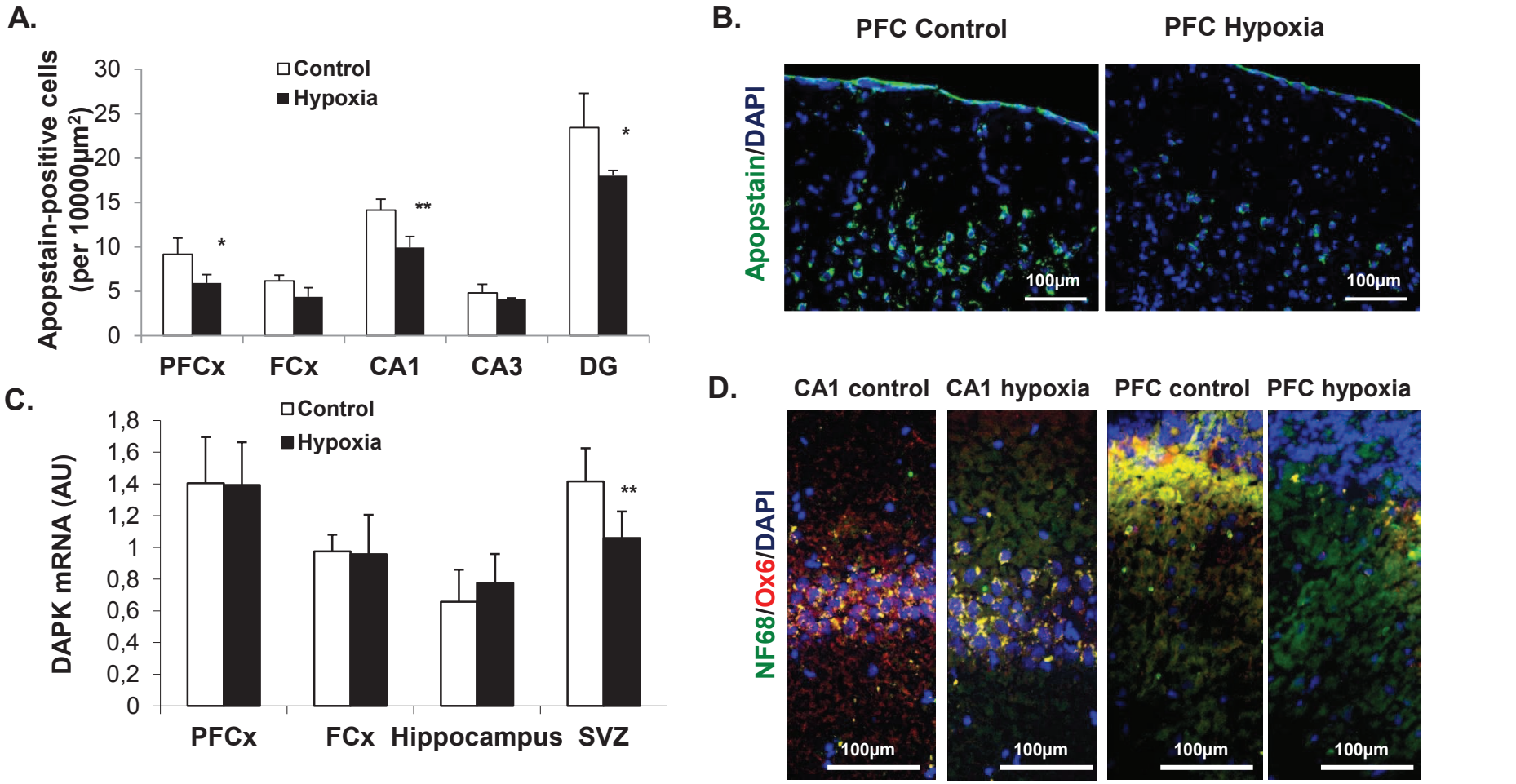

A.
Apopstain-positive cells (per 10000µm²)
Control
Hypoxia
30
25
20
15
10
5
0
*
**
*
PFCx
FCx
CA1
CA3
DG
B.
PFC Control
PFC Hypoxia
Apopstain/DAPI
100µm
100µm
C.
DAPK mRNA (AU)
Control
Hypoxia
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
**
PFCx
FCx
Hippocampus
SVZ
D.
CA1 control
CA1 hypoxia
PFC control
PFC hypoxia
NF68/Ox6/DAPI
100µm
100µm
100µm
100µm

Fig6 (2ans)

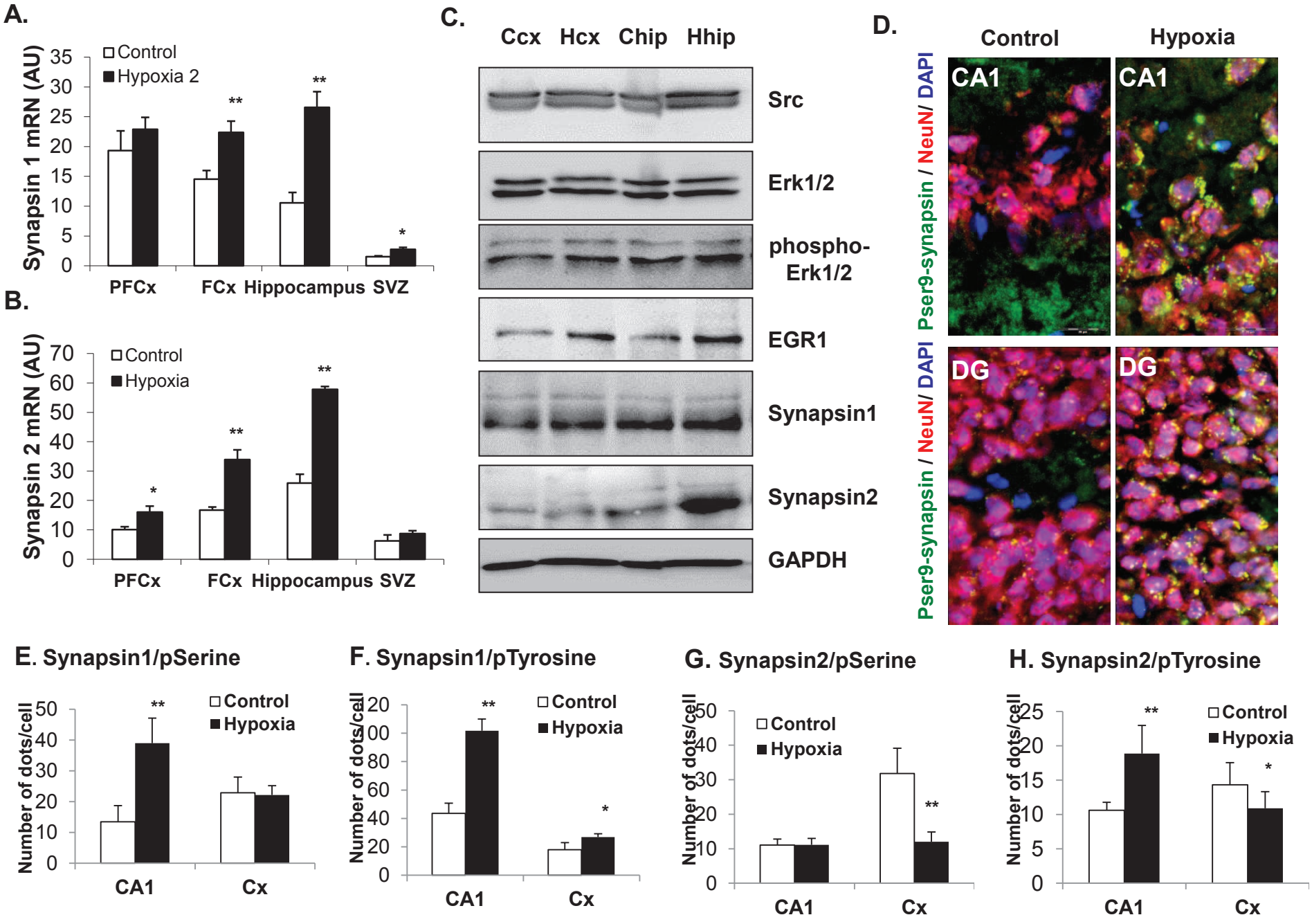

A.
Synapsin 1 mRN (AU)
Control
Hypoxia 2
PFCx
FCx
Hippocampus
SVZ
B.
Synapsin 2 mRN (AU)
Control
Hypoxia
C.
Ccx
Hcx
Chip
Hhip
Src
Erk1/2
phospho-Erk1/2
EGR1
Synapsin1
Synapsin2
GAPDH
D.
Control
Hypoxia
CA1
DG
Pser9-synapsin / NeuN/ DAPI
E. Synapsin1/pSerine
F. Synapsin1/pTyrosine
G. Synapsin2/pSerine
H. Synapsin2/pTyrosine
Number of dots/cell
CA1
Cx

Fig7 (2ans)

Table 1: Effects of 5-min neonatal hypoxia on cytochrome oxidase activity in various brain structures involved in cognitive functions.

	Day 720			
	Females		**Males**	
	Controls	Hypoxia	Controls	Hypoxia
CA1 layer	16.90 ± 1.11	17.40 ± 0.38	16.85 ± 0.45	16.95 ± 0.72
CA3 layer*	16.90 ± 0.80	16.65 ± 0.62	15.60 ± 0.70	15.82 ± 0.61
Dentate gyrus*	18.41 ± 0.41	18.00 ± 0.47	16.94 ± 0.35	17.55 ± 0.45
Frontal cortex	16.75 ± 0.55	16.90 ± 0.52	15.92 ± 0.49	16.22 ±0.63
Prefrontal cortex	17.50 ± 0.51	16.88 ± 0.70	16.82 ±0.90	15.80 ± 0.52

Cytochrome oxidase activity – reflecting overall metabolic activity – was quantified by histochemistry on sagittal brain sections. Data are expressed as μmol/min per g of tissue (means ± SEM) and were obtained from 3 to 4 individuals in each group. *Sex effect, $P < 0.05$ (ANOVA).

SYNTHESE DE LA PUBLICATION 4

Le protocole expérimental a consisté à placer les ratons dans les 24 heures suivant leur naissance dans une chambre en plexiglas thermostatée dont l'air est saturé en azote pendant 5 minutes. En parallèle, les animaux témoins étaient maintenus en normoxie. Le degré d'hypoxie a été évalué par une mesure des gaz du sang. Les rats ont été sacrifiés à différents stades : 30 minutes, 1 heure, 6 heures post-hypoxie puis à 21 jours postnatals et 2 ans (720 jours). Les rats ont été suivis par une série de tests comportementaux tout au long de leur vie. Les mécanismes engagés dans la tolérance cérébrale à l'issue du « conditionnement hypoxique » se mettent en place très précocement. Nous nous sommes intéressés à deux processus cellulaires fondamentaux : la balance entre survie et apoptose et la prolifération cellulaire. Alors que la voie de survie AKT ne semble pas être affectée, il a été montré une diminution progressive de l'expression transcriptionnel et protéique de la DAP kinase, impliquée dans l'apoptose physiologique au cours du développement cérébral, ainsi qu'une diminution de sa phosphorylation, essentiellement à 6 heures post-hypoxie. La diminution de l'expression de la protéine phosphorylée p38 confirme une limitation de la mort cellulaire. Pour étudier la prolifération, les animaux ont reçu une injection aiguë de BrdU à différents stades post-hypoxie. Les résultats confirment une augmentation du nombre de cellules positives au BrdU qui est maximale à 20 jours post-hypoxie dans la zone subventriculaire (ZSV). Comme dans les travaux précédents (*Pourié et al., 2006*), l'observation histopathologique de l'hippocampe révèle que la densité cellulaire et l'épaisseur de certaines aires hippocampiques sont plus importantes chez les animaux hypoxiques à 21 jours. La voie ERK1/2 serait impliquée dans les processus de survie cellulaire et de neurogenèse car il a été observé une augmentation de la phosphorylation des protéines p42 et p44 au niveau de l'hippocampe et du cortex quelques heures après l'hypoxie. Le conditionnement hypoxique a été associé à une réorganisation phénotypique neuronale précoce illustrée notamment par un accroissement du nombre de cellules glutamatergiques (positives au VGluT2) et GABAergiques (positives au GAD65) dans les différentes structures de l'hippocampe et le cortex frontal. La neuroplasticité a été également stimulée par l'hypoxie car les données concernant les synapsines I et II mettent en évidence une augmentation de leur expression et de leur activation par phosphorylation, suggérant une meilleure fonctionnalité synaptique chez les animaux exposés à l'hypoxie.

Sur le plan fonctionnel à long terme, des tests de mémorisation hippocampo-dépendante dans le labyrinthe multi-T ont montré qu'à partir de 540 jours, les rats mâles du groupe « hypoxie » réalisent de meilleurs scores que les témoins, ce qui semblerait traduire des manifestations moindres du vieillissement cérébral. En effet, à ce stade, ces animaux s'écartent des scores des mâles témoins qui se dégradent avec l'apparition de la sénescence pour rejoindre les scores des femelles qui sont moins affectées par le vieillissement que les mâles. Nous nous sommes alors concentrés sur l'étude des individus mâles. L'étude tardive à 720 jours portant sur la macrostructure de l'hippocampe ne montre pas de différence au niveau de la densité cellulaire mais on retrouve une épaisseur de la couche CA1 plus importante chez les mâles préalablement exposés à l'hypoxie, suggérant qu'à long terme, ces animaux conserveraient une meilleure macrostructure de leur hippocampe que les témoins du même âge. De plus, il a

été observé une diminution du nombre de cellules apoptotiques au niveau de la zone CA1, du gyrus denté et du cortex préfrontal des animaux précédemment soumis à l'hypoxie. Ceci était accompagné d'une réduction de la transcription de la DAP kinase dans la zone germinative qu'est la ZSV. Par ailleurs, le marqueur d'inflammation Ox-6 est beaucoup moins présent dans les cerveaux préconditionnés, suggérant une fois de plus qu'une structure cérébrale qui maintient un bon statut tissulaire et fonctionnel est moins sensible à des évènements générateurs de stress cellulaire et/ou d'inflammation potentiellement délétères avec l'âge. Comme à l'âge de 21 jours, les synapsines I et II sont davantage exprimées (ARNm et protéine) et présentent une plus grande fonctionnalité, chez les mâles âgés du groupe « hypoxie », mise en évidence par l'augmentation de leur phosphorylation via l'expression des kinases ERK 1/2 et Src qui induisent cette modification post-traductionnelle respectivement sur Ser9 et Tyr301. Une meilleure conservation du trafic vésiculaire synaptique semble être ainsi préservée chez les rats mâles âgés exposés à l'hypoxie néonatale.

En conclusion, nous avons montré dans cette étude qu'à court terme, l'hypoxie néonatale brève générait deux réactions : une diminution de l'apoptose physiologique liée à la DAPKinase et une neurogenèse qui présente un pic à 3 semaines post-hypoxie et qui est associée à un gain cellulaire et fonctionnel chez les animaux. Ceci semble se maintenir à long terme, avec une préservation notable au cours du vieillissement chez les individus mâles. Notre hypothèse est que la structure, la densité cellulaire et la plasticité fonctionnelle synaptique de zones cérébrales spécifiques, en particulier dans l'hippocampe, seraient mieux préservées suite aux signaux délivrés par l'hypoxie, permettant de demeurer au-dessus d'un seuil minimum de fonctionnement optimal et procurer ainsi une meilleure résistance au vieillissement cérébral , avec un maintien plus important des capacités cognitives.

Après avoir caractérisé d'une part les effets délétères d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles et, d'autre part, les effets bénéfiques d'une hypoxie néonatale brève, notre objectif a été d'utiliser conjointement les deux stimuli. Ainsi, deux questions principales nous intéressaient : (i) le cerveau des individus carencés conserve-t-il des propriétés de plasticité/adaptation à long terme et (ii) les effets bénéfiques de la stimulation de la neurogenèse endogène sont-ils capables de compenser les effets délétères de la carence ?

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'hippocampe dont la sensibilité à la fois à l'hypoxie et aux effets neurotoxiques de l'homocystéine est documentée. Or, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur une carence gestationnelle et ses conséquences sur le vieillissement.

Résultats III Programmation fœtale et vieillissement cérébrale

CINQUIEME PARTIE **: Programmation fœtale et vieillissement cérébral : influences conjuguées d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles et d'un conditionnement hypoxique périnatal**

Nicolas Martin, Grégory Pourié, Carine Bossenmeyer-Pourié, Jean-Louis Guéant, Jean-Luc Daval

INTRODUCTION

L'alimentation de la mère est un facteur critique pour un bon développement embryonnaire et fœtal, tout comme l'allaitement et la qualité du lait maternel influent sur la santé du nourrisson (*Belkacemi et al., 2010 ; Lutter et Chaparro, 2009*). Une sous-nutrition chez la femme enceinte ou allaitante entraîne des modifications du « programme fœtal » (*Barker, 1992*) pouvant être à l'origine de diverses pathologies (métabolique, neurologique, cardiovasculaire, cancer…) survenant à l'âge adulte (*Barker, 2004 ; Nuyt et Alexander, 2009 ; Bruce et Hanson, 2010*). Les carences en folates et en vitamine B12 sont relativement fréquentes pendant la grossesse (Hure et al., 2011). D'origine alimentaire et/ou génétique, ces types de carence ont été identifiés comme facteur de risque dans diverses pathologies, notamment neurologiques et psychiatriques, à tous les stades de la vie (*Seshadri et al., 2002 ; Kronenberg et al., 2009 ; Candido et al., 2008 ; Carter et al.,2011*). Plus particulièrement au niveau cérébral, une carence en folates et/ou vitamine B12 a été associée à une atrophie hippocampique en lien avec des perturbations cognitives (*Blaise et al., 2007 ; Daval et al., 2009*) et un déséquilibre entre prolifération cellulaire et différentiation neuronale (*Battaglia-Hsu et al.,2009 ; Akchiche et al., article soumis*). De nombreux travaux ont associé une carence en donneurs de méthyles avec une accélération du déclin cognitif et des perturbations du vieillissement cérébral (*Mattson et al., 2002 ; Miller, 2006 ; Clarke, 2006 ; Malouf et al., 2008*). Toutefois, les mécanismes impliqués dans les effets à long terme d'une carence gestationnelle en folate et vitamine B12 demeurent méconnus.

Dans un autre contexte, il a été démontré que l'exposition périnatale à une hypoxie courte (5 minutes) chez le rat entraînait une tolérance cérébrale associée à une stimulation de la neurogenèse. La prise en considération dans une étude récente de ces deux aspects, carence nutritionnelle et conditionnement hypoxique, a montré que la stimulation de la neurogenèse par l'hypoxie avait pour conséquence d'atténuer les effets délétères cérébraux de la carence à court terme (*Blaise et al., 2008*).

Dans la présente étude, nous avons souhaité évaluer si le conditionnement cérébral par l'hypoxie pouvait atténuer ou au contraire potentialiser les effets d'une carence précoce au cours du vieillissement chez le rat.

MATERIELS ET METHODES

Traitement des animaux

Les animaux ont été traités en accord avec les recommandations décrites dans le *« Guide for the care and use of laboratory animals »* (NIH, MD, 1985) et hébergés dans un établissement agréé selon les directives européennes N86/609/CEE. Les rats adultes (Wistar Han IGS, Charles River, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) ont été maintenus en conditions d'élevage standard, avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12 h, et la mise à disposition d'eau et de nourriture *ad libitum*. Un mois avant la mise en accouplement, les rats femelles ont été alimentés soit avec une nourriture normale (Rats souris élevage, SAFE, Augy, France) contenant vitamine B12 (0,04 mg/kg), folates (0,9 mg/kg) et choline (2100 mg/kg), soit avec une nourriture carencée en vitamines B12 (0 µg/kg), folates (0,01mg/kg) et choline (0,06mg/kg) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Les rats mâles ont été alimentés uniquement avec la nourriture normale. La carence maternelle en donneurs de méthyles a été poursuivie pendant toute la gestation (21 jours). Dans les 24 heures après la délivrance, la portée a été réduite à dix individus pour la standardisation de l'étude. La moitié des nouveau-nés a été placée pendant 5 minutes dans une chambre en plexiglas thermostatée à 36°C et saturée en azote. La seconde moitié des nouveau-nés, considérés comme témoins, a été maintenue en conditions de normoxie (21 % d'oxygène et 79 % d'azote) pendant le même temps. L'ensemble de la portée a ensuite été placé pendant 20 minutes en normoxie sur couverture chauffante à 36°C puis rendu à la mère. Pour les animaux concernés, la carence a été maintenue jusqu'au moment du sevrage (21 jours postnatals) au travers de l'allaitement maternel. Au-delà, une alimentation standard a été fournie aux animaux jusqu'à leur sacrifice. Au regard de ces traitements (régime et hypoxie), 3 groupes ont été définis : le groupe « témoin » (T) n'ayant pas subi d'hypoxie et dont la mère a reçu une nourriture standard; le groupe « carencé » (C) qui n'a pas subi d'hypoxie et dont la mère a reçu une nourriture carencée ; le groupe « carencé avec hypoxie » (CH) associant la carence et l'hypoxie.

Prélèvements des échantillons

Les portées ont été sacrifiées par un excès d'isoflurane (Belamont, Neuilly-sur-Seine, France) à l'âge de 21 et 450 jours pour les groupes témoin, carencé et carencé-hypoxie. Ces âges ont été choisis pour observer les effets précoces et les effets tardifs sur le vieillissement d'une carence en donneurs de méthyles associée ou non à une hypoxie néonatale. Au préalable, un prélèvement sanguin intracardiaque a été réalisé pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine. Afin d'obtenir une cinétique de dosage plasmatique de ces paramètres biochimiques au cours du vieillissement, des prélèvements sanguins à la queue ont été effectués à 205 et 330 jours, sur les animaux destinés à être sacrifiés à 450 jours. Au moment du sacrifice, le cerveau a été rapidement prélevé et sectionné dans selon l'axe sagittal en deux hémisphères. Le demi-cerveau destiné aux protocoles d'immunofluorescence et de colorations histologiques a été plongé dans une solution de méthylbutane (Sigma-Aldrich) refroidi à -30°C, avant d'être stocké au congélateur à -80°C. Les fragments de l'autre demi-cerveau après dissections régionales (hippocampe,

cortex, cervelet), destinés aux analyses biochimiques et de biologie moléculaire, ont été congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

Détermination des concentrations en homocystéine et en vitamines

Les concentrations plasmatiques en vitamine B12 et folate ont été déterminées par un dosage radio-immunologique (simulTRAC-SNB, ICN, Costa Mesa, USA). La concentration d'homocystéine a été mesurée par la technique de chromatographie liquide à haute performance (Waters, St Quentin, France) couplée à la spectrométrie de masse (Api 4000 Qtrap Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), comme précédemment décrit (*Battaglia-Hsu et al., 2009*).

Histochimie

Toutes les observations ont été effectuées sur des coupes sagittales de 16 µm générées par cryostat et montées sur des lames en verre comme décrit par Daval *et al.* (2004). L'examen histologique global a été réalisé sur des coupes de cerveau marquées à la thionine (5g/L, Sigma-Aldrich) en présence d'acétate de sodium 0,2N et d'acide acétique 0,2N. Les lames ont été ensuite plongées dans l'éthanol à concentrations croissantes (70 à 100%) afin de déshydrater les tissus. Les coupes ont été observées au grossissement x20 à l'aide d'un microscope (BX51WI; Olympus, Japon) couplé à une caméra digitale et au logiciel Cell F (Soft Imaging System, Olympus) qui permet de mesurer des épaisseurs et densités de couches cellulaires selon une calibration grossissement-mesure (en µm).

Immunofluorescence

Les tissus cérébraux fixés au paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich) ont été bloqués dans une solution PBS-BSA 1% et incubés de 24 à 48 heures avec un anticorps primaire dirigé contre les protéines suivantes : cystathionine β-synthase (souris, monoclonal, dilution 1/300, Abnova,Tapei, Taiwan), méthionine synthase (lapin, polyclonal, 1/200, Abcam, Paris, France) ; NeuN (souris, monoclonal, 1/200, Millipore, Guyancourt, France) ; Neurofilament 68 (lapin, polyclonal, 1/200, USBiological, MA, USA) ; PSD-95 (lapin, polyclonal, 1/200, Abcam) ; Synaptotagmine I (lumenal domain, clone 604.2, souris, monoclonal, 1/200, Synaptic Systems, Göttingen, Allemagne) ; Synapsine I (lapin, polyclonal, 1/200, Calbiochem, VWR International, SAS, Fontenay-sous-bois, France), Synapsine II (lapin, polyclonal, 1/200, Abcam), récepteur aux oestrogènes alpha (lapin, polyclonal , 1/200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) ;Caspase 3 clivée (lapin, monoclonal, 1/200, Cell Signaling Technology, MA, USA) ; Homocystéine (lapin, polyclonal, 1/200, Millipore) ; GAD65/67 (lapin, polyclonal, 1/100, Millipore) ;Tyrosine Hydroxylase (lapin, polyclonal, 1/100, Millipore). Après plusieurs étapes de lavage, l'immunoréactivité a été révélée par incubation en présence d'un anticorps secondaire anti-IgG conjugué à un Alexafluor pendant 1 heure à température ambiante (1/2000, Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France). Toutes les coupes ont été contre-colorées avec un colorant nucléaire, le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) (1 mg/ml, Sigma-Aldrich). Des marquages de contrôle ont été réalisés en parallèle en absence de l'anticorps primaire. L'immunofluorescence a été observée avec le microscope

BX51WI (Olympus) et analysée avec le logiciel Cell F (Soft Imaging System, Olympus). Ces marquages ont été utilisés soit pour des illustrations qualitatives soit pour des mesures quantitatives en termes de densité rapportée pour 10 000 µm².

Test comportementaux

Les conséquences neurocomportementales des traitements ont été évaluées en utilisant des tests standards afin d'évaluer les capacités musculaires, psychomotrices, d'apprentissage et de mémorisation.

Test de suspension

Ce test a été effectué sur 35 animaux pour chaque groupe expérimental**.** Les performances motrices ont été évaluées en mesurant le temps de suspension à 10, 14, 19, 20, 21 jours post-natals. Les ratons ont été suspendus par leurs pattes avant à une tige métallique (1 mm de diamètre) tendue entre les deux cotés d'un cadre à environ 20 cm au-dessus d'une table. Une plaque de plexiglas a été positionnée au-dessus de la tige pour empêcher les ratons de tourner autour d'elle et une aire d'accueil en coton a été placée sous le dispositif en cas de chute. Le temps pendant lequel l'animal demeure en suspension a été enregistré chaque jour de test.

Labyrinthe multi-T

Ce test a été effectué sur 15 animaux de chaque sexe et groupe expérimental. Afin d'évaluer leurs capacités d'apprentissage, les rats ont été soumis au test du labyrinthe multi-T. Le dispositif est un labyrinthe constitué par l'assemblage successif de 4 modules en T identiques présentant chacun un couloir de 9 cm de large et 35 cm de hauteur et dont la longueur de la barre « verticale du T » est de 46 cm et de la « barre horizontale du T » est de 60 cm. Pour cette phase du test, les animaux sont mis à jeun 24 heures avant le début du test et passent dans le labyrinthe 1 fois par jour et cela pendant 5 jours consécutifs entre le 45 ^{ème} et le 49 ^{ème} jour post-natal. Cette fenêtre temporelle a été volontairement choisie après le sevrage (21 jours) pour ne pas faire coïncider ce test avec le pic de neurogenèse post-hypoxie que nous avions observé à 20 jours. Le but de ce décalage expérimental était de se positionner après la période de maturation de ces nouveaux neurones. Après chaque passage des animaux, leur motivation est renforcée, en leur permettant de manger un bouchon de nourriture dans la zone d'arrivée du labyrinthe. Les couloirs du labyrinthe sont nettoyés à l'alcool 70% entre chaque rat. Ont été enregistrés le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière ») et la latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée). Par la suite, un test de mémoire a été réalisé, par un seul passage dans le même dispositif, chaque mois (30 jours entre chaque essai) jusqu'au début de la période vieillissement (330 jours post-natal) afin de comparer la rétention et la réutilisation de la capacité spatiale entre les différents groupes. Ce sont toujours le nombre d'erreurs et la latence de sortie du labyrinthe qui ont été enregistrés.

Test de l'évitement passif

Afin de savoir si les rats étaient capables d'apprendre une nouvelle tâche au cours du vieillissement, ils ont été soumis au test de l'évitement passif entre 360 et 450 jours post-natals. Le dispositif de l'évitement passif est une boîte divisée en 2 compartiments de taille égale avec un compartiment éclairé (lampe de 25W) et l'autre dans l'obscurité. Une grille connectée à un générateur de choc électrique recouvre la totalité du sol de la boîte. L'apprentissage se fait sur 3 jours consécutifs et les rats sont toujours placés lors du début des essais dans le compartiment lumineux. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 70% entre chaque individu. La durée des essais est limitée à 2 minutes.

Au premier jour de la phase d'apprentissage, les rats ont la liberté de visiter les compartiments sans la moindre conséquence. Les paramètres mesurés sont la latence de la première entrée dans le côté sombre et le temps total passé dans ce même compartiment qui a spontanément la préférence des rats. Au deuxième jour, la même procédure est répétée, mais les rats reçoivent une série de chocs électriques (cadence = toutes les secondes, 0,13 mA) lors de leur présence dans le compartiment sombre (corps entier de l'animal dans le compartiment, queue comprise). Le temps passé dans le compartiment sombre après la survenue de la première stimulation électrique a été enregistré. Au troisième jour, les rats sont placés dans le côté éclairé, et reçoivent des chocs électriques s'ils entrent dans le compartiment sombre, les incitants à retourner dans compartiment éclairé. Il a été enregistré le temps passé dans le compartiment lumineux et le nombre de retours dans le compartiment sombre. Par la suite, un test de mémoire a été réalisé plusieurs jours après l'apprentissage (30jours entre chaque essai) jusqu'à la date du sacrifice (450 jours post-natals) afin de comparer la rétention et la réutilisation de la mémoire associative entre les différents groupes. Ce sont toujours le temps passé dans le compartiment lumineux et le nombre de retour dans le compartiment sombre qui sont enregistrés. Moins de temps passé dans le compartiment lumineux est important et plus le nombre de retours dans le compartiment sombre est élevé, plus les capacités de mémorisation sont mauvaises.

Test de l'openfield

Une des méthodes les plus traditionnelles et largement utilisée pour l'évaluation du comportement locomoteur, exploratoire, ainsi que l'état émotionnel chez le rongeur est l'openfield (*Tobach, 1966*). Le dispositif se compose d'une arène circulaire de 1 m de diamètre et dont la hauteur des murs est de 35 cm. Le sol est constitué d'une plaque en verre sur laquelle a été dessiné au milieu un cercle dit central de 50 cm laissant apparaitre entre ce cercle et les murs du dispositif un deuxième cercle dit périphérique de 100 cm. Plusieurs lignes radiales traversent les deux zones divisant la surface de l'arène en 8 quartiers centraux et 8 quartiers périphériques. Tous les animaux sont délicatement placés au milieu du dispositif pour l'explorer librement pendant 2 minutes. Ce test a été effectué une seule fois le jour précédant le sacrifice à 450 jours. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 70% entre chaque rat. Il a été enregistré le nombre de quartiers périphériques et centraux visités ainsi que le nombre de redressement.

Analyses statistiques

Les données ont été recueillies et analysées avec le logiciel Statview 5 (SAS Institute, Berkeley, CA). Rapportées à la moyenne ± déviation standard, les données brutes ont été comparées en utilisant une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) avec le test de Fisher. Une valeur p inférieure ou égale à 0.05 a été considérée comme significativité statistique.

RESULTATS

I. Effets précoces d'une carence en donneurs de méthyles sur les marqueurs biochimiques circulants et sur le fonctionnement hippocampique

La carence affecte les concentrations plasmatiques en vitamine B12, B9 et homocystéine ainsi que les enzymes-clés du métabolisme des monocarbones

Les taux plasmatiques de vitamine B12 et folates sont significativement diminués, alors que les taux d'homocystéine sont significativement augmentés à 21 jours chez les ratons ayant reçu le régime carencé quel que soit le sexe (**Figure 1**). De même, le ratio SAM/SAH représentant l'indice de méthylation est significativement diminué chez les animaux carencés, notamment chez les femelles.

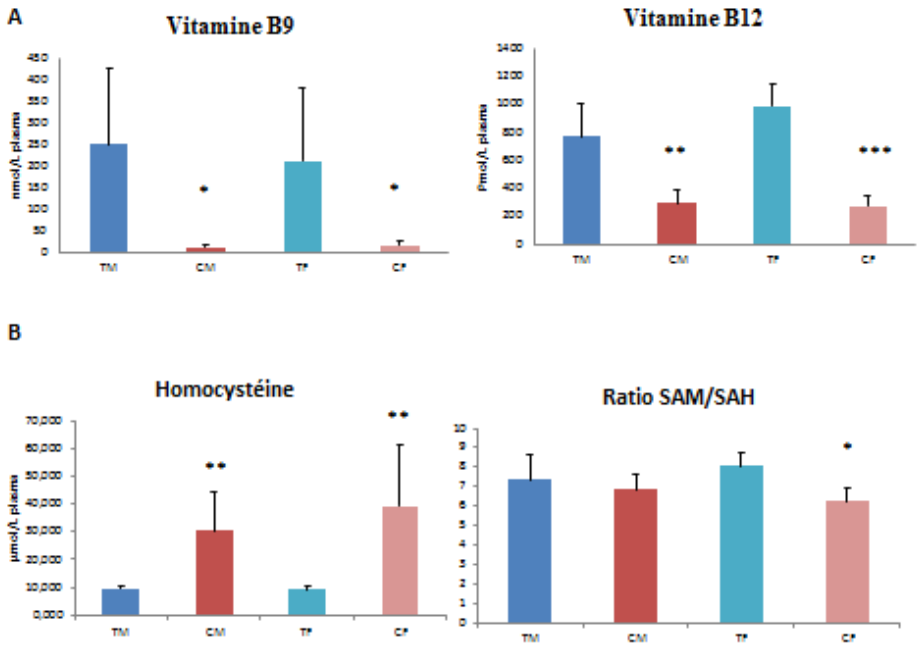


Figure 1: A. Concentrations plasmatique en vitamine B9, B12 et homocystéine à 21 jours postnatals. B. Concentration plasmatique en homocystéine et le ratio SAM/SAH dans l'hippocampe à 21 jours. TM=témoin mâle, CM=carencé mâle, TF=témoin femelle, CF=carencé femelle.*p<0,05;**p<0,001;***<0,0001;n=10 pour chaque groupe à 21 jours (ANOVA)

L'homocystéine s'accumule dans diverses structures hippocampiques notamment la zone CA1. L'expression protéique des enzymes impliquées dans le métabolisme de cet acide aminé a été évaluée dans l'hippocampe des ratons de 21 jours (**Figure 2**). La cystathionine β-synthase n'a pas été détectée dans les zones CA1, CA3 et le gyrus denté chez les animaux carencés, indifféremment du sexe (seule la zone CA3 des femelles sont montrées). Autre enzyme importante, la méthionine synthase est uniquement absente de la zone CA1 des mâles carencés.

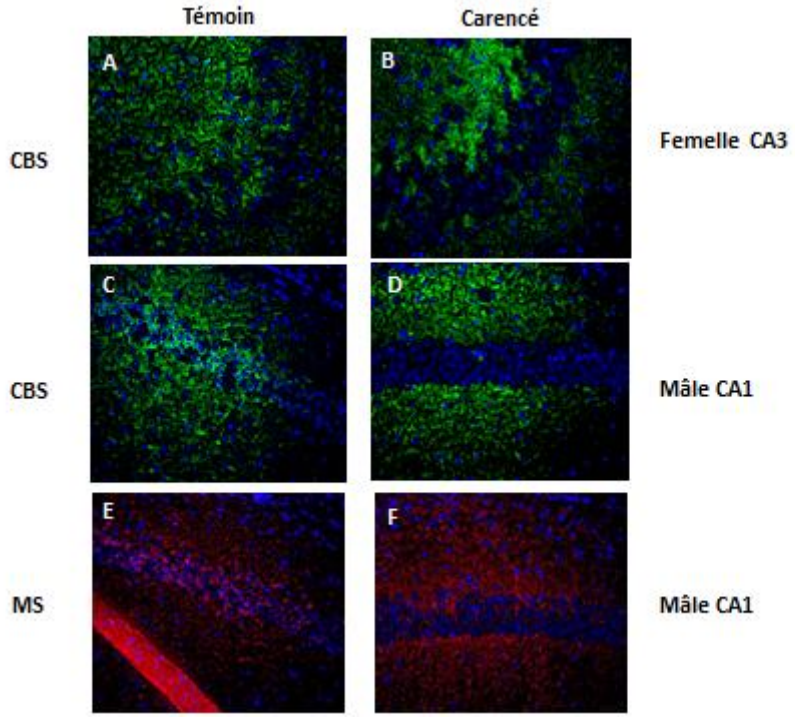
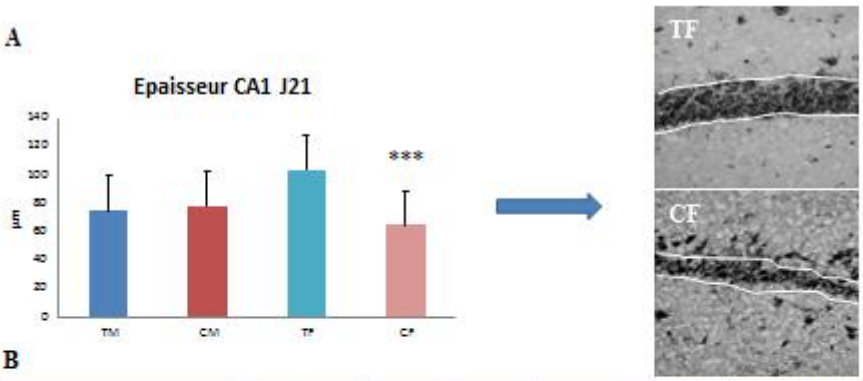


Figure 2: Immunofluorescence des marqueurs du métabolisme des monocarbones dans l'hippocampe de rat de 21 jours. Expression de la cystathionine bêta-synthase en vert et de la méthionine synthase en rouge chez les témoins (A, C et E, respectivement) et les carencés (B, D et F, respectivement).Les noyaux sont marqués au DAPI et apparaissent en bleu (grossissement x20)

La carence en donneurs de méthyles engendre des altérations structurales de l'hippocampe et un retard de maturation neuronale

Les analyses histologiques réalisées après coloration des coupes par la thionine ont permis de mettre en évidence une diminution significative de l'épaisseur de la zone CA1 de l'hippocampe uniquement chez les femelles : 78±22 vs 75±24 µm pour les mâles ; 64±10 *vs* 103±16 µm pour les femelles (n=3) (**Figure 3A**) sans modification de la densité cellulaire (**Figure 3B**). L'apoptose a été investiguée par un marquage immunohistochimique de la caspase 3 clivée qui ne montre pas de différence entre les différents groupes (données non présentées). TRAF4, protéine de la famille des *TNF receptor associated factors,* exprimée au cours du développement, semble plus présente chez les carencés, indépendamment du sexe et de la structure hippocampique. De plus, il a été mis en évidence une colocalisation de cette protéine avec la NeuroD qui est un marqueur des neurones immatures, suggérant un retard de maturation neuronale chez les animaux carencés (**Figure 3C**).

A



B

	TM	CM	TF	CF
Densité cellulaire CA1	41,1±10,5	48,6±7,1	43,8±6,5	40,6±6,4

C

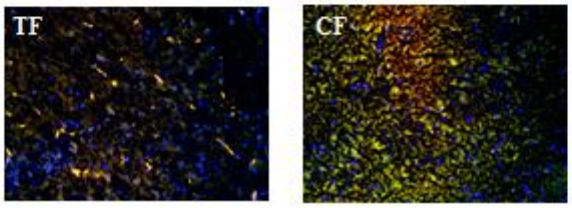


Figure 3:Analyse de la structure histologique de l'hippocampe à 21 jours de rats soumis à une carence en donneurs de méthyles. A. Epaisseur en µm de la zone CA1 de l'hippocampe et coloration à la thionine de la zone CA1 de l'hippocampe (grossissement x20).TM=témoin male, CM=carencé male, TF=témoin femelle, CF=carencé femelle.***p<0,0001; n=3 (ANOVA) B. Densité cellulaire dans la zone CA1 de l'hippocampe à 21 jours. Le nombre de cellule est rapporté à 10000µm2.C. Marquage de la protéine TRAF4 colocalisée avec le marqueur NeuroD (jaune) dans la zone CA3 de l'hippocampe (grossissement x20)

La carence en donneurs de méthyles altère la plasticité synaptique dans l'hippocampe

L'expression des synapsines I et II, protéines impliquées dans le trafic vésiculaire, est diminuée uniquement chez les mâles carencés. De même, les marqueurs présynaptiques et post-synaptiques, respectivement la synaptotagmine et la PSD95, présentent une expression réduite seulement chez les mâles (**Figure 4**).

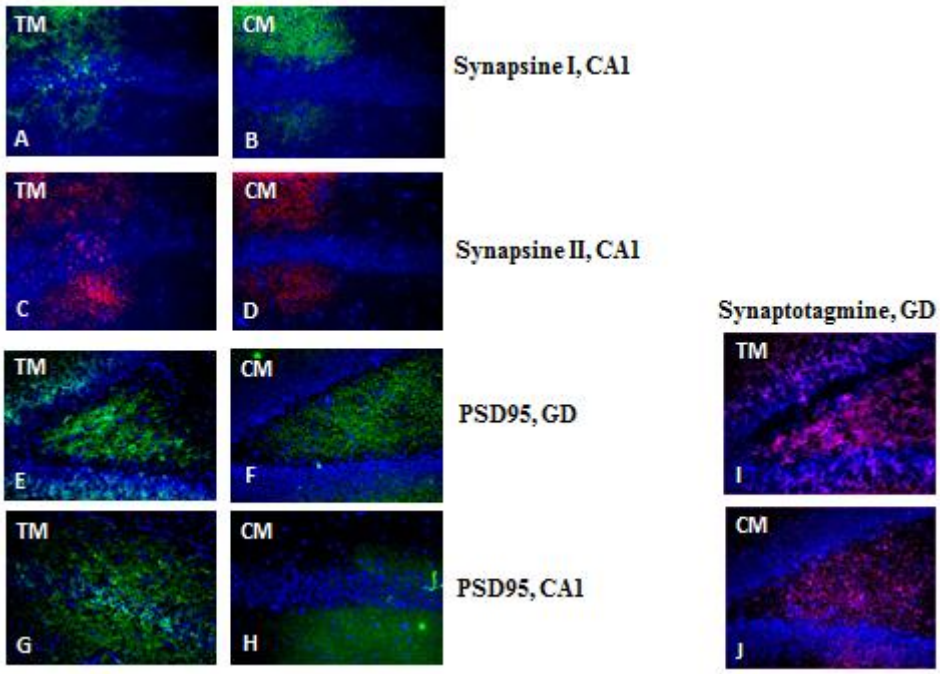


Figure 4: Immunofluorescence des marqueurs de neuroplasticité synaptique dans l'hippocampe de rats mâles de 21 jours. Expression de la synapsine I en vert, de la synapsine II en rouge, de la PSD95 en vert et de la synaptotagmine en violet chez les témoins (A, C, E, G et I respectivement) et les carencés (B, D, F, H et J respectivement).Les noyaux sont marqués au DAPI et apparaissent en bleu (grossissement x20).

La carence en donneurs de méthyles affecte les capacités psychomotrices et cognitives avant le sevrage

Le test de suspension révèle une différence significative à partir de 19 jours, date à partir de laquelle, les animaux carencés restent en moyenne 2,5x moins longtemps suspendu que les animaux témoins, signifiant que la carence entraîne précocement des troubles moteurs (**Figure 5**). Le facteur sexe ne se révélant pas significatif, les résultats des mâles et femelles ont été globalisés.

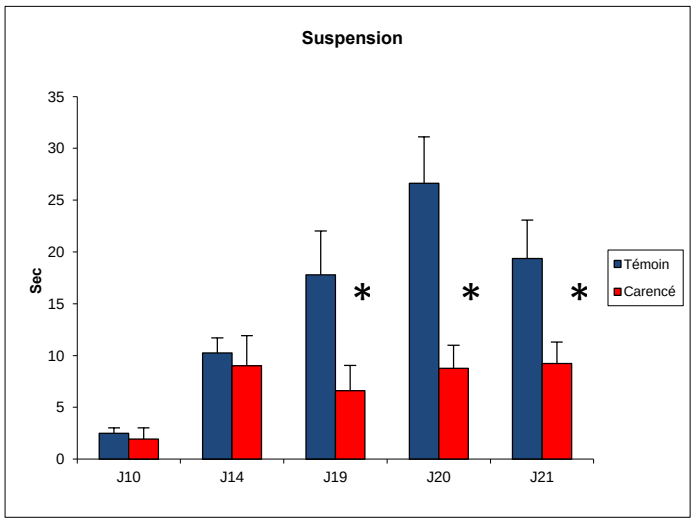


Figure 5: Développement moteur chez les rats témoins et carencés en donneurs de méthyles. Le test de suspension a été effectué une fois par jour à 10, 14, 19,20 et 21 jours. .*p<0,05;n=35 ;(ANOVA)

Troubles cognitifs et perturbations du comportement exploratoire

Afin de déterminer si la carence affectait les capacités cognitives, l'apprentissage spatial a été évalué dans un labyrinthe multi-T. Il a été observé que les femelles carencées étaient particulièrement affectées car, même si leur nombre d'erreurs diminuait au fil des sessions, elles en commettaient davantage que les femelles témoins (sessions 2 à 4), ceci étant associé à une augmentation de la latence de sortie du labyrinthe (**Figure 6**).

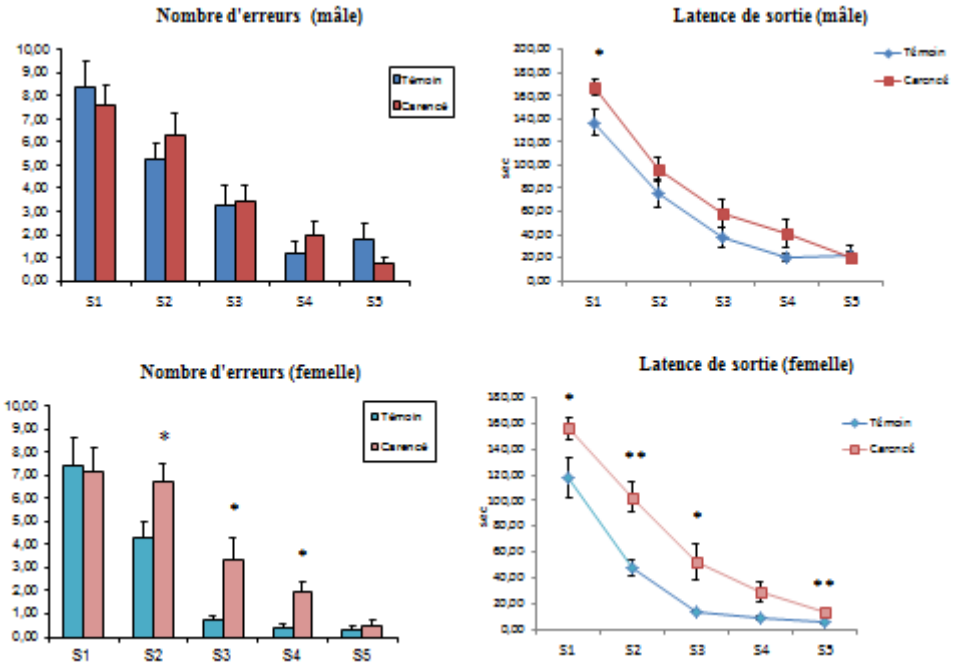


Figure 6: Apprentissage spatial chez les rats témoins et carencés en donneurs de méthyle. Le test du labyrinthe multi-T a été effectué une fois par jour entre 45 et 49 jours post-natales. Le nombre d'erreur (bras impasse) et la latence de sortie du labyrinthe ont été mesurés à chaque session.*p<0,05;**p<0,001;n=15 ;(ANOVA).

II. Effets tardifs d'une carence en donneurs de méthyles sur la physiologie, les marqueurs biochimiques et le fonctionnement hippocampique

Evolution de la masse corporelle et des paramètres biochimiques liés au métabolisme de l'homocystéine jusqu'au vieillissement

L'évolution de la masse corporelle a été suivie jusqu'à 450 jours. On observe des différences de poids significatives à 15 et 170 jours uniquement pour les mâles, alors que la masse corporelle des femelles carencées reste en dessous de celle des femelles témoins tout au long de leur vie (**Figure 7A**).

Les dosages de vitamine B9 et B12 ne révèlent pas de différences à 205, 330 et 450 jours quels que soient le sexe et le régime (exemple : 175±76 vs 161±58 µmol/L pour folate mâle). En dépit d'un retour à une alimentation normale dès le sevrage, le taux d'homocystéine est significativement augmenté à 205 et 450 jours chez les mâles carencés et 330 et 450 jours chez les femelles carencées (**Figure 7B**).

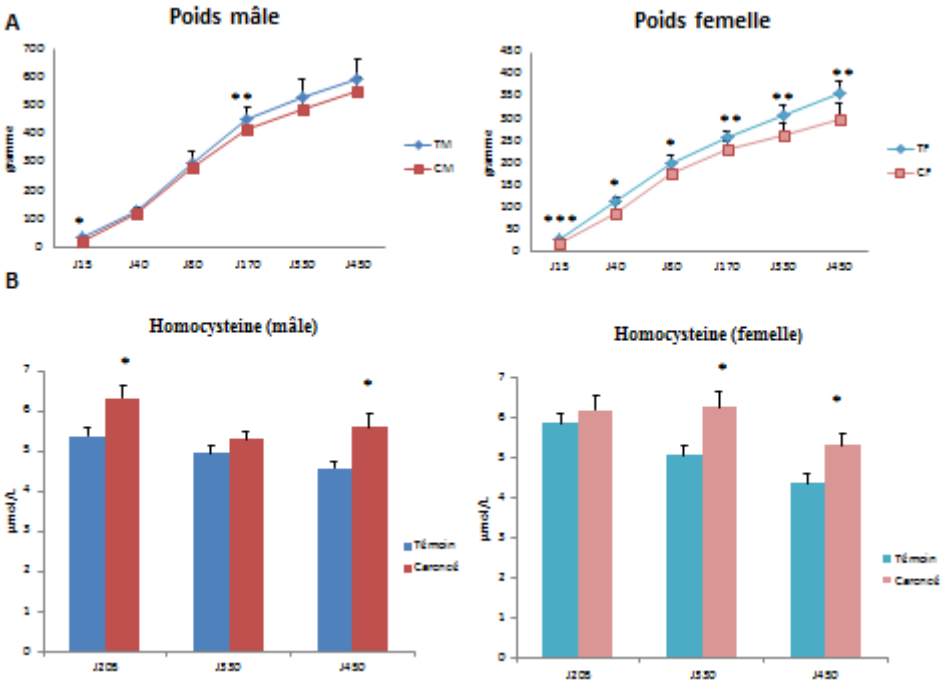


Figure 7: A. Evolution de la masse corporelle de 15 à 450 jours post-natales de rats témoins et carencés B. Concentration plasmatique en homocystéine à 205, 330 et 450 jours post-natals. TM=témoin mâle, CM=carencé mâle, TF=témoin femelle, CF=carencé femelle.*p<0,05;**p<0,001;***<0,0001;n=15 ;(ANOVA)

Restauration des enzymes clés du métabolisme des monocarbones

L'expression protéique des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine a été étudiée dans l'hippocampe des rats de 450 jours. Contrairement aux observations faites à 21 jours, la cystathionine β-synthase et la méthionine synthase sont présentes dans toutes les structures de l'hippocampe, indépendamment du sexe et du régime d'origine. On retrouve également un marquage similaire concernant l'homocystéine qui est connue comme s'accumulant physiologiquement au cours du vieillissement (**Figure 8**).

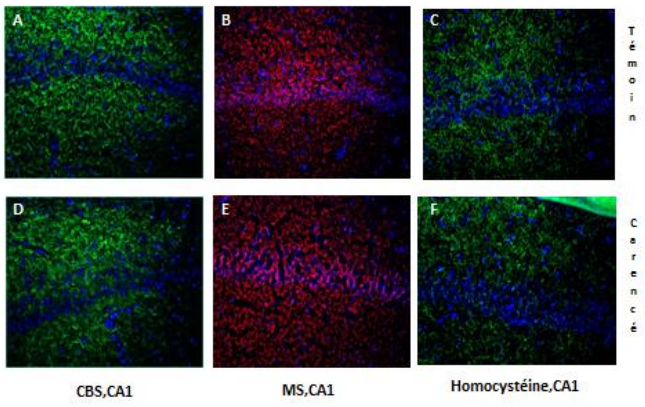


Figure 8: Immunofluorescence des marqueurs du métabolisme des monocarbones dans l'hippocampe de rats de 450 jours. Expression de la cystathionine bêta-synthase en vert, de la méthionine synthase en rouge et de l'homocystéine en vert chez les témoins (A, B et C respectivement) et les carencés (D, E et F, respectivement).Les noyaux sont marqués au DAPI et apparaissent en bleu (grossissement x20).

Rétablissement de la plasticité synaptique

Les différents marqueurs de neuroplasticité ont été à nouveau observés à 450 jours dans l'hippocampe. A cet âge, aucune différence n'est observée concernant les synapsines I et II, la PSD95 et la synaptotagmine, quels que soient le sexe, la structure hippocampique et le régime (**Figure 9**).

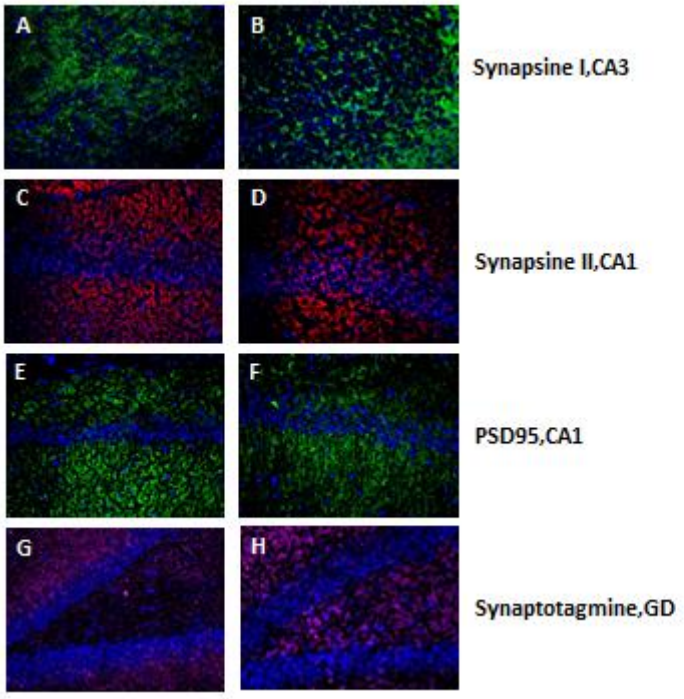


Figure 9: Immunofluorescence des marqueurs de neuroplasticité synaptique dans l'hippocampe de rats de 450 jours. Expression de la synapsine I en vert, de la synapsine II en rouge, de la PSD95 en vert et de la synaptotagmine en violet chez les témoins (A, C, E et G respectivement) et les carencés (B, D, F et H respectivement).Les noyaux sont marqués au DAPI et apparaissent en bleu (grossissement x20).

Persistance d'une atrophie hippocampique

Le marquage à la thionine de l'hippocampe à 450 jours montre la persistance d'une épaisseur significativement réduite de la zone CA1 uniquement chez les femelles carencées par rapport aux femelles témoins, avec 45±5 *vs* 61±7 µm respectivement (n=6) (**Figure 10A**), en accord avec les résultats obtenus à 21 jours. L'apoptose a été examinée par le marquage immunohistochimique de la caspase 3 clivée qui ne montre pas de différence entre les différents groupes (**Figure 10B**), signifiant que l'atrophie ne serait pas en relation avec une augmentation de la mort cellulaire au cours du vieillissement.

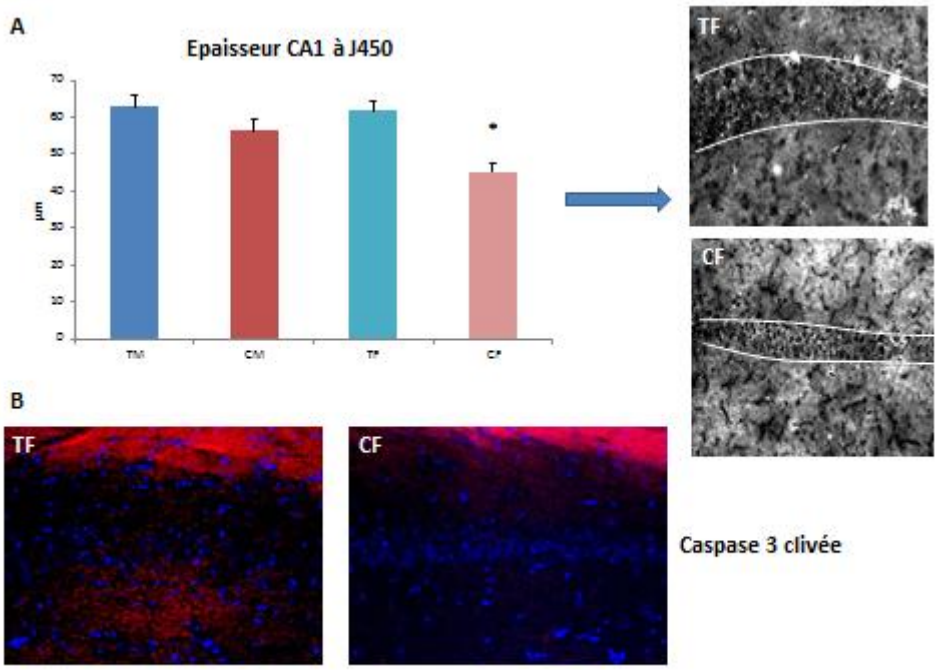


Figure 10:Analyse de la structure histologique de l'hippocampe à 450 jours de rats soumis à une carence en donneurs de méthyle. A. Epaisseur en µm de la zone CA1 de l'hippocampe et coloration à la thionine de la zone CA1 de l'hippocampe (grossissement x20).TM=témoin mâle, CM=carencé mâle, TF=témoin femelle, CF=carencé femelle. *p<0,05;n=6(ANOVA) B. Marquage de la caspase 3 clivée dans la zone CA1 de l'hippocampe (grossissement x20)

Troubles cognitifs

Lors des essais destinés à évaluer leur capacité de mémorisation à l'issue des cinq sessions d'apprentissage et au cours du vieillissement, les rats mâles carencés ont été moins performants que les rats mâles témoins jusqu'à 205 jours. Par la suite, on ne retrouve plus de différence significative, suggérant que les mâles adultes initialement carencés conservent une capacité à améliorer leurs performances au fur et à mesure des essais. Quant aux femelles, les carencées restaient toujours moins performantes que les témoins, et cela pratiquement tout au long de leur vie ; elles commettaient en moyenne 1,86 fois plus d'erreurs et mettaient 1,6x plus de temps à trouver la sortie du labyrinthe que leurs congénères. (**Figure 11**).

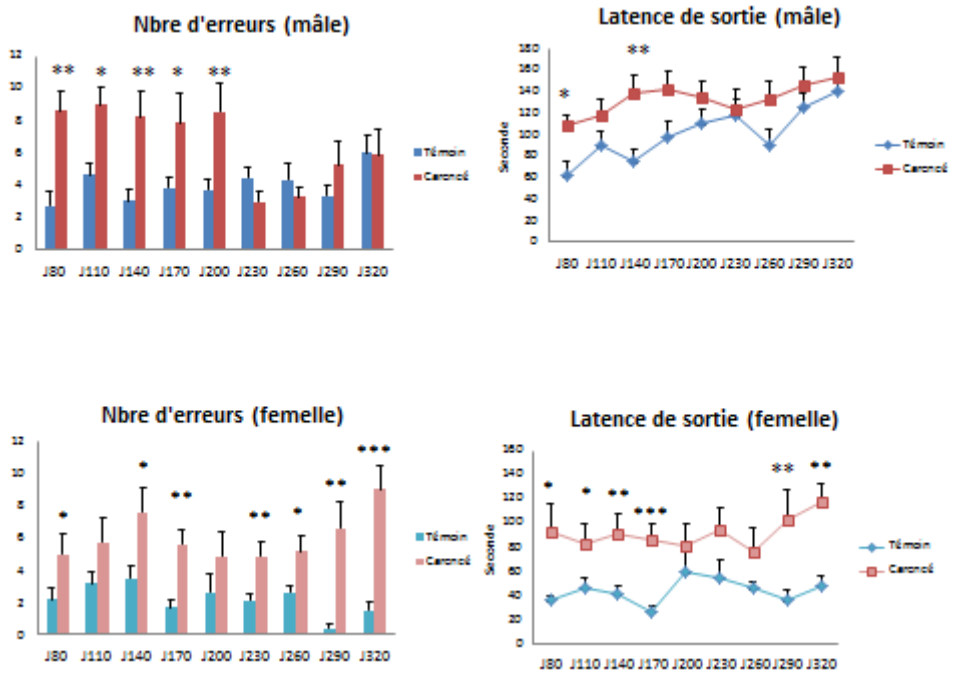


Figure 11: Mémorisation spatiale chez les rats témoins et carencés en donneurs de méthyles. Le test du labyrinthe multi-T a été effectué une fois par mois entre 80 et 320 jours post-natales. Le nombre d'erreurs et la latence de sortie du labyrinthe ont été mesurés à chaque session.*p<0,05;**p<0,001;n=15 ;(ANOVA).

Le test de l'évitement passif, effectué lors des premiers stades physiologiques du vieillissement (>300 jours d'âges) ne montre aucune différence significative, aussi bien lors de la phase d'apprentissage que des sessions de mémorisation (**Figure 12A**). Ce résultat évoque un fonctionnement normal des zones para-hippocampiques et du cortex associatif renforçant l'hypothèse d'une sensibilité particulière restreinte à l'hippocampe (non impliqué de façon majeure dans ce test).

L'évaluation du comportement exploratoire à 450 jours par le test de l'openfield a mis en évidence des troubles fonctionnels uniquement chez les femelles carencées chez lesquelles on retrouve une exploration moins importante des quartiers centraux suggérant une plus grande anxiété (**Figure 12B**).

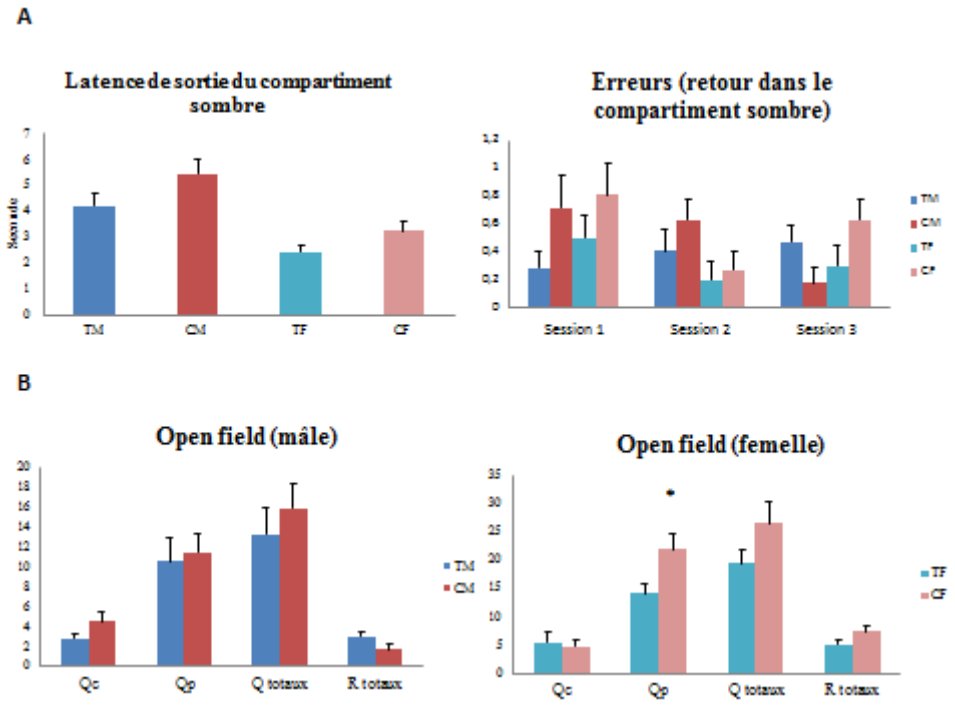


Figure 12: A. Test de l'évitement passif chez les rats témoins et carencés en donneurs de méthyles. Ce test a été effectué en 2 phases : une phase d'apprentissage où a été mesurée la latence de sortie du compartiment sombre (à 360 jours d'âge) et une phase de mémorisation où a été mesuré le nombre de retours dans le compartiment sombre (sur 3 sessions de 390 jours à 450 jours d'âge). B. Comportement exploratoire chez les rats témoins et carencés en donneurs de méthyles. Le test de l'openfield a été réalisé une fois à 450 jours. Les nombre de quartiers centraux (Qc), périphériques (Qp) et le nombre total de quartiers visités (Q totaux) ainsi que le nombre total de redressements (R totaux) ont été mesurés. TM=témoin mâle, CM=carencé mâle, TF=témoin femelle, CF=carencé femelle. $p<0,05$;n=15 (ANOVA)

III. Conditionnement hypoxique néonatal et carence gestationnelle en donneurs de méthyles

Evolution de la masse corporelle et des paramètres biochimiques liés au métabolisme de l'homocystéine jusqu'au vieillissement

L'évolution de la masse corporelle a été suivie jusqu'à 450 jours. Par rapport aux témoins, on observe des différences de poids significatives uniquement à 40 et 80 jours pour les mâles alors que les femelles carencées-hypoxiques restent en-dessous des femelles témoins jusqu'à 205 jours (**Figure 13A**).

Les dosages plasmatiques de vitamine B9 et B12 ne révèlent pas de différence à 80, 205 et 330 jours chez les mâles alors que la concentration de B12 est significativement augmentée chez les femelles du groupe carence-hypoxie à 205 jours (**Figure 13B**). Ces résultats contrastent avec les données issues de l'étude des conséquences de la carence seule où il n'était retrouvé aucune différence. Les dosages d'homocystéine n'ont pas été encore été réalisés.

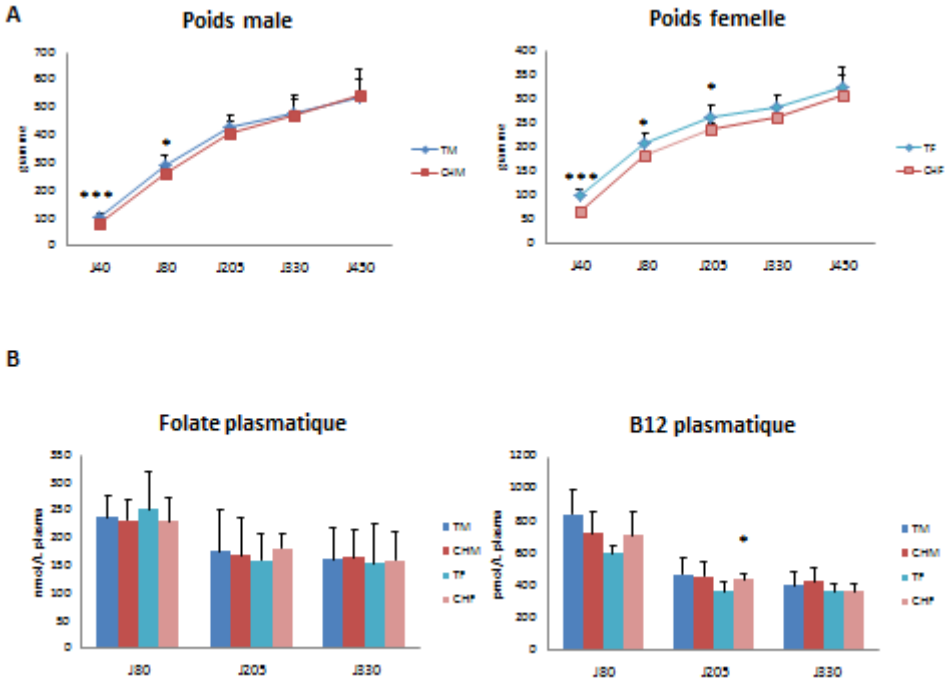


Figure 13: A. Evolution de la masse corporelle de 40 à 450 jours post-natals de rats témoins et du groupe « carence-hypoxie » B. Concentrations plasmatiques en folate et en vitamine B12 à 80,205 et 330 jours post-natals. TM=témoin mâle, CHM=carencé-hypoxie mâle, TF=témoin femelle, CHF=carencé-hypoxie femelle.*p<0,05;**p<0,001;***<0,0001;n=15 ;(ANOVA)

L'hypoxie n'altère pas l'expression des enzymes du métabolisme de l'homocystéine

L'expression protéique des enzymes clés impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine a été analysée dans l'hippocampe des rats à 450 jours. En regard des observations faites chez les carencés de 450 jours, la cystathionine β-synthase et la méthionine synthase étaient détectées dans toutes les structures de l'hippocampe, indépendamment du sexe (**Figure 14**).

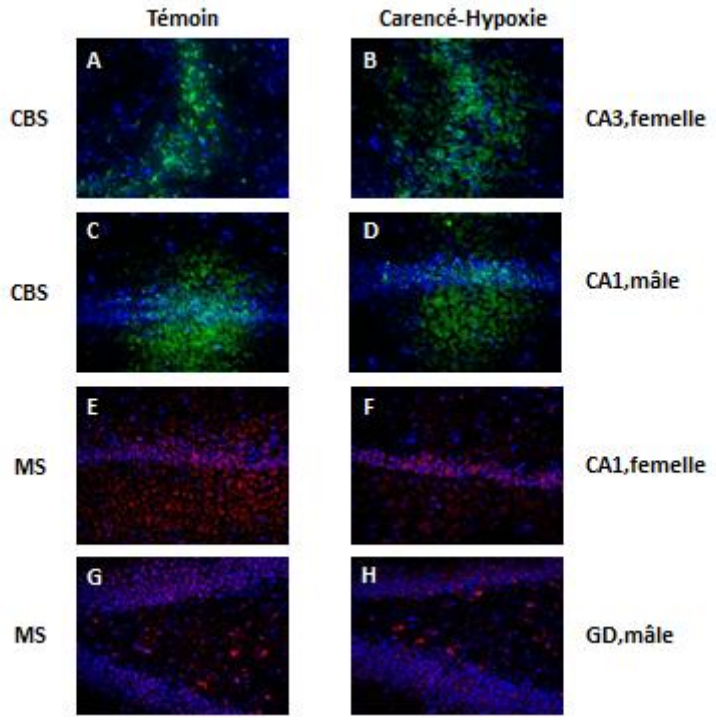


Figure 14: Immunofluorescence des marqueurs du métabolisme des monocarbones dans l'hippocampe de rats à 450 jours. Expression de la cystathionine bêta-synthase en vert et de la méthionine synthase en rouge chez les témoins (A, C, E et G respectivement) et les carencés-hypoxie (B, D, F et H respectivement). Les noyaux sont marqués au DAPI et apparaît en bleu (grossissement x20).

Le conditionnement hypoxique compense les effets structuraux délétères de la carence en donneurs de méthyles à 450 jours chez les rats femelles

Le marquage à la thionine de l'hippocampe à l'âge de 450 jours ne révèle aucune différence significative de l'épaisseur de la zone CA1 quel que soit le sexe : 57±5 *vs* 58±8 µm pour les mâles ; 56±11 *vs* 54±14 µm pour les femelles (n=6) (**Figure 15A**), contrairement aux résultats obtenus chez les animaux carencés au même âge. Le marquage immunohistochimique de la caspase 3 clivée ne montre pas de différence entre les différents groupes (**Figure 15B**), comme précédemment chez les animaux carencés. Le marqueur de plasticité post-synaptique PSD95 présente des niveaux d'expression similaires dans les différents groupes, quels que soient le sexe et la structure hippocampique (**Figure 15B**).

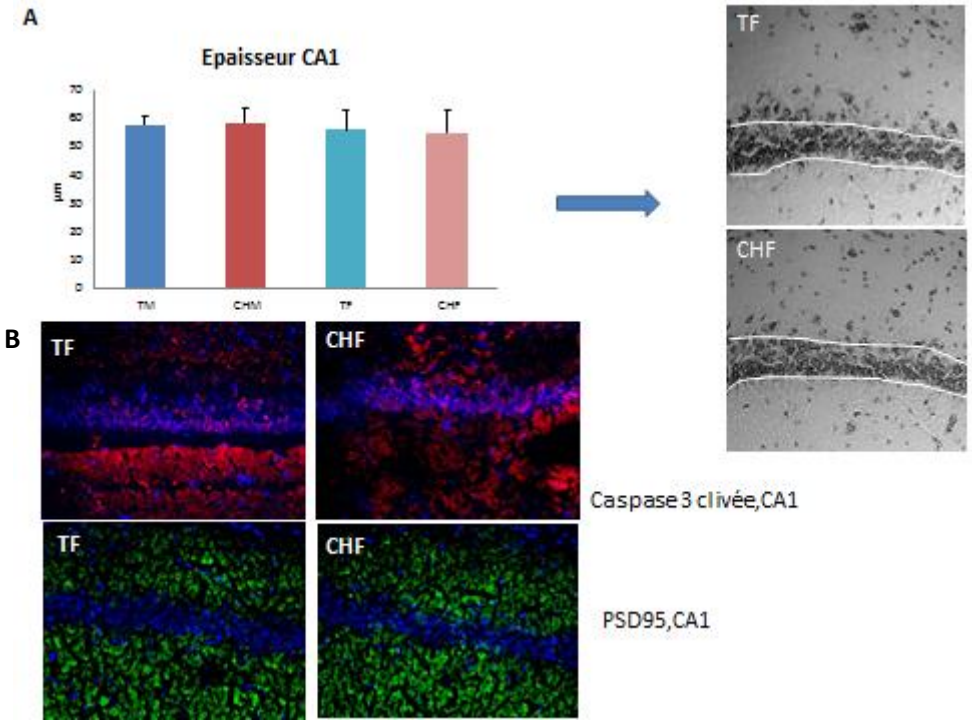


Figure 15: Analyse de la structure histologique de l'hippocampe à 450 jours de rats soumis à une carence en donneurs de méthyles et à une hypoxie néonatale. A. Epaisseur en µm de la zone CA1 de l'hippocampe et coloration à la thionine de la zone CA1 de l'hippocampe (grossissement x20).TM=témoin male, CHM=carencé-hypoxie male, TF=témoin femelle, CHF=carencé-hypoxie femelle. n=6(ANOVA) B. Marquage de la caspase 3 clivée (rouge) et de la PSD95 (vert) dans la zone CA1 de l'hippocampe de rats de 450 jours (grossissement x20).

La tolérance cérébrale en lien avec l'hypoxie néonatale atténue les conséquences comportementales de la carence en donneurs de méthyles sur le vieillissement hippocampique

Afin de savoir si l'hypoxie pouvait réduire ou au contraire renforcer les capacités cognitives suite à la carence, l'apprentissage spatial a été évalué dans le labyrinthe multi-T. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes « témoins » et « carence-hypoxie » lors des différentes sessions, aussi bien au niveau du nombre d'erreurs commises que de la latence de sortie du labyrinthe (**Figure 16**).

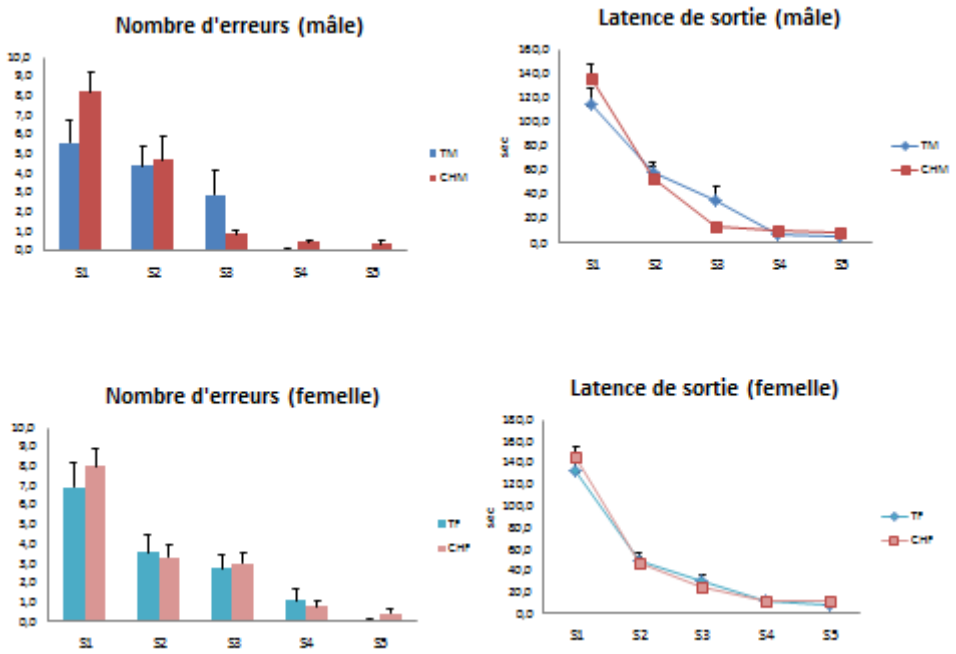


Figure 16: Apprentissage spatial chez les rats témoins et « carencés-hypoxie ». Le test du labyrinthe multi-T a été effectué une fois par jour entre 45 et 49 jours post-natals. Le nombre d'erreurs (bras impasse) et la latence de sortie du labyrinthe ont été mesurés à chaque session. n=15 (ANOVA)

Lors des essais destinés à évaluer la capacité de mémorisation à l'issue des cinq sessions d'apprentissage, les rats mâles carencés-hypoxiques ont été aussi performants que les rats témoins, à l'exception du stade de 80 jours où les carencés-hypoxiques ont rencontré davantage de difficultés pour trouver la sortie du labyrinthe. Quant aux femelles, on peut observer que le conditionnement hypoxique a diminué les effets de la carence car, contrairement aux animaux uniquement carencés, les carencées-hypoxiques demeurent aussi performantes que les témoins, cela tout au long de leur vie sauf à 290 jours où un facteur externe peut expliquer la significativité ponctuellement mesurée (**Figure 17**).

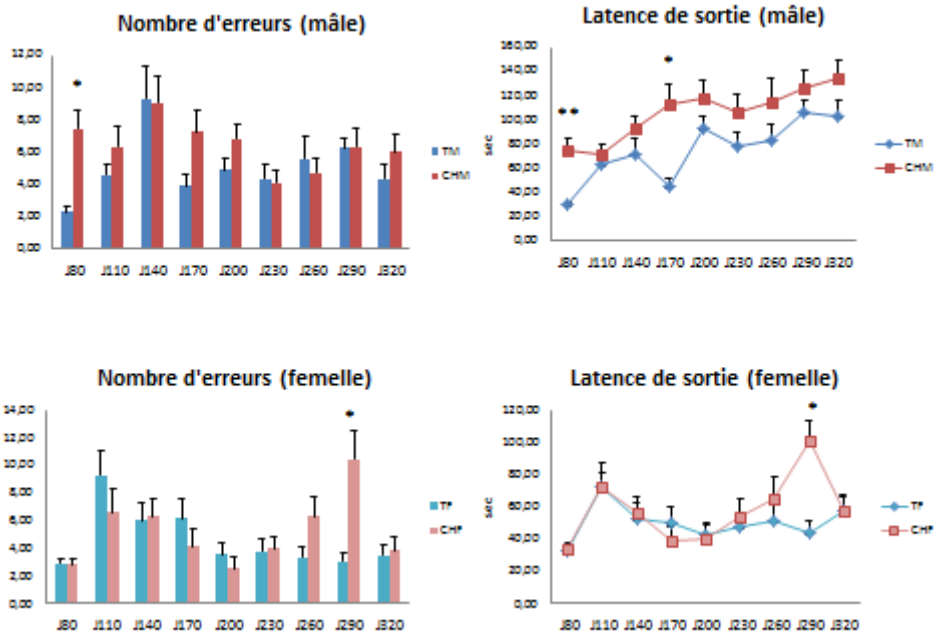


Figure 17: Mémorisation spatiale chez les rats « témoins » et « carencés-hypoxie ». Le test du labyrinthe multi-T a été effectué une fois par mois entre 80 et 320 jours post-natals. Le nombre d'erreurs (bras impasse) et la latence de sortie du labyrinthe ont été mesurés à chaque session.*p<0,05;**p<0,001;n=15 ;(ANOVA).

Le test de l'évitement passif montre une diminution significative du temps de latence de sortie du compartiment sombre chez les femelles carencées-hypoxiques lors de sessions d'apprentissage sans répercussion significative lors des sessions de mémorisation (**Figure 18A**).

Enfin, l'évaluation du comportement exploratoire à 450 jours par le test de l'openfield ne montre pas de différences chez les femelles, contrairement aux résultats enregistrés chez les animaux uniquement carencés, tandis que les mâles du groupe « carence-hypoxie » ont moins visité les quartiers périphériques que les mâles témoins en relation avec une diminution du nombre total de quartiers visités, signifiant un déclin locomoteur (**Figure 18B**)

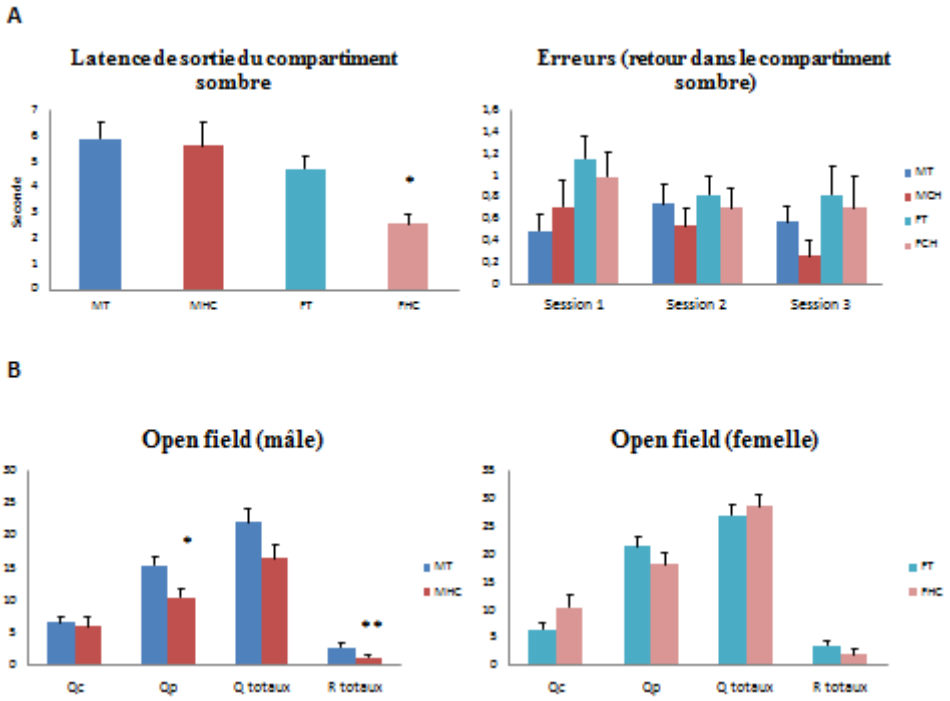


Figure 18:A.Test de l'évitement passif chez les rats témoins et carencés-hypoxiques. Ce test a été effectué en 2 phases : une phase d'apprentissage où a été mesurée la latence de sortie du compartiment sombre (à 360 jours d'âge) et une phase de mémorisation où a été mesuré le nombre de retours dans le compartiment sombre (sur 3 sessions de 390 jours à 450 jours d'âge). B. Comportement exploratoire chez les rats témoins et carencés-hypoxiques. Le test de l'openfield a été effectué une fois à 450 jours. Les nombre de quartiers centraux (Qc), périphériques (Qp) et le nombre total de quartiers visités (Q totaux) ainsi que le nombre total de redressements (R totaux) ont été mesurés. TM=témoin mâle, CHM=carencé-hypoxie mâle, TF=témoin femelle, CHF=carencé-hypoxie femelle. $p<0,05$;n=15 (ANOVA)

DISCUSSION/CONCLUSION

Cette étude a confirmé qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles entraînait des modifications du métabolisme des monocarbones en lien avec une hyperhomocystéinémie. Même si, physiologiquement, une augmentation progressive de l'homocystéine plasmatique a été rapportée entre la naissance et le sevrage chez des enfants *(Hure, 2011)*, la déplétion en vitamines du groupe B est corrélée avec l'apparition d'une hyperhomocystéinémie atteignant des valeurs dites cliniquement modérée *(Ubbink et al., 1993)*. Les valeurs plasmatiques de ces mêmes paramètres montrent une bonne adéquation de notre modèle gestationnel avec les données cliniques. L'altération des capacités de méthylation s'est en outre traduite par une baisse du ratio SAM/SAH au moment du sevrage des ratons (21 jours). Si cette baisse est significative chez les femelles, elle ne l'est pas chez les mâles, probablement en raison d'un trop faible effectif, nécessitant de reproduire l'expérimentation. Dans le tissu cérébral, et notamment dans l'hippocampe, des études antérieures ont montré une accumulation d'homocystéine dans les neurones *(Blaise et al., 2007 ; Daval et al., 2009)*. Nous avons montré, pour notre part, l'absence de la cystathionine β-synthase et des modifications de l'expression de la méthionine synthase qui varient selon le sexe et la région de l'hippocampe et dont la régulation fait intervenir la SAM *(Guilland et al., 2003 ; Prudova et al., 2006)*. En

absence de BHMT dans les neurones *(Mckeever et al., 1991)*, cela contribue à accentuer le phénomène d'accumulation de l'homocystéine.

Au niveau tissulaire, nous avons également confirmé une atrophie de la zone CA1 de l'hippocampe à 21 jours suite à la carence précoce, montrant que celle-ci était présente uniquement chez les femelles carencées, lesquelles seraient donc plus sensibles à une déficience en donneurs de méthyles à ce stade du développement. Les corrélations entre hyperhomocystéinémie et atrophie cérébrale ont souvent été mise en évidence *(Seshadri et al.,2008 ; Smith et al., 2010 ; Rajagopalan et al., 2011)*. La neurotoxicité de l'homocystéine a été impliquée dans divers processus cellulaires conduisant à des altérations tissulaires, comme l'excitotoxicité, l'augmentation du stress oxydant et les dommages sur l'ADN *(Ho et al., 2002 ; Poddar et Paul, 2009)*. De plus, le retard de maturation neuronale observé chez les animaux carencés en lien avec une augmentation de l'expression des protéines TRAF4 et NeuroD semblent confirmer le déséquilibre entre prolifération et différenciation neuronale observé précédemment in vitro *(Akchiche et al., 2011)*.

La présence de ces altérations structurales associées à un retard de maturation chez les carencés nous a conduits à investiguer d'éventuelles altérations fonctionnelles, notamment au niveau de la plasticité neuronale. De nombreux gènes associés à la plasticité fonctionnelle sont régulés par des mécanismes épigénomiques, comme par exemple les synapsines dont des dysrégulations ont été observées dans le cervelet des animaux exposés à la carence *(Pourié et al.*, article soumis). De ce point de vue, nos données montrent que si les femelles sont plus affectées au niveau de l'intégrité tissulaire, les mâles présentent des altérations d'expression de protéines impliquées dans la plasticité synaptique. De nombreuses études rapportent l'importance des mécanismes épigénétiques et épigénomiques dans la formation et la régulation de la neuroplasticité, intervenant notamment dans les processus cognitifs *(Guo et al., 2011 ; Lubin et al., 2011 ; Lockett et al., 2010)*. Une fois de plus, notre étude montre un déficit d'apprentissage qui affecte plus particulièrement les femelles juste après leur sevrage, en accord avec les données tissulaires. Cliniquement, il est connu que des taux élevés d'homocystéine sont en lien avec des altérations neurologiques et un déclin cognitif *(Mattson et Shea, 2003)*. L'âge représente un facteur important dans la survenue des troubles cognitifs. Se pose alors la question du vieillissement dans notre modèle d'individus carencés précocement.

D'un point de vue morphologique, les études à long terme révèlent que l'évolution de la masse corporelle, même après un retour à un régime normal au moment du sevrage, demeure affectée, surtout chez les femelles. L'origine de cette altération pourrait être en lien avec la persistance de la désorganisation de la muqueuse gastrique entraînant, entre autres, des perturbations de la production de certaines hormones intervenant dans la croissance comme la ghréline *(Bossenmeyer-Pourié et al., 2010)*. La littérature mentionne également une corrélation entre hyperhomocystéinémie et retard de croissance intra-utérin (RCIU) *(De vries et al., 1997 ;Leeda et al., 1998)*, mais d'autres travaux sont discordants en ce qui concerne cette association *(Burke et al.,1992)*. Selon nos observations, les sujets de sexe féminin seraient plus sensibles aux conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles. A 450 jours, le retour à des valeurs physiologiques des paramètres biochimiques en relation avec

le métabolisme des monocarbones et le rétablissement des facteurs de plasticité sont en accord avec le retour à un régime normal à 21 jours. Néanmoins, les taux plasmatiques d'homocystéine demeurent significativement supérieurs à ceux observés chez les animaux témoins, sans pour autant être situés dans des valeurs caractérisant une hyperhomocystéinémie (< 7 µmol/L). D'un point de vue tissulaire, l'atrophie de l'hippocampe observée à 21 jours est toujours présente à 450 jours chez les femelles et reste associée à des performances cognitives moindres. Les carences nutritionnelles, notamment en micronutriments, sont des facteurs de risque dans la progression de démences *(Scott et al., 2006)*. Des taux élevés d'homocystéine et des avitaminoses en folate, B12 ou B6 ont souvent été associés avec un déclin cognitif et la survenue de démence vasculaire *(Hin et al., 2006 ; Clarke et al., 2007)*. En clinique, les données concernant les effets d'une supplémentation en folates et vitamine B12 sur le déclin cognitif des personnes âgées sont contradictoires *(Durga et al., 2007 ; Balk et al., 2007)*, mais ne tiennent pas compte des effets de la programmation fœtale, dont l'importance est soulignée dans notre étude. Les effets délétères de la carence en donneurs de méthyles prennent essentiellement leur origine au cours de la période périnatale. Tenant compte de la permissivité de cette fenêtre développementale, nous avons investigué les possibilités compensatoires d'une neurogenèse induite au cours de cette période critique du développement.

L'exposition à des épisodes d'hypoxie est relativement fréquente en période néonatale. Alors qu'une longue période d'hypoxie est connue pour produire des dommages cérébraux irréversibles *(Van Handel et al., 2007)*, il a été montré par ailleurs que des épisodes courts d'hypoxie pouvaient, au contraire, exercer des effets bénéfiques, comme illustré par le rôle protecteur du conditionnement hypoxique induisant une tolérance cérébrale à des événements délétères ultérieurs *(Gidday et al.,1994 ; Cantagrel et al.,2003)*. Dans le cadre de nos travaux, nous avons montré qu'un conditionnement hypoxique néonatal associé à une carence précoce en donneurs de méthyles n'affectait pas à long terme les paramètres biochimiques en lien avec le métabolisme des monocarbones. De façon intéressante, l'hypoxie néonatale brève a permis de compenser la réduction de densité cellulaire associée à la carence en restaurant une structure hippocampique normale, notamment au niveau de la zone CA1 chez les femelles, vraisemblablement par une stimulation de la neurogenèse *(Pourié et al., 2006 ; Martin et al., 2010)*. En accord avec les travaux de Nakatomi *et al.* (2002), les cellules originaires de la zone subventriculaire (ZSV) sont capables de migrer et d'incorporer les circuits hippocampiques. Ces données concordent avec les effets bénéfiques de l'hypoxie observés précédemment à 21 jours sur le même modèle *(Blaise et al., 2009)*. Cette compensation cellulaire est associée sur le plan fonctionnel à une amélioration notable des scores dans les tests neurocomportementaux hippocampo-dépendants, par comparaison aux animaux uniquement exposés à la carence. Notre présente étude s'est déroulée en deux temps, d'une part l'étude à long terme de la carence seule, puis l'étude des effets de l'hypoxie sur le modèle de carence. Cette double approche nécessite une homogénéisation à postériori. Ainsi, Les données comportementales au cours du vieillissement montrent que quel que soit le sexe, les individus carencés-hypoxiques présentent toujours des performances supérieures aux individus uniquement carencés. La comparaison des deux groupes de témoins montre qu'ils sont relativement homogènes malgré une constitution des groupes expérimentaux et des tests

effectués avec un intervalle de temps important. De telles observations confortent les résultats obtenus par ailleurs qui montraient qu'un conditionnement par une hypoxie néonatale brève procurait une meilleure résistance au vieillissement cérébral associée à de meilleures capacités cognitives chez le rat âgé *(Martin et al., article soumis)*.

En conclusion, nous avons montré qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles engendrait à court terme des désordres cognitifs en lien avec une perturbation du cycle de l'homocystéine, des désordres structuraux de l'hippocampe et une altération de la plasticité, probablement en lien avec des mécanismes épigénétiques comme cela a été montré dans une autre étude *(Pourié et al., article soumis)*. A long terme, cette carence a engendré, en dépit d'un rétablissement des paramètres biochimiques en lien avec le métabolisme des monocarbones et des marqueurs de neuroplasticité, la persistance d'un déficit de croissance chez les animaux femelles et des perturbations cognitives chroniques associées à une atrophie persistante de l'hippocampe. Toutefois, les effets délétères de la carence à long terme peuvent être significativement réduits par un stimulus favorisant la neurogenèse endogène en période néonatale. La double approche de l'étude souligne la pertinence de la survenue d'un épisode pro-neurogénique dans une fenêtre de maturation propice à des effets compensatoires tissulaires suite à des atteintes délétères comme les carences vitaminiques dans le cadre du programme fœtal.

Balk, E. M., G. Raman, et al. (2007). "Vitamin B6, B12, and folic acid supplementation and cognitive function: a systematic review of randomized trials." Arch Intern Med **167**(1): 21-30.

Barker, D. J. (1992). "The fetal origins of adult hypertension." J Hypertens Suppl **10**(7): S39-44.

Battaglia-Hsu, S. F., N. Akchiche, et al. (2009). "Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(51): 21930-21935.

Belkacemi, L., D. M. Nelson, et al. (2010). "Maternal undernutrition influences placental-fetal development." Biology of reproduction **83**(3): 325-331.

Blaise, S. A., E. Nedelec, et al. (2009). "Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis." Experimental neurology **216**(1): 231-238.

Blaise, S. A., E. Nedelec, et al. (2007). "Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats." The American journal of pathology **170**(2): 667-679.

Bossenmeyer-Pourie, C., S. Blaise, et al. (2010). "Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat." The American journal of pathology **176**(1): 270-277.

Bruce, K. D. and M. A. Hanson (2010). "The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome." The Journal of nutrition **140**(3): 648-652.

Burke, G., K. Robinson, et al. (1992). "Intrauterine growth retardation, perinatal death, and maternal homocysteine levels." N Engl J Med **326**(1): 69-70.

Candito, M., R. Rivet, et al. (2008). "Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study." Am J Med Genet A **146A**(9): 1128-1133.

Cantagrel, S., C. Krier, et al. (2003). "Hypoxic preconditioning reduces apoptosis in a rat model of immature brain hypoxia-ischaemia." Neurosci Lett **347**(2): 106-110.

Carter, T. C., F. Pangilinan, et al. (2011). "Evaluation of 64 candidate single nucleotide polymorphisms as risk factors for neural tube defects in a large Irish study population." Am J Med Genet A **155A**(1): 14-21.

Clarke, R. (2006). "Vitamin B12, folic acid, and the prevention of dementia." N Engl J Med **354**(26): 2817-2819.

Clarke, R., J. Birks, et al. (2007). "Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults." Am J Clin Nutr **86**(5): 1384-1391.

Daval, J. L., S. Blaise, et al. (2009). "Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(1): E1; author reply E2.

Daval, J. L., G. Pourie, et al. (2004). "Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus." Pediatr Res **55**(4): 561-567.

De Vries, J. I., G. A. Dekker, et al. (1997). "Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies." Br J Obstet Gynaecol **104**(11): 1248-1254.

Durga, J., M. P. van Boxtel, et al. (2007). "Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial." Lancet **369**(9557): 208-216.

Gidday, J. M., J. C. Fitzgibbons, et al. (1994). "Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat." Neurosci Lett **168**(1-2): 221-224.

Guilland, J. (2003). "L'hyperhomocystéinémie : facteur de risque cardiovasculaire ou simple marqueur ? 1. Données fondamentalesHyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 1. Basic data." Pathologie Biologie **51**(2): 101-110.

Guo, J. U., D. K. Ma, et al. (2011). "Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain." Nat Neurosci.

Herrmann, W. and R. Obeid (2011). "Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases." Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC **49**(3): 435-441.

Hin, H., R. Clarke, et al. (2006). "Clinical relevance of low serum vitamin B12 concentrations in older people: the Banbury B12 study." Age Ageing **35**(4): 416-422.

Ho, P. I., D. Ortiz, et al. (2002). "Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage." J Neurosci Res **70**(5): 694-702.

Hure, A. J., C. E. Collins, et al. (2011). "A Longitudinal Study of Maternal Folate and Vitamin B12 Status in Pregnancy and Postpartum, with the Same Infant Markers at 6 Months of Age." Matern Child Health J.

Kronenberg, G., M. Colla, et al. (2009). "Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease." Curr Mol Med **9**(3): 315-323.

Leeda, M., N. Riyazi, et al. (1998). "Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction." Am J Obstet Gynecol **179**(1): 135-139.

Lockett, G. A., F. Wilkes, et al. (2010). "Brain plasticity, memory and neurological disorders: an epigenetic perspective." Neuroreport **21**(14): 909-913.

Lubin, F. D., S. Gupta, et al. (2011). "Epigenetic Mechanisms: Critical Contributors to Long-Term Memory Formation." Neuroscientist.

Lutter, C. K. and C. M. Chaparro (2009). "Neonatal period: linking best nutrition practices at birth to optimize maternal and infant health and survival." Food Nutr Bull **30**(2 Suppl): S215-224.

Malinowska, J., P. Nowak, et al. (2011). "Comparison of the effect of homocysteine in the reduced form, its thiolactone and protein homocysteinylation on hemostatic properties of plasma." Thrombosis research **127**(3): 214-219.

Malouf, R. and J. Grimley Evans (2008). "Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people." Cochrane Database Syst Rev(4): CD004514.

Mattson, M. P., Kruman, II, et al. (2002). "Folic acid and homocysteine in age-related disease." Ageing Res Rev **1**(1): 95-111.

Mattson, M. P. and T. B. Shea (2003). "Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders." Trends in Neurosciences **26**(3): 137-146.

McKeever, M. P., D. G. Weir, et al. (1991). "Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat." Clin Sci (Lond) **81**(4): 551-556.

Miller, J. W. (2006). "Assessing the association between vitamin B-12 status and cognitive function in older adults." Am J Clin Nutr **84**(6): 1259-1260.

Nakatomi, H., T. Kuriu, et al. (2002). "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." Cell **110**(4): 429-441.

Nuyt, A. M. and B. T. Alexander (2009). "Developmental programming and hypertension." Current opinion in nephrology and hypertension **18**(2): 144-152.

Pourie, G., S. Blaise, et al. (2006). "Mild, non-lesioning transient hypoxia in the newborn rat induces delayed brain neurogenesis associated with improved memory scores." Neuroscience **140**(4): 1369-1379.

Prudova, A., Z. Bauman, et al. (2006). "S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(17): 6489-6494.

Rajagopalan, P., X. Hua, et al. (2011). "Homocysteine effects on brain volumes mapped in 732 elderly individuals." Neuroreport **22**(8): 391-395.

Ross, M. G., M. Desai, et al. (2007). "Gestational programming of offspring obesity: a potential contributor to Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **4**(2): 213-217.

Scott, T. M., I. Peter, et al. (2006). "The Nutrition, Aging, and Memory in Elders (NAME) study: design and methods for a study of micronutrients and cognitive function in a homebound elderly population." Int J Geriatr Psychiatry **21**(6): 519-528.

Seshadri, S., A. Beiser, et al. (2002). "Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease." N Engl J Med **346**(7): 476-483.

Seshadri, S., P. A. Wolf, et al. (2008). "Association of plasma total homocysteine levels with subclinical brain injury: cerebral volumes, white matter hyperintensity, and silent brain infarcts at volumetric magnetic resonance imaging in the Framingham Offspring Study." Archives of neurology **65**(5): 642-649.

Smith, A. D., S. M. Smith, et al. (2010). "Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial." PloS one **5**(9): e12244.

Tobach, E. (1966). "Manipulation effects, open-field experience and digestive transit time in Wistar male and female rats." Psychol Rep **19**(2): 375-378.

Ubbink, J. B., W. J. Vermaak, et al. (1993). "Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia." Am J Clin Nutr **57**(1): 47-53.

Uekawa, A., K. Katsushima, et al. (2009). "Change of epigenetic control of cystathionine beta-synthase gene expression through dietary vitamin B12 is not recovered by methionine supplementation." J Nutrigenet Nutrigenomics **2**(1): 29-36.

Van Handel, M., H. Swaab, et al. (2007). "Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review." Eur J Pediatr **166**(7): 645-654.

Discussion
Conclusion
Perspectives

DISCUSSSION/CONCLUSION

Partie I : Plasticité cérébrale et carence en donneurs de méthyles

La littérature mentionne de nombreuses études dans lesquelles il a été montré une corrélation entre une carence en vitamine B12 et/ou folates et des altérations du fonctionnement cérébral, en particulier le déclin cognitif. L'hyperhomocystéinémie, qui touche toutes les classes d'âge, peut être d'origine génétique ou liée à un déficit de l'apport nutritionnel en vitamines du groupe B qui interviennent comme cofacteurs des enzymes du métabolisme et, en tant que donneurs de groupements méthyles, jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de nombreux gènes. A l'occasion d'une carence maternelle pendant la grossesse, ce sont particulièrement les malformations congénitales liées à un défaut de fermeture du tube neural durant la vie embryonnaire qui sont le plus souvent rencontrées, ce qui a conduit différents pays à instaurer une politique de supplémentation en acide folique des femmes dès la période périconceptionnelle (*Talaulikar et Arulkumaran ,2011*). A l'âge adulte, des associations avec des pathologies psychiatriques de type psychose et névrose ont été rapportées. Enfin, les personnes âgées constituent un groupe particulièrement à risque où de nombreuses études épidémiologiques ont établi une déficience en folates comme facteur de risque dans diverses pathologies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le syndrome cérébelleux ou encore dans la sévérité du déclin cognitif. Hormis le développement des connaissances concernant certains mécanismes mis en jeu en situation de carence en vitamines du groupe B, notre but a été de caractériser les effets à court, moyen et long terme d'une carence précoce en donneurs de groupements méthyles sur différents comportements essentiels, du stade juvénile au stade sénescent , en lien avec l'expression cérébrale de gènes sensibles.

1. Maturation cérébrale

L'étude a été principalement axée sur deux structures cérébrales très importantes dans le développement cognitif et psychomoteur, à savoir l'hippocampe et le cervelet. En effet, le développement psychomoteur est un phénomène progressif après la naissance qui conduit à différents ajustements de l'individu dans son milieu. Ces ajustements traduisent la qualité du développement des fonctions basiques dans des mécanismes tels que la coordination du corps dans l'espace, la localisation de sources alimentaires, les activités locomotrices. De même, le développement cognitif est le résultat d'interactions complexes entre la maturation du système nerveux et l'environnement. Il se met en place à partir des premières étapes de la construction des circuits cérébraux où des mécanismes intrinsèques du type neurogenèse, synaptogenèse et apoptose construisent les circuits nerveux à l'origine d'une palette importante de comportements instinctifs. Nos modèles expérimentaux mettent en évidence l'importance du cycle des monocarbones indispensable aux voies épigénétiques et épigénomiques régulant l'expression de très nombreux gènes et protéines. En effet, le régime nutritionnel carencé en vitamines B12, B9 et choline chez l'animal ou la déplétion en folates dans le milieu de culture des progéniteurs neuronaux ont pour conséquence de perturber la reméthylation de l'homocystéine en méthionine nécessaire pour la synthèse de la S-adénosylméthionine qui est

le donneur universel de groupements méthyles lors des réactions de transméthylation, notamment de l'ADN (*Stubbe, 2011*). Malgré la baisse importante des concentrations de vitamines B12 et folates, on n'atteint jamais des valeurs nulles car il est connu que le rat est coprophage (*Ebino, 1993*) et une partie de la vitamine B12 se retrouve dans les fèces après absorption intestinale (*Brunaud et al., 2003*). Les seules solutions pour une carence totale seraient une gastrectomie afin de limiter la fixation B12-facteur intrinsèque (*Scalabrino, 2005*) ou l'utilisation de cages métaboliques afin de limiter l'accès aux déjections (*Ayav, 2005*). Dans notre modèle, l'animal est laissé libre dans une cage classique avec accès *ad libitum* afin d'éviter tout stress supplémentaire sur une période aussi critique qu'est la période développementale. De plus, les ratons nés de mère carencée ont des taux plasmatiques d'homocystéine se situant dans des valeurs caractéristiques d'une hyperhomocystéinémie modérée qui est la cas le plus souvent rencontré en clinique, contrairement à la plupart des autres modèles qui sont des KO (*Watanabe et al., 1995 ;Chen et al., 2001*) dont les valeurs d'homocystéine se situent dans les zones intermédiaires et sévères (intermédiaires :26 à 50 µmol/l et sévères :> 50 µmol/l)

D'un point de vue morphologique, il a été observé chez les ratons carencés un retard de croissance associé à diverses manifestations cutanées (alopécie), des altérations squelettiques (syndactylie, queue tordue) qui touchent environ 10 % des individus. Des caractéristiques similaires ont été également rapportées dans des modèles de souris KO $CBS^{-/-}$ (*Robert et al., 2003*) et KO $MTHFR^{-/-}$ (*Seller et Adinolfi, 1981 ; Chen et al., 2001*). Les retards de croissance peuvent avoir plusieurs origines : des causes endocriniennes via l'hormone de croissance, des causes osseuses, viscérales et nutritionnelles. L'altération du métabolisme de l'homocystéine potentialiserait ces différentes causes. Les études ont observé une corrélation entre le poids et la taille des animaux carencés, signifiant que la carence n'entraîne pas de maigreur mais un retard de croissance harmonieux mettant hors de cause une origine thyroïdienne qui est caractérisée chez l'homme par une discordance entre le poids et la taille (*Tarim,2011*). Au niveau de la croissance osseuse, l'homocystéine stimulerait l'activité des ostéoclastes, cellules impliquées dans la résorption osseuse (*Hermann et al., 2005 ; Hermann et al., 2007*) et induirait des perturbations du développement normal du cartilage épiphysaire (*Azizi et al., 2010*). L'origine de ce retard de croissance pourrait être également en lien avec la persistance de la désorganisation de la muqueuse gastrique entraînant, entre autres, des perturbations de la production de certaines hormones intervenant dans la croissance comme la ghréline (*Bossenmeyer-Pourié et al., 2010*). La présence d'une queue tordue chez certains individus dans notre modèle suggère une anomalie de fermeture du tube neural dont le lien avec les déficits en folates a été maintes fois reconnu. A cet égard, les modèles animaux du spina bifida sont divers, comme des mutations de la MTHFR qui explorent les causes génétiques (*Finnell et al., 2002*), des modèles mettant en jeu directement des protéines impliquées dans la mise en place du tube neural comme les souris splotch (Sp/Sp) (*Epstein et al., 1993*), des souris KO pour les récepteurs des folate (Folbp1 ou RFC1) (*Piedrahita et al., 1999 ; Gelineau-van Waes et al., 2008*) et bien d'autres modèles (souris Crooked tail, souris Axial defects…). Les modèles nutritionnels sont rares (*Tran et al., 2002*) mais ont également comme avantage de reproduire des altérations du tube neural dans les conditions similaires à l'exposition précoce à une déficience en folates. Notre modèle est, à notre connaissance, le

seul capable d'induire un phénotype de spina bifida en utilisant uniquement une carence maternelle en donneurs de groupements méthyles qui est en accord avec les données épidémiologiques concernant le spina bifida.

Au niveau cérébral, l'exposition précoce à un régime déficient en donneurs de méthyles jusqu'à l'âge de 21 jours, engendre une accumulation d'homocystéine non uniforme dans diverses structures cérébrales, notamment dans l'hippocampe et le cervelet, en accord avec les études princeps (*Blaise et al., 2007*). De plus, l'homocystéine se retrouve également dans les zones de prolifération de progéniteurs, comme la partie adjacente au ventricule latéral, la zone subventriculaire. Au cours de notre travail, nous avons observé que l'homocystéine s'accumulait plus particulièrement dans la couche CA1 de l'hippocampe et dans les cellules de Purkinje du cervelet, en accord avec de précédentes études sur d'autres modèles (*Robert et al., 2003 ; Chung et al., 2003*). En parallèle, dans les structures qui nous ont intéressés, il n'a pas été détecté de cystathionine β-synthase chez les animaux carencés aussi bien dans l'hippocampe que dans le cervelet. Ceci pourrait s'expliquer par une hypométhylation du promoteur de ce gène (*Uekawa et al., 2009*). En absence de BHMT dans les neurones (*Mckeever et al., 1991*), cela contribue à accentuer le phénomène d'accumulation de l'homocystéine et à fragiliser ces régions cérébrales. Au niveau tissulaire, nous avons observé une diminution de l'épaisseur de la couche CA1 de l'hippocampe, comme montré précédemment (*Blaise etal., 2007*), en précisant que cette atrophie était seulement retrouvée chez les femelles carencées, ainsi qu'une diminution du nombre de cellule de Purkinje qui, à 21 jours, ne serait pas sexe-dépendante (Figure 28). Ces données confirment des résultats similaires observés dans un modèle in vitro de cellules de Purkinje cultivées en présence de concentration croissante d'homocystéine et dans un modèle de souris KO MTHFR$^{-/-}$ (*Chen et al., 2005 ; Oldreive et Doherty, 2007*). Les corrélations entre atrophie cérébrale et hyperhomocystéinémie ont souvent été mises en avant (*Seshadri et al., 2008 ; Smith et al., 2010 ; Rajagopalan et al., 2011*). La neurotoxicité de l'homocystéine est bien documentée, à l'origine d'une excitotoxicité, une augmentation du stress oxydant et des dommages de l'ADN (*Ho et al., 2002 ; Poddar et Paul, 2009*). De plus, l'accumulation de l'homocystéine engendre une modification du cycle cellulaire du neurone en faveur d'une apoptose (*Obeid et Herrmann, 2006*). Ainsi, nous avons démontré dans notre modèle cellulaire qu'au cours de la phase de différenciation, les cellules carencées étaient plus sensibles à la mort cellulaire par apoptose associée à la différenciation. L'apoptose est amplifiée, avec une activation plus importante des caspases 9 et 3 et une perte du potentiel de membrane mitochondrial plus prononcée. Ce processus ferait intervenir une répression de la protéine phosphatase 2A, en lien avec une augmentation de la cycline E et une réentrée des neurones différenciés dans le cycle cellulaire, prélude à la mort neuronale. La protéine PP2A est une enzyme notamment impliquée dans la déphosphorylation de la protéine Tau, entraînant sa libération afin qu'elle soit dégradée (*Wang et al., 1995).* L'expression et l'activité de cette enzyme sont diminuées dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer en comparaison à des témoins (*Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001 ; Sontag et al., 2004*). Plusieurs travaux ont émis une hypothèse liant la maladie d'Alzheimer à une réduction de la méthylation de la protéine PP2A dans un contexte d'hyperhomocystéinémie (*Tolstykh et al., 2000 ;Vafai et Stock, 2002 ; Sontag et al., 2008*).

En outre, le retard de maturation neuronale observé dans l'hippocampe chez les animaux carencés, illustré par la persistance de la présence de TRAF4 et de NeuroD, des marqueurs de neurones immatures, semble confirmer le déséquilibre entre prolifération et différenciation neuronale observé in vitro où les protéines proneurales (Mash1, Neurogenine 3, NeuroD) ont une expression altérée avec la carence en folate. Le devenir des cellules est d'autant plus perturbé par l'augmentation de HDAC4, histones désacétylases exerçant un effet répresseur de la différenciation neuronale. Comme mentionné précédemment, nous avons retrouvé des taux de SAM et des ratios SAM/SAH effondrés dans nos modèles carencés, conduisant à des altérations des réactions de transméthylation nécessaires aux modifications épigénétiques, comme le changement de la structure de la chromatine par les histones ou l'indice de méthylation de promoteur nécessaire à l'expression de différents gènes, comme ici les gènes proneuraux (*Perry et al., 2004*). Nous avons mis en évidence d'autres mécanismes physiopathologiques dans lesquels l'homocystéine est impliquée. Il a été observé une désorganisation sévère du cytosquelette et du transport vésiculaire dans notre modèle *in vitro*. En effet, différents constituants des microtubules (β-tubuline, α-tubuline, α-tubuline acétylée, MAP2 A/B) ont une expression diminuée entraînant une désorganisation du réseau microtubulaire associée à l'absence de polarité cellulaire. Pour la première fois, il a été démontré dans nos deux modèles qu'une carence affectait également une autre protéine majeure du cytosquelette, l'actine, via une N-homocystéinylation sur le résidu lysine 359 en association avec son agrégation pathologique dans les cellules. Ces résultats viennent enrichir de précédents travaux montrant l'élévation de protéines plasmatiques N-homocystéinylées en relation avec des altérations du cycle des monocarbones. (*Jakubowski et al., 2008, 2009*). Ces changements structuraux du cytosquelette peuvent modifier l'élongation et la stabilisation des axones, le développement des dendrites nécessaires à la communication interneuronale ainsi que la polarité neuronale (*Witte et Bradke, 2008 ; Conde et Caceres, 2009*). Des altérations fonctionnelles du transport vésiculaire ont également été mises en évidence illustrées par une diminution d'expression des protéines motrices, la dynéine et la kinésine. Toutefois, seule la kinésine était modifiée par homocystéinylation, ce qui a eu pour effet de réduire les interactions avec ses protéines partenaires, en particulier la β-tubuline. Il est connu que toutes ces protéines sont impliquées dans la plasticité fonctionnelle du neurone. Dans ce cadre, une carence en donneurs de méthyles entraîne un dysfonctionnement sévère de la plasticité synaptique signalée par l'absence ou la diminution significative de marqueurs de neuroplasticité comme la *Postsynaptic density protein 95* (marqueur postsynaptique), la synaptotagmine (marqueur présynaptique) et les synapsines I et II. Ces résultats ont été observés dans d'autres modèles cellulaires où les folates et la SAM modulent l'activité synaptique (*Serra et al., 2008*).

Dans notre modèle animal les résultats diffèrent selon le sexe et la structure observée : au niveau de l'hippocampe, les mâles semblent plus affectés par la carence alors qu'au niveau du cervelet ce sont les femelles les plus touchées. Ces observations soulignent la sensibilité variable des structures cérébrales à différents stress en fonction du sexe de l'individu (*Cohen et Yehuda, 2011*). La littérature décrit de nombreux travaux en rapport avec ce dimorphisme sexuel, mentionnant soit l'implication des hormones sexuelles, le rôle de la génétique ou d'autres facteurs soulignant cette différence notamment dans diverses pathologies (*pour revue*

Ngun et al., 2011). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'implication des hormones, notamment des œstrogènes par l'intermédiaire de l'un de ses récepteurs, ERα, afin de comprendre ces différences dans nos observations. Ainsi, nous avons montré, au niveau du cervelet, que la diminution de la SAM suite à la carence engendrait une hyporégulation de PRMT1-SAM dépendante. La dynamique fonctionnelle nucléaire ou cytoplasmique d'ERα dépend de sa méthylation et, dans notre modèle, la cascade mécanistique conduisant à l'expression et à l'activation des synapsines dépendant d'ERα s'en trouve altérée.

Ces associations de l'homocystéine avec l'apoptose, les désorganisations structurales, les retards de maturation et des altérations de la plasticité synaptique vont perturber la mise place des différents réseaux neuronaux au cours du développement cérébral et, secondairement, peut aboutir à un retard dans l'acquisition de différents comportements, ainsi que nous l'avons observé. Au moment du sevrage, nous avons pu montrer que les rats carencés présentaient tous un retard dans leurs capacités de coordination locomotrice (Righting reflex, test de suspension) et d'apprentissage-mémorisation spatiale (Homing) par comparaison aux animaux témoins du même âge. A cet égard, différentes études ont montré, tant chez l'homme (*Barbaux et al., 2000*) que chez l'animal (*Lee et al., 2005 ; Lalonde et al., 2008*), qu'il existait une diminution des capacités cognitives et des aptitudes motrices en réponse à une élévation de la concentration en homocystéine. Nous nous sommes délibérément intéressé aux effets neurotoxiques d'une carence en donneurs de méthyles mais il ne faut pas oublier que de nombreuses études mentionnent les effets d'une hyperhomocystéinémie sur la composante vasculaire du cerveau qui, associés aux effets sur le tissu cérébral, participent aux perturbations motrices et cognitives (*Tyagi et al., 2005 ; Troen et al., 2008 ;Abdulle et al., 2010*).

2. Vieillissement cérébral

Les carences en vitamines du groupe B associées à une hyperhomocystéinémie sont connues pour être des facteurs de risques dans l'accélération de la survenue de différentes pathologies liées au vieillissement et du déclin cognitif (*Mattson et Shea, 2003*). Les différentes études de supplémentation en folates ou vitamine B12 chez les personnes âgées donnent des résultats mitigés, souvent contradictoire sur les améliorations fonctionnelles cérébrales (*Malouf et al., 2003 ; Durga et al., 2007. Ford et al., 2010*). Ces différences d'efficacité rapportées lors de ces études observationnelles ne trouvent guère d'explication. Or, depuis l'hypothèse de Barker (1992), il a été montré que la survenue de différentes pathologies pouvait avoir comme origine des altérations très précoces, conduisant à enclencher ou potentialiser une maladie sous-jacente. C'est à partir de ce postulat que nous sous sommes intéressés au statut fonctionnel du cerveau des individus âgés exposés à une carence précoce, en particulier au niveau de l'hippocampe, siège de nombreux processus cognitifs.

Un retour à une alimentation normale à partir de l'âge de 21 jours a permis de rétablir les différents paramètres métaboliques affectés par la carence, tels que les concentrations en folates, vitamine B12, homocystéine même si cette dernière demeure significativement augmentée chez les femelles, sans atteindre les valeurs observées précédemment, ainsi que l'expression des enzymes clés du métabolisme de l'homocystéine et les marqueurs de

neuroplasticité. Ces observations suggèreraient une amélioration potentielle des problèmes que peut générer un contexte d'hyperhomocystéinémie. Toutefois, à 450 jours, de nombreuses altérations persistent mais touchent uniquement les femelles précédemment exposées à la carence. En effet, l'étude de l'évolution de la masse corporelle montre que seules les femelles préalablement carencées affichent un poids significativement inférieur à leurs témoins. De plus, les études histopathologiques montrent une atrophie persistante de la couche CA1 et une diminution du nombre de cellule de Purkinje chez ces femelles carencées, phénomène déjà présent à 21 jours. Ceci suggère une plus grande sensibilité des femelles à la carence. Malgré le retour à un régime normal au moment du sevrage, le cerveau ne semble pas en mesure de restaurer complètement les structures lésées par la carence. L'hippocampe et le cervelet ne possèdent pas la même fenêtre temporelle de maturation qui est bien plus longue pour le cervelet (jusqu'à 90 jours postnatals) mais le fait que la carence a été maintenue pendant toute la vie fœtale puis jusqu'au sevrage, a perturbé les mécanismes intrinsèques de maturation des deux structures. L'interaction avec l'environnement va influencer l'homéostasie cérébrale qui va façonner les circuits cérébraux. Les influences des paramètres maternels assurant un bon développement à la progéniture, notamment sur le plan nutritionnel (*Mihaila et al., 2011 ; Tomat et al., 2011*), ont une importance toute particulière durant la période périnatale qui est qualifiée de « période critique ». Dans ce laps de temps, le système nerveux est particulièrement vulnérable à toutes ces altérations (*Cioni et al., 2011*). La survenue de perturbations lors de périodes critiques sont non seulement perceptibles à des stades précoces mais leurs conséquences peuvent être à l'origine de diverses pathologies (métaboliques, neurologiques, cardiovasculaires, cancer…) survenant à l'âge adulte ou lors du vieillissement (*Dyer et Rosenfeld, 2011 ; Ritz et al., 2011 ; Doherty et al., 2010*). Les mécanismes sous-jacents mettent en évidence la programmation fœtale (*Barker, 1992*) dont les conséquences ont pour origine une sous-nutrition chez la femme enceinte ou allaitante. En outre, ces derniers résultats montrent que notre modèle animal constitue un bon modèle pour l'étude de la programmation fœtale. Les différents tests comportementaux que nous avons utilisés confirment les données structurales. D'un point de vue cognitif, les rats exposés à la carence présentent un niveau de performance diminué par rapport aux témoins dans un test d'apprentissage (navigation spatiale) réalisé entre 40 et 50 jours d'âge. Les animaux montrent un succès dans l'acquisition de la tâche, mais nécessitent pour cela près de 20% d'essais supplémentaires par rapport aux témoins. Par ailleurs, les investigations effectuées dans le cadre des processus de rappel mnésique (à l'issue de la période d'apprentissage) montrent un taux de réussite significativement réduits chez les rats carencés femelles, quels que soient le nombre d'essais et l'âge (animaux testés à l'âge de 80 à 450 jours). On ne retrouve pas de différence significative chez les mâles. La perturbation de la mémoire spatiale est un bon exemple des altérations que subit l'hippocampe chez les personnes sénescentes (*Rosenzweig et Barnes, 2003 ; Burke et Barnes, 2006*). En ajustant le nombre d'erreurs lors des séances de mémorisation avec le sexe de l'individu et son régime originel, on constate que les rats femelles témoins commettent moins d'erreurs que leurs homologues masculins. Or, il est connu que les femmes présentent un vieillissement cérébral physiologique de meilleure qualité que les hommes, notamment grâce aux effets neuroprotecteurs des œstrogènes (*Sherwin et Henry, 2008*). Lorsqu'on compare les profils des animaux, les données montrent que les mâles carencés ont tendance à rejoindre les performances des rats mâles témoins alors

que les femelles carencées ont toujours davantage de difficultés que les témoins. Au regard de tous ces résultats, nous avons montré pour la première fois qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles potentialisait les effets du vieillissement cérébral.

Partie 2 : Le conditionnement hypoxique néonatal

Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré qu'une hypoxie brève chez le rat nouveau-né n'avait aucune influence apparente sur le développement cérébral ultérieur. Ce traitement n'induit pas de lésions cellulaires, quel que soit l'aire cérébrale considérée. En revanche, l'épisode hypoxique a pour conséquence de stimuler, dans les semaines qui suivent l'exposition, la production de nouveaux neurones fonctionnels dans des sites neurogéniques spécifiques, en particulier le gyrus denté de l'hippocampe et la zone subventriculaire qui borde le ventricule latéral. L'apport de cette neurogenèse est susceptible d'engendrer l'incorporation de nouvelles cellules dans les circuits de l'hippocampe. Enfin, il a été montré que cette neurogenèse induite par l'hypoxie est associée à une amélioration des scores enregistrés dans des tests cognitifs en lien avec les capacités de mémorisation (*Pourié et al.., 2006)*.

1. A l'âge adulte

Sous les conditions d'anoxie utilisées (atmosphère totalement dépourvu d'oxygène), les rats nouveau-nés développent une hypoxémie et une hypoxie tissulaire modérée mesurée dans le cerveau (*Grojean et al., 2003*). Comme il a été décrit précédemment, ce stimulus induit une tolérance cérébrale. Hors très peu d'études se sont intéressées aux conséquences à long terme de ce type de phénomène comparativement aux nombreuses études sur l'hypoxie sévère. Comme pour la carence, la fenêtre temporelle dans laquelle a été induite l'hypoxie correspond à une période critique du développement. En effet, 24 heures après la naissance, le cerveau est encore dans un processus de maturation notamment l'hippocampe qui à cette période ne possède pas sa structure définitive en terme de plasticité et de fonctionnement (*Leinekuge, 2003 ; Ambrogini et al., 2004*). Le conditionnement hypoxique a donc été associé à des bénéfices fonctionnels chez les jeunes rats. En accord avec les précédentes études l'incorporation des neurones nouvellement formés dans l'hippocampe n'induit pas d'altérations des capacités d'apprentissage, comme illustré dans la première phase du labyrinthe multi T où on ne retrouvent aucune différence entre témoins et animaux « hypoxiques ».Lorsque nous avons initié ce travail, le devenir de ces cellules issues d'une neurogenèse endogène et intégrées dans la structure hippocampique n'étaient pas connues. Nos premiers travaux ont porté sur des rats âgés entre 40 et 100 jours, correspondant respectivement à une période de la vie situé entre la puberté et le jeune adulte. La littérature mentionne que le sexe est un facteur important vis-à-vis d'atteinte cérébrale du type hypoxie ischémie dans la sévérité des lésions qui en résultent (*Lang et McCullough, 2008*). Suite à un test évaluant la mémoire spatiale, nous avons mis en évidence ce dimorphisme sexuel suite au conditionnement hypoxique. En effet, alors que les femelles hypoxiques sont plus performantes à 40 jours, les mâles hypoxiques sont quant à eux plus performants à 100 jours (*Martin et al., 2010*).

En accord avec ces observations fonctionnelles, l'analyse de l'hippocampe a montré que l'hypoxie était associée à une augmentation significative de l'épaisseur de la zone CA3 uniquement chez les femelles à 40 jours. A 100 jours en corrélation avec de meilleures performances cognitives chez les mâles, ce sont chez les mâles que l'épaisseur des couches est augmentée dans la zone CA1 et le gyrus denté. L'étude de l'apoptose confirme également les données comportementales. En effet il a été montré une mort cellulaire plus importante à 40 jours dans le cortex frontale des mâles hypoxiques, structure connu comme être une des zones de stockage des informations, alors qu'à 100 jours on retrouve au contraire une diminution de l'apoptose dans le gyrus denté. Ces données suggèrent que l'hypoxie pourrait agir sur deux mécanismes fondamentaux qui sont la prolifération et la mort neuronale. On a pu également constater une réorganisation phénotypique neuronale illustrée notamment par un accroissement du nombre de cellules glutamatergiques respectivement chez les femelles à 40 jours et chez les males à 100 jours post-hypoxie. D'autres études ont montré une différence de sexe au niveau des systèmes neurochimiques (*Siddiqui et Shah, 1997, Nishizawa et al., 1997 ; Rhodes et Rubin, 1999*). Ces différences ont pour conséquence une modulation des comportements en fonction de la régulation de certains processus cognitifs (*Voyer et al., 1995 ; Ullman, 2004 ; Hartshorne et Ullman, 2006*).

2. Le vieillissement

Le vieillissement est souvent associé à une dégénérescence globale au niveau cérébral lequel inclut de nombreux mécanismes physiologiques. Selon la sévérité de ces phénomènes, différents stades peuvent être observé allant du simple oublie à l'apparition de maladies neurodégénératives conduisant à des démences sévères. En clinique, différents critères ont été établis afin de qualifier le déclin cognitif lié à l'âge. Ces critères prennent notamment en compte le nombre de type de mémoire perturbé, la durée du trouble et la présence ou non d'atteintes du système nerveux central (critères du DSM IV). Par ailleurs, il est connu que le déclin fonctionnel consécutif à l'âge est plus prononcé chez les mâles que chez les femelles (*Glenn et al., 2008*). Nous avons tout d'abord caractérisé les événements cellulaires et moléculaires susceptibles de présider aux effets bénéfiques du conditionnement hypoxique. Les données montrent que la voie de survie impliquant la protéine AKT ne semble pas être impliquée dans les mécanismes sous-jacents induits par l'hypoxie. Du ce fait, nous nous sommes donc intéressés à deux phénomènes : l'apoptose et la prolifération cellulaire. Il a été mesuré une diminution significative de l'apoptose au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe. Ce résultat a été confirmé par l'étude de la *Death-associated protein kinase, kinase* (Dapk) impliquée dans l'épuration de cellules non fonctionnelles au cours du développement (*Bialik et Kimchi, 2006*) qui montre une diminution de son expression et de son activation dans l'hippocampe quelques heures après l'induction du conditionnement hypoxique. Ces données montrent que le cerveau réagit à l'hypoxie brève en limitant la mort cellulaire notamment celle liée à la Dapk. Ceci a été confirmé par la diminution d'autres protéines en lien avec la mort cellulaire comme p38. Par ailleurs, il a été observé une augmentation du nombre de cellules BrdU+ qui est maximale à 20 jours post-hypoxie dans la SVZ, signifiant la production de nouvelles cellules.

Afin d'identifier les effets à long terme, nous avons procédé à un suivi des animaux jusqu'au stade de sénescence. Par ailleurs, il est connu que le déclin fonctionnel consécutif à l'âge (sénescence) est plus précoce chez les mâles que chez les femelles (*Glenn et al., 2008*). Il apparaît que les mâles ayant été exposés à l'hypoxie néonatale présentent une réduction significative de 13 à 56% des effets de la sénescence sur les processus de rappel de la mémoire par rapport aux témoins.

En fait, à l'âge de 540 à 720 jours, les mâles précédemment exposés à l'hypoxie présentent des scores comparables aux femelles témoins du même âge, ce qui suggère un décalage temporel de la survenue des conséquences de la sénescence. Les investigations histopathologiques cérébrales montrent que les rats mâles hypoxiques âgés conservent une macrostructure tissulaire significativement meilleure que leurs témoins du même âge, notamment dans la zone CA1 de l'hippocampe. De plus, ces rats présentent une apoptose réduite à l'âge de 2 ans (720 jours) par comparaison aux témoins. L'utilisation de marqueurs spécifiques pour déterminer les phénotypes neuronaux montre, en outre, qu'en fonction des zones cérébrales considérées (Corne d'Ammon de l'hippocampe, gyrus denté, cortex frontal) les mâles hypoxiques âgés présentent des densités neuronales glutamatergique, cholinergique, dopaminergiques ou GABAergique significativement supérieures aux témoins. Par ailleurs, la révélation de différents marqueurs du vieillissement cérébral, tels que l'homocystéine, la "*Myelin basic protein*", le marqueur d'inflammation Ox6, montrent que les rats mâles hypoxiques âgés de 2 ans, présentent des réseaux neuronaux mieux préservés, comparativement aux témoins du même âge. De plus, nous avons également montré une meilleure conservation de la fonctionnalité synaptique par l'intermédiaire de l'augmentation de l'expression et de l'activité des synapsines chez les hypoxiques.

Ainsi, on peut considérer que la neurogenèse post-hypoxique procure à certaines zones cérébrales parmi les plus fragiles et les plus sensibles aux effets du vieillissement (comme l'hippocampe) des neurones surnuméraires fonctionnels susceptibles de maintenir ces zones en activité plus longtemps et de conserver cette activité au-dessus d'un certain seuil minimum, associé à un déclin cognitif. L'activité des réseaux nerveux tout au long de la vie les rendraient moins sensibles aux effets délétères du vieillissement (*Schulte-Herbrüggen et al., 2007*). Ce mécanisme neuroprotecteur est à relier à ceux déjà documentés dans le cas d'expositions à un environnement enrichi capables de favoriser les fonctions cognitives par la stimulation environnementale et donc de maintenir une activité cérébrale adaptée (*Leal-Galicia et al., 2008*).

Partie 3 : Programmation fœtale et vieillissement cérébral

Dans notre approche scientifique, cette association se justifie par les mécanismes antagonistes mis en place par ces deux facteurs. En effet, nous avons montré qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles entraînait diverses altérations d'ordre structural et fonctionnel à des temps précoces dont les conséquences étaient encore perceptibles lors du vieillissement, intensifiant alors les effets néfastes. Au contraire, un conditionnement cérébral par l'hypoxie avait des conséquences bénéfiques, notamment par stimulation de la neurogenèse. De plus, des études antérieures menées au laboratoire ont montré qu'à court terme l'association hypoxie-carence réduisait les lésions structurales de la couche CA1 de l'hippocampe en compensant la perte cellulaire engendrée par la carence. Enfin, les tests comportementaux menés entre 19 et 21 jours sur la coordination motrice et entre 80 et 84 jours pour les capacités cognitives ont montré de meilleurs scores chez les animaux « hypoxie-carencés » comparé aux carencés, rejoignant même les bonnes performances des animaux témoins au même âge (*Blaise et al., 2009*). A notre connaissance, aucune étude n'avait testé si un éventuel effet protecteur neurogenèse-dépendant au cours de cette période critique pouvait s'opposer à une atteinte secondaire vécue dans cette même période critique. De plus, une autre question reste en suspens : cette neuroprotection est-elle suffisamment efficace pour modifier les conséquences d'une perturbation de la programmation fœtale sur le vieillissement ?

Morphologiquement, l'hypoxie semblerait atténuer les effets de la carence sur l'évolution de la masse corporelle. En effet, les femelles du groupe « carence-hypoxie » rattrapent le poids des témoins à partir de 330 jours, âge qui marque le début du vieillissement. La littérature mentionne une régulation du facteur de transcription HIF sur les gènes POMC (proopiomelanocortin) (*Zhang et al., 2011*) dans les neurones à POMC situé dans l'hypothalamus qui sont des senseurs de la glycémie hypothalamique et impliqués dans la prise alimentaire (*Parteur et al., 2007*). Les dosages de vitamines B9 et B12 ne révèlent pas de différences à 80, 205 et 330 jours chez les mâles, alors que la concentration de B12 est significativement augmentée chez les femelles du groupe « carence-hypoxie » à 205 jours. Ces résultats contrastent avec les données issues de l'étude des conséquences de la carence où il n'était retrouvé aucune différence. Des travaux précédents mentionnent sur des rats de 21 jours qui ont subi les mêmes traitements une potentialisation par l'hypoxie des effets de la carence sur le métabolisme des monocarbones, illustré par une accentuation de la baisse du ratio SAM/SAH en relation avec une baisse d'activité de la cystathionine β-synthase qui est impliquée dans la voie de dégradation de l'homocystéine dans le foie (*Blaise et al., 2005 ; 2008*).

A 450 jours, nous observons également l'expression de la cystathionine β-synthase et la méthionine synthase dans toutes les structures de l'hippocampe. Toutefois, à l'heure actuelle, nous n'avons pas été en mesure de quantifier les taux d'homocystéine plasmatique et tissulaire, ainsi que l'activité des enzymes clés du métabolisme des monocarbones. Au niveau structural, il semblerait que le conditionnement hypoxique s'opposerait aux effets délétères anatomomorphologiques de la carence en donneurs de méthyles à 450 jours chez les rats femelles chez lesquelles il avait été observé une atrophie de la zone CA1 de l'hippocampe dans le groupe carencé. Ces données confirment l'étude de Nakatomi *et al.* (2002) qui montre l'intégration de progéniteurs neuronaux dans des structures cérébrales lésées. En lien avec l'augmentation significative du taux de la vitamine B12 et une légère augmentation du taux de folates chez les femelles du groupe « hypoxie-carence », il est envisageable que ce surplus de cobalamine et d'acide folique représenterait une forme de stockage afin de permettre au cerveau de mettre en place des mécanismes de protection (*Biasco et al., 1997 ; Craciunescu et al., 2004 ; Khosraviani et al., 2002 ; Kruman et al., 2005*).

En lien avec ces données structurales, la tolérance cérébrale en relation avec l'hypoxie néonatale atténue les conséquences comportementales de la carence en donneurs de méthyles sur le vieillissement hippocampique. En effet, aucune différence n'a été observée lors de tests cognitifs, contrairement à ce qui avait été observé dans les groupes carencés. Ce résultat confirme l'hypothèse qu'un conditionnement par une hypoxie néonatale brève non seulement procure une meilleure résistance au vieillissement cérébral, mais serait capable de compenser les effets délétères d'une carence en donneurs de méthyles sur le vieillissement (*Martin et al., article soumis*).

PERSPECTIVES

Les travaux ont mis en évidence l'effet d'une carence en donneurs de méthyles sur la maturation et le vieillissement cérébral. Cependant, plusieurs questions demeurent. L'observation d'une « queue tordue » à la naissance réfère comme nous l'avons dit précédemment à une malformation du type spina bifida. En outre, dans notre modèle, la carence en vitamine B9 et B12 débute un mois avant l'accouplement et se poursuit lors du développement embryonnaire et fœtal. Cette fenêtre temporelle est en corrélation avec les études épidémiologiques de supplémentation en folates dès la période péri-conceptionnelle afin de limiter le risque d'anomalies de fermeture du tube neural. De ce fait, il serait intéressant de savoir si les effets de la carence que nous avons décrits à un stade plus tardif sont déjà présents *in utéro*. L'étude des mécanismes sous-jacents en lien avec une carence en donneurs de méthyles sur les gènes du développement embryonnaire permettrait de déterminer l'influence de la carence sur la mise en place du système nerveux central.

Il a été montré très récemment au laboratoire que la carence en donneurs de méthyles produisait des troubles du métabolisme oxydatif en lien avec des dysrégulations épigénomiques de récepteurs nucléaires *(Moreno-Garcia et al., 2011)*. Ces dysrégulations inhibent l'oxydation mitochondriale des acides gras, d'où l'existence d'une stéatose hépatique et myocardique. Ces résultats laissent supposer qu'une surnutrition chez l'animal carencé en donneurs de méthyles peut induire un fort déséquilibre du métabolisme énergétique similaire à celui observé dans le syndrome métabolique. Le syndrome métabolique n'est pas une pathologie en soi mais désigne plutôt la présence d'un ensemble de signes physiologiques qui accroissent le risque de diabète de type 2, de maladies cardiaques et d'accident vasculaire cérébral. De nombreux travaux ont établi un lien entre la programmation fœtale et le syndrome métabolique *(de Gusmão Correia et al., 2011 ; Lau et al., 2011)*. Parallèlement, les conséquences du métabolisme énergétique au niveau d'un organe consommateur de glucose, tel que le cerveau, méritent d'être étudiées par rapport à l'installation de mécanismes d'insulino-résistance, des altérations de la neuroplasticité et des effets des peptides neurogéniques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et du comportement alimentaire. Il serait donc intéressant d'étudier l'influence combinée d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles suivie d'une autre période de carence et/ou de surnutrition à l'âge jeune adulte, dans la prédiction et les mécanismes physiopathologiques des troubles de la cognition et du syndrome métabolique.

Dans le cas de lésions sévères (accident vasculaire cérébral de type ischémique ou hémorragique, traumatisme crânien…), le cerveau n'est pas capable de compenser la perte neuronale dont les conséquences fonctionnelles sont très invalidantes en fonction de la sévérité et de la localisation des atteintes. Or, dans le cas de lésions du système nerveux périphérique, l'avènement de la microchirurgie et une meilleure compréhension de la nature de ces préjudices ont permis de mettre en place une technique appelée « neurotisation » qui consiste à greffer un nerf sain en lieu du nerf lésé. Cette technique met en évidence la capacité du système nerveux périphérique après lésion à se réorganiser via un mécanisme de régénération dont les cellules de Schwann et la qualité de la lame basale sont des facteurs

déterminants. Cette différence de réaction cellulaire observée entre les systèmes nerveux central et périphérique n'est pas encore complètement comprise, mais pourrait être attribuée à des facteurs libérés par les nerfs périphériques lésés ; ces facteurs permettraient de réactiver des gènes de croissance mais aideraient également l'axone à lutter contre l'action inhibitrice de certaines molécules.

Nos travaux concernant le conditionnement hypoxique ont confirmé que le cerveau avait des capacités intrinsèques de plasticité pour réagir à d'éventuelles atteintes modérées, notamment par l'activation de la voie ERK et l'inhibition de la voie p38. Or, l'utilisation de l'hypoxie en clinique n'est pas envisageable. Mais de nombreux travaux ont associé des neurotrophines telles que le BDNF et *(brain-derived neurotrophic factor)* et la NT-3 (neurotrophine-3) à la stimulation de la neurogenèse, notamment via l'activation de voies telles que MEK-ERK (*Barnabe-Heider et Miller, 2003 ; Kobilo et al., 2011*). L'intérêt serait d'étudier l'utilisation soit de facteurs stimulant la libération endogène de ces neurotrophines, soit l'administration directe de ces neurotrophines dans les zones germinatives suite à un traumatisme cérébral. L'objectif étant de stimuler une neurogenèse endogène suffisante qui serait capable de compenser les pertes cellulaires et les conséquences fonctionnelles de ce genre d'altération.

Références bibliographiques

MRC.(1991). "Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group." Lancet **338**(8760): 131-137.

Abbott, L. C. and C. Sotelo (2000). "Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices." J Comp Neurol **426**(2): 316-329.

Abdulle, A. M., J. Y. Pathan, et al. (2010). "Association between homocysteine and endothelial dysfunction markers in stroke disease." Nutr Neurosci **13**(1): 2-6.

Agarwal, S. and R. S. Sohal (1994). "Aging and protein oxidative damage." Mech Ageing Dev **75**(1): 11-19.

Ahmed, S., A. Rahman, et al. (2002). "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes." Free Radic Biol Med **33**(8): 1097-1105.

Ahmed, S. H., Y. Y. He, et al. (2000). "Effects of lipopolysaccharide priming on acute ischemic brain injury." Stroke **31**(1): 193-199.

Akbulut, S., E. Altiparmak, et al. (2010). "Increased levels of homocysteine in patients with ulcerative colitis." World J Gastroenterol **16**(19): 2411-2416.

Akchiche, N., C. Bossenmeyer-Pourie, et al. (2010). "Differentiation and neural integration of hippocampal neuronal progenitors: signaling pathways sequentially involved." Hippocampus **20**(8): 949-961.

Aketa, S., H. Nakase, et al. (2000). "Chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid in gerbil hippocampal slices: therapeutic window and the participation of adenosine receptor." Exp Neurol **166**(2): 385-391.

Alam, Z., N. Coombes, et al. (1998). "Plasma levels of neuroexcitatory amino acids in patients with migraine or tension headache." J Neurol Sci **156**(1): 102-106.

Algaidi, S. A., L. A. Christie, et al. (2006). "Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity." Exp Neurol **197**(1): 8-21.

Allen, R. H., B. Seetharam, et al. (1978). "Correction of cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency with a cobalamin analogue that binds with high affinity to R protein but not to intrinsic factor. In vivo evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency." J Clin Invest **61**(6): 1628-1634.

Alpert, J. E., D. Mischoulon, et al. (2000). "Nutrition and depression: focus on folate." Nutrition **16**(7-8): 544-546.

Al-Sarraj, A., R. M. Day, et al. (2005). "Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1." J Cell Biochem **94**(1): 153-167.

Altman, J. (1962). "Are new neurones formed in the brain of adults mammals ." Science **135**: 1127-8.

Altman, J. (1969). "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats." J Comp Neurol **136**(3): 269-293.

Altman, J. (1972)a. "Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer." J Comp Neurol **145**(4): 465-513.

Altman, J. (1972)b. "Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer." J Comp Neurol **145**(3): 353-397.

Altman, J. (1972)c. "Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer." J Comp Neurol **145**(4): 399-463.

Altman, J. and S. A. Bayer (1990). "Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale." J Comp Neurol **301**(3): 343-364.

Altman J, Bayer SA (1997).Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Functions. New York: CRC Press

Alvarez-Buylla, A., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). "A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells." Nat Rev Neurosci **2**(4): 287-293.

Amaral, D. G. and J. Kurz (1985). "The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampal formation of the rat." Neurosci Lett **59**(1): 33-39.

Amaral, D. G. and Witter, M. P **(**1995): The hippocampal formation. In: The rat nervous system, 2nd ed (Paxinos G, ed), San Diego: Academic Press, 443-493

Ambrogini, P., D. Lattanzi, et al. (2004). "Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus." Brain Res **1017**(1-2): 21-31.

Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-7922.

Andersen, B. B., H. J. Gundersen, et al. (2003). "Aging of the human cerebellum: a stereological study." J Comp Neurol **466**(3): 356-365.

Andersson, A., L. Brattstrom, et al. (1992). "Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status." Eur J Clin Invest **22**(2): 79-87.

Anderton, B. H. (1997). "Changes in the ageing brain in health and disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1363): 1781-1792.

Anderton, B. H. (2002). "Ageing of the brain." Mech Ageing Dev **123**(7): 811-817.

Andres, E., N. H. Loukili, et al. (2004). "Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients." CMAJ **171**(3): 251-259.

Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, et al. (1995). "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." Neuron **15**(4): 961-973.

Annapurna, V. V., Y. G. Deosthale, et al. (1991). "Spirulina as a source of vitamin A." Plant Foods Hum Nutr **41**(2): 125-134.

Anstey, K. J., C. von Sanden, et al. (2007). "Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies." Am J Epidemiol **166**(4): 367-378.

Applegate MD,Campbell G, Landfield PW (1984). Reorganization of ultrastructure in aging rat hippocampus: a stereological analysis. Soc.Neurosci. Abstr. 10, 450.

Archer, T. (2011). "Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease." Acta Neurol Scand **123**(4): 221-238.

Atamna, H. (2004). "Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing." Ageing Res Rev **3**(3): 303-318.

Ayav, A., J. M. Alberto, et al. (2005). "Defective remethylation of homocysteine is related to decreased synthesis of coenzymes B2 in thyroidectomized rats." Amino Acids **28**(1): 37-43.

Azizi, Z. A., A. Zamani, et al. (2010). "Effects of hyperhomocysteinemia during the gestational period on ossification in rat embryo." Bone **46**(5): 1344-1348.

Bach, M. E., M. Barad, et al. (1999). "Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5280-5285.

Baddeley AD, Hitch GJ (1974) Working memory. In: Recent Advances in Learning and Motivation (Bower GA, ed), pp 47-89. New York: Academic Press.

Baddeley, A. (1988). "Cognitive psychology and human memory." Trends Neurosci **11**(4): 176-181.

Bakalian, A., B. Corman, et al. (1991). "Quantitative analysis of the Purkinje cell population during extreme ageing in the cerebellum of the Wistar/Louvain rat." Neurobiol Aging **12**(5): 425-430.

Balk, E. M., G. Raman, et al. (2007). "Vitamin B6, B12, and folic acid supplementation and cognitive function: a systematic review of randomized trials." Arch Intern Med **167**(1): 21-30.

Banerjee, R. and C. G. Zou (2005). "Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein." Arch Biochem Biophys **433**(1): 144-156.

Barak, A. J. and H. C. Beckenhauer (1988). "The influence of ethanol on hepatic transmethylation." Alcohol Alcohol **23**(1): 73-77.

Barbaux, S., R. Plomin, et al. (2000). "Polymorphisms of genes controlling homocysteine/folate metabolism and cognitive function." Neuroreport **11**(5): 1133-1136.

Barja, G. (2004). "Free radicals and aging." Trends Neurosci **27**(10): 595-600.

Barker, D. J. and C. Osmond (1986). "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales." Lancet **1**(8489): 1077-1081.

Barker, D. J. (1992). "The fetal origins of adult hypertension." J Hypertens Suppl **10**(7): S39-44.

Barker, D. J., C. Osmond, et al. (1993). "The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life." BMJ **306**(6875): 422-426.

Barks, J. D. and F. S. Silverstein (1992). "Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury." Brain Pathol **2**(3): 235-243.

Barnabe-Heider, F. and F. D. Miller (2003). "Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways." J Neurosci **23**(12): 5149-5160.

Barnes, C. A. (1979). "Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat." J Comp Physiol Psychol **93**(1): 74-104.

Barnes, C. A., E. J. Green, et al. (1987). "Behavioural and neurophysiological examples of functional sparing in senescent rat." Can J Psychol **41**(2): 131-140.

Barnes, C. A. and B. L. McNaughton (1985). "An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses." Behav Neurosci **99**(6): 1040-1048.

Barnes CA, McNaughton BL., (1980). Spatial memory and hippocampal synaptic plasticity in middle-aged and senescent rats. In: Stein, D. (Ed.), Psychobiology of Aging: Problems and Perspectives. Elsevier, New York, pp. 253–272

Barnes, C. A., L. Nadel, et al. (1980). "Spatial memory deficit in senescent rats." Can J Psychol **34**(1): 29-39.

Barnes, C. A., G. Rao, et al. (2000). "LTP induction threshold change in old rats at the perforant path--granule cell synapse." Neurobiol Aging **21**(5): 613-620.

Barnes, C. A., G. Rao, et al. (1997). "Age-related decrease in the N-methyl-D-aspartateR-mediated excitatory postsynaptic potential in hippocampal region CA1." Neurobiol Aging **18**(4): 445-452.

Barone, F. C., R. F. White, et al. (1998). "Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression." Stroke **29**(9): 1937-1950; discussion 1950-1931.

Basovich, S. N. (2010). "The role of hypoxia in mental development and in the treatment of mental disorders: a review." Biosci Trends **4**(6): 288-296.

Batini, C., J. Corvisier, et al. (1976). "The climbing fibers of the cerebellar cortex, their origin and pathways in cat." Exp Brain Res **26**(4): 407-422.

Baughman, V. L., W. E. Hoffman, et al. (1988). "Neurologic outcome in rats following incomplete cerebral ischemia during halothane, isoflurane, or N2O." Anesthesiology **69**(2): 192-198.

Baulieu, E. E., P. Robel, et al. (2001). "Neurosteroids: beginning of the story." Int Rev Neurobiol **46**: 1-32.

Baydas, G., M. Ozer, et al. (2005). "Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats." Brain Res **1046**(1-2): 187-194.

Bayer, S. A. (1980). "Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life." J Comp Neurol **190**(1): 115-134.

Beach, R. L., S. L. Bathgate, et al. (1982). "Identification of cell types in rat hippocampal slices maintained in organotypic cultures." Brain Res **255**(1): 3-20.

Beatty, W. W., B. A. Clouse, et al. (1987). "Effects of long-term restricted feeding on radial maze performance by aged rats." Neurobiol Aging **8**(4): 325-327.

Beck, T., D. Lindholm, et al. (1994). "Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus." J Cereb Blood Flow Metab **14**(4): 689-692.

Beck, W. S. and S. Ochoa (1958). "Metabolism of propionic acid in animal tissues. IV. Further studies on the enzymatic isomerization of methylmalonyl coenzyme A." J Biol Chem **232**(2): 931-938.

Behl, C. (2002). "Oestrogen as a neuroprotective hormone." Nat Rev Neurosci **3**(6): 433-442.

Benarroch, E. E. (2005). "Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system." Mayo Clin Proc **80**(10): 1326-1338.

Benson, R. E. and C. A. Hall (1972). "The effects of common salts on the Euglena gracilis bioassay of vitamin B 12." Proc Soc Exp Biol Med **139**(4): 1096-1099.

Benson, R. E., M. E. Rappazzo, et al. (1972). "Late transport of vitamin B 12 by transcobalamin II." J Lab Clin Med **80**(4): 488-495.

Benveniste, H., J. Drejer, et al. (1984). "Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis." J Neurochem **43**(5): 1369-1374.

Bergamini, C. M., S. Gambetti, et al. (2004). "Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage." Curr Pharm Des **10**(14): 1611-1626.

Bergeron, M., J. M. Gidday, et al. (2000). "Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain." Ann Neurol **48**(3): 285-296.

Bernaudin, M., A. S. Nedelec, et al. (2002). "Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain." J Cereb Blood Flow Metab **22**(4): 393-403.

Bertoni-Freddari, C., C. Giuli, et al. (1986). "Quantitative investigation of the morphological plasticity of synaptic junctions in rat dentate gyrus during aging." Brain Res **366**(1-2): 187-192.

Bhave, S. V., L. Ghoda, et al. (1999). "Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action." J Neurosci **19**(9): 3277-3286.

Bialik, S. and A. Kimchi (2006). "The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond." Annu Rev Biochem **75**: 189-210.

Biasco, G., U. Zannoni, et al. (1997). "Folic acid supplementation and cell kinetics of rectal mucosa in patients with ulcerative colitis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(6): 469-471.

Bibel, M. and Y. A. Barde (2000). "Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system." Genes Dev **14**(23): 2919-2937.

Bickford-Wimer, P. C., A. C. Granholm, et al. (1988). "Cerebellar noradrenergic systems in aging: studies in situ and in in oculo grafts." Neurobiol Aging **9**(5-6): 591-599.

Bickford, P. (1993). "Motor learning deficits in aged rats are correlated with loss of cerebellar noradrenergic function." Brain Res **620**(1): 133-138.

Bickford, P. C., T. Gould, et al. (2000). "Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats." Brain Res **866**(1-2): 211-217.

Black, M. M. (2008). "Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children." Food Nutr Bull **29**(2 Suppl): S126-131.

Blackett, A. D. and D. A. Hall (1981). "Vitamin E--its significance in mouse ageing." Age Ageing **10**(3): 191-195.

Blaise, S., J. M. Alberto, et al. (2005). "Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats." Pediatr Res **57**(6): 777-782.

Blaise, S. A., E. Nedelec, et al. (2007). "Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats." Am J Pathol **170**(2): 667-679.

Blaise, S. A., J. M. Alberto, et al. (2007). "Influence of preconditioning-like hypoxia on the liver of developing methyl-deficient rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(6): E1492-1502.

Blaise, S. A., E. Nedelec, et al. (2009). "Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis." Exp Neurol **216**(1): 231-238

Blandini, F., R. Fancellu, et al. (2001). "Plasma homocysteine and l-dopa metabolism in patients with Parkinson disease." Clin Chem **47**(6): 1102-1104.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.

Blondeau N and Heurteaux C (2004). La tolérance cérébrale : un choix prometteur vers de nouvelles thérapies contre les maladies neurologique. Med Sci (Paris) 2004 ; 20 : 1109–1114

Bondy, S. C., D. K. Lahiri, et al. (2004). "Retardation of brain aging by chronic treatment with melatonin." Ann N Y Acad Sci **1035**: 197-215.

Bosco, P., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2003). "Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome." Am J Med Genet A **121A**(3): 219-224.

Bossenmeyer, C., R. Chihab, et al. (1998). "Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in cultured rat brain neurons." Brain Res **787**(1): 107-116.

Bossenmeyer-Pourie, C., R. Chihab, et al. (1999). "Transient hypoxia may lead to neuronal proliferation in the developing mammalian brain: from apoptosis to cell cycle completion." Neuroscience **91**(1): 221-231.

Bossenmeyer-Pourie, C., V. Lievre, et al. (2002). "Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia." Neuroscience **114**(4): 869-882.

Bossenmeyer-Pourie, C., S. Blaise, et al. (2010). "Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat." Am J Pathol **176**(1): 270-277.

Bostom, A. G. and L. Lathrop (1997). "Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes." Kidney Int **52**(1): 10-20.

Botez, M. I., S. N. Young, et al. (1982). "Effect of folic acid and vitamin B12 deficiencies on 5-hydroxyindoleacetic acid in human cerebrospinal fluid." Ann Neurol **12**(5): 479-484.

Bottiglieri, T., P. Godfrey, et al. (1990). "Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine." J Neurol Neurosurg Psychiatry **53**(12): 1096-1098.

Bottiglieri, T., M. Laundy, et al. (2000). "Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression." J Neurol Neurosurg Psychiatry **69**(2): 228-232.

Bradford, H. F., A. M. Young, et al. (1987). "Continuous glutamate leakage from brain cells is balanced by compensatory high-affinity reuptake transport." Neurosci Lett **81**(3): 296-302.

Brattstrom, L., D. E. Wilcken, et al. (1998). "Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis." Circulation **98**(23): 2520-2526.

Brody, H. (1955). "Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex." J Comp Neurol **102**(2): 511-516.

Brouwer, I. A. (2000). "Folic acid, folate and homocysteine: human intervention studies." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **92**(2): 183-184.

Brown, I. R. (2007). "Heat shock proteins and protection of the nervous system." Ann N Y Acad Sci **1113**: 147-158.

Brunaud, L., J. M. Alberto, et al. (2003). "Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats." Digestion **68**(2-3): 133-140.

Buchhalter, J. R., A. Fieles, et al. (1990). "Hippocampal commissural connections in the neonatal rat." Brain Res Dev Brain Res **56**(2): 211-216.

Burdge, G. C. and K. A. Lillycrop (2010). "Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease." Annu Rev Nutr **30**: 315-339

Burke, S. N. and C. A. Barnes (2006). "Neural plasticity in the ageing brain." Nat Rev Neurosci **7**(1): 30-40.

Busija, D. W., T. Gaspar, et al. (2008). "Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning." Adv Drug Deliv Rev **60**(13-14): 1471-1477.

Butterfield, D. A., K. Hensley, et al. (1997). "Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease." J Neurochem **68**(6): 2451-2457.

Butterfield, D. A., T. Koppal, et al. (1999). "Vitamin E as an antioxidant/free radical scavenger against amyloid beta-peptide-induced oxidative stress in neocortical synaptosomal membranes and hippocampal neurons in culture: insights into Alzheimer's disease." Rev Neurosci **10**(2): 141-149.

Cadet, J. L. and C. Brannock (1998). "Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems." Neurochem Int **32**(2): 117-131.

Caeser, M. and A. Aertsen (1991). "Morphological organization of rat hippocampal slice cultures." J Comp Neurol **307**(1): 87-106.

Calabrese, V., G. Scapagnini, et al. (2003). "Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach." Amino Acids **25**(3-4): 437-444.

Calabrese, V., G. Scapagnini, et al. (2004). "Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state." Mech Ageing Dev **125**(4): 325-335.

Candito, M., P. Bedoucha, et al. (1997). "[Cerebral vascular complication of hyperhomocysteinemia. Controlling thromboembolic complications with folates]." Presse Med **26**(27): 1289-1291.

Canese, R., S. Fortuna, et al. (1998). "Transient global brain ischemia in young and aged rats: differences in severity and progression, but not localisation, of lesions evaluated by magnetic resonance imaging." MAGMA **7**(1): 28-34.

Caprioli, A., O. Ghirardi, et al. (1991). "Spatial learning and memory in the radial maze: a longitudinal study in rats from 4 to 25 months of age." Neurobiol Aging **12**(5): 605-607.

Carbonell, T. and R. Rama (2007). "Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke." Curr Med Chem **14**(8): 857-874.

Careri, M., L. Furlattini, et al. (2001). "Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in Spirulina Pacifica algae: a chemometric approach." J Chromatogr A **912**(1): 61-71.

Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman, et al. (2005). "The many faces of CREB." Trends Neurosci **28**(8): 436-445.

Carmel, R. (2000). "Current concepts in cobalamin deficiency." Annu Rev Med **51**: 357-375.

Carmel, R., I. Aurangzeb, et al. (2001). "Associations of food-cobalamin malabsorption with ethnic origin, age, Helicobacter pylori infection, and serum markers of gastritis." Am J Gastroenterol **96**(1): 63-70.

Carson, N. A., D. C. Cusworth, et al. (1963). "Homocystinuria: a new inborn error of metabolism associated with mental deficiency." Arch Dis Child **38**: 425-436.

Carter, C. O. (1974). "Clues to the aetiology of neural tube malformations." Dev Med Child Neurol **16**(6 Suppl 32): 3-15.

Cartford, M. C., C. Gemma, et al. (2002). "Eighteen-month-old Fischer 344 rats fed a spinach-enriched diet show improved delay classical eyeblink conditioning and reduced expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNFbeta in the cerebellum." J Neurosci **22**(14): 5813-5816.

Cassavaugh, J. and K. M. Lounsbury (2011). "Hypoxia-mediated biological control." J Cell Biochem **112**(3): 735-744.

Castella, P., J. A. Wagner, et al. (1999). "Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1." J Neurosci Res **56**(3): 229-240.

Caston, J., P. Hilber, et al. (2003). "Effect of training on motor abilities of heterozygous staggerer mutant (Rora(+)/Rora(sg)) mice during aging." Behav Brain Res **141**(1): 35-42.

Chan, S. L., W. Fu, et al. (2004). "Herp stabilizes neuronal Ca2+ homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem **279**(27): 28733-28743.

Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.

Chavez, J. C. and J. C. LaManna (2002). "Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1." J Neurosci **22**(20): 8922-8931.

Chen, H. P. and E. N. Marsh (1997). "How enzymes control the reactivity of adenosylcobalamin: effect on coenzyme binding and catalysis of mutations in the conserved histidine-aspartate pair of glutamate mutase." Biochemistry **36**(25): 7884-7889.

Chen, J., S. H. Graham, et al. (1996). "Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **16**(4): 566-577.

Chen, L. H., M. L. Liu, et al. (1997). "Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression." J Biol Chem **272**(6): 3628-3634.

Chen, S. and D. E. Hillman (1999). "Dying-back of Purkinje cell dendrites with synapse loss in aging rats." J Neurocytol **28**(3): 187-196.

Chen, Z., A. C. Karaplis, et al. (2001). "Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit hyperhomocysteinemia and decreased methylation capacity, with neuropathology and aortic lipid deposition." Hum Mol Genet **10**(5): 433-443

Chen, Z., B. C. Schwahn, et al. (2005). "Postnatal cerebellar defects in mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase." Int J Dev Neurosci **23**(5): 465-474.

Chin, L. S., L. Li, et al. (1994). "Neuron-specific expression of the synapsin II gene is directed by a specific core promoter and upstream regulatory elements." J Biol Chem **269**(28): 18507-18513.

Choi, D. W. (1987). "Ionic dependence of glutamate neurotoxicity." J Neurosci **7**(2): 369-379.

Choi, D. W. and S. M. Rothman (1990). "The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death." Annu Rev Neurosci **13**: 171-182.

Choi, J. S., H. Y. Kim, et al. (2006). "Ischemic preconditioning-induced activation of ERK1/2 in the rat hippocampus." Neurosci Lett **409**(3): 187-191.

Choi, S. W. and J. B. Mason (2002). "Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis." J Nutr **132**(8 Suppl): 2413S-2418S.

Chomyn, A. and G. Attardi (2003). "MtDNA mutations in aging and apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 519-529.

Christensen, B., L. Arbour, et al. (1999). "Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects." Am J Med Genet **84**(2): 151-157.

Chung, Y. H., C. M. Shin, et al. (2001)a. "Age-related changes in the distribution of Kv1.1 and Kv1.2 channel subunits in the rat cerebellum." Brain Res **897**(1-2): 193-198.

Chung, Y. H., C. M. Shin, et al. (2001)b. "Differential alterations in the distribution of voltage-gated calcium channels in aged rat cerebellum." Brain Res **903**(1-2): 247-252.

Chung, Y. H., K. M. Joo, et al. (2003)a. "Age-related changes in the distribution of Na(v)1.1 and Na(v)1.2 in rat cerebellum." Neuroreport **14**(6): 841-845.

Chung, Y. H., J. J. Hong, et al. (2003)b. "Immunohistochemical study on the distribution of homocysteine in the central nervous system of transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation." Brain Res **967**(1-2): 226-234.

Churchill, J. D., J. J. Stanis, et al. (2003). "Is procedural memory relatively spared from age effects?" Neurobiol Aging **24**(6): 883-892.

Cini, M. and A. Moretti (1995). "Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain." Neurobiol Aging **16**(1): 53-57.

Cioni, G., G. D'Acunto, et al. (2011). "Perinatal brain damage in children: neuroplasticity, early intervention, and molecular mechanisms of recovery." Prog Brain Res **189**: 139-154.

Clarke, R. (2006). "Vitamin B12, folic acid, and the prevention of dementia." N Engl J Med **354**(26): 2817-2819

Clarke, R., J. Grimley Evans, et al. (2004). "Vitamin B12 and folate deficiency in later life." Age Ageing **33**(1): 34-41.

Clarke, R., A. D. Smith, et al. (1998). "Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease." Arch Neurol **55**(11): 1449-1455.

Cohen, H. and R. Yehuda (2011). "Gender differences in animal models of posttraumatic stress disorder." Dis Markers **30**(2-3): 141-150.

Colcombe, S. and A. F. Kramer (2003). "Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study." Psychol Sci **14**(2): 125-130.

Coleman, P. D. and D. G. Flood (1987). "Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **8**(6): 521-545.

Conde, C. and A. Caceres (2009). "Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites." Nat Rev Neurosci **10**(5): 319-332.

Corbett, D. and P. Crooks (1997). "Ischemic preconditioning: a long term survival study using behavioural and histological endpoints." Brain Res **760**(1-2): 129-136.

Costa, A. D. and K. D. Garlid (2008). "Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(2): H874-882.

Craciunescu, C. N., E. C. Brown, et al. (2004). "Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain." J Nutr **134**(1): 162-166.

Cravo, M. L. and M. E. Camilo (2000). "Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: relations to folic acid and vitamins B(6) and B(12) status." Nutrition **16**(4): 296-302.

Cravo, M. L., L. M. Gloria, et al. (1996). "Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status." Am J Clin Nutr **63**(2): 220-224.

Cuenod, M., K. Q. Do, et al. (1990). "Homocysteic acid as an endogenous excitatory amino acid." Trends Pharmacol Sci **11**(12): 477-478.

Cylwik, B. and L. Chrostek (2011). "[Disturbances of folic acid and homocysteine metabolism in alcohol abuse]." Pol Merkur Lekarski **30**(178): 295-299.

Czeizel, A. E. and I. Dudas (1992). "Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation." N Engl J Med **327**(26): 1832-1835.

Dai, J., D. P. Jones, et al. (2008). "Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress." Am J Clin Nutr **88**(5): 1364-1370.

Dalman, C., H. V. Thomas, et al. (2001). "Signs of asphyxia at birth and risk of schizophrenia. Population-based case-control study." Br J Psychiatry **179**: 403-408.

Daval, J. L., G. Pourie, et al. (2004). "Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus." Pediatr Res **55**(4): 561-567.

Dawson, D. A., K. Furuya, et al. (1999). "Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion." J Cereb Blood Flow Metab **19**(6): 616-623.

Dawson, E. B., D. R. Evans, et al. (1999). "Amniotic fluid B12, calcium, and lead levels associated with neural tube defects." Am J Perinatol **16**(7): 373-378.

Day,P.L, Langston W.C, et al (1935). Leukopenia and anemia in the monkey resulting from vitamin deficiency. ″J. Nutr. May **9**(5):637-644

de Boo, H. A. and J. E. Harding (2006). "The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis." Aust N Z J Obstet Gynaecol **46**(1): 4-14.

De Bree, A., M. van Dusseldorp, et al. (1997). "Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake." Eur J Clin Nutr **51**(10): 643-660.

De Bree, A., W. M. Verschuren, et al. (2002). "Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease." Pharmacol Rev **54**(4): 599-618.

de Gusmao Correia, M. L., A. M. Volpato, et al. (2011). "Developmental origins of health and disease: experimental and human evidence of fetal programming for metabolic syndrome." J Hum Hypertens.

de Kloet, E. R., R. H. Derijk, et al. (2007). "Therapy Insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression?" Nat Clin Pract Endocrinol Metab **3**(2): 168-179.

De La Cruz, J. P., J. Pavia, et al. (2000). "Effects of chronic administration of S-adenosyl-L-methionine on brain oxidative stress in rats." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **361**(1): 47-52.

Dei, R., A. Takeda, et al. (2002). "Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **104**(2): 113-122.

Del Rio, J. A., B. Heimrich, et al. (1997). "A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections." Nature **385**(6611): 70-74.

Desclin, J. C. (1974). "Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat." Brain Res **77**(3): 365-384.

Devlin, A. M., E. H. Ling, et al. (2000). "Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia." Hum Mol Genet **9**(19): 2837-2844.

Devore, E. E., F. Grodstein, et al. (2009). "Dietary intake of fish and omega-3 fatty acids in relation to long-term dementia risk." Am J Clin Nutr **90**(1): 170-176.

Dheen, S. T., C. Kaur, et al. (2007). "Microglial activation and its implications in the brain diseases." Curr Med Chem **14**(11): 1189-1197.

Dhodda, V. K., K. A. Sailor, et al. (2004). "Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis." J Neurochem **89**(1): 73-89.

Dickson, D. W. (1995). "Apoptosis in the brain. Physiology and pathology." Am J Pathol **146**(5): 1040-1044.

Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.

Dlugos, C. A. (2005). "Analyses of smooth endoplasmic reticulum of cerebellar parallel fibers in aging, ethanol-fed rats." Alcohol **35**(1): 67-73.

Dlugos, C. A. and R. J. Pentney (1994). "Morphometric analyses of Purkinje and granule cells in aging F344 rats." Neurobiol Aging **15**(4): 435-440.

Do, K. Q., P. L. Herrling, et al. (1986). "In vitro release and electrophysiological effects in situ of homocysteic acid, an endogenous N-methyl-(D)-aspartic acid agonist, in the mammalian striatum." J Neurosci **6**(8): 2226-2234.

Dobbing, J. and J. Sands (1973). "Quantitative growth and development of human brain." Arch Dis Child **48**(10): 757-767.

Doherty, L. F., J. G. Bromer, et al. (2010). "In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer." Horm Cancer **1**(3): 146-155.

Donini, L. M., M. R. De Felice, et al. (2007). "Nutritional status determinants and cognition in the elderly." Arch Gerontol Geriatr **44 Suppl 1**: 143-153.

Doolin, M. T., S. Barbaux, et al. (2002). "Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida." Am J Hum Genet **71**(5): 1222-1226.

Druge, H., H. Heinsen, et al. (1986). "Quantitative studies in ageing Chbb:THOM (Wistar) rats. II. Neuron numbers in lobules I, VIb + c and X." Bibl Anat(28): 121-137.

Duan, W., B. Ladenheim, et al. (2002). "Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease." J Neurochem **80**(1): 101-110.

Durga, J., M. P. van Boxtel, et al. (2007). "Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial." Lancet **369**(9557): 208-216.

Dyer, J. S. and C. R. Rosenfeld (2011). "Metabolic imprinting by prenatal, perinatal, and postnatal overnutrition: a review." Semin Reprod Med **29**(3): 266-276.

Ebbinghaus, Hermann. (1885). Über das Gedächtnis: Untersuchungen zur experimentellen Psychologie. Leipzig: Duncker & Humblot.

Ebino, K. Y. (1993). "Studies on coprophagy in experimental animals." Jikken Dobutsu **42**(1): 1-9.

Eccles, J. C., K. Sasaki, et al. (1967)a. "Interpretation of the potential fields generated in the cerebellar cortex by a mossy fibre volley." Exp Brain Res **3**(1): 58-80.

Eccles, J.C., Ito, M. and Szentagothai, J.(1967)b.The Cerebellum as a Neuronal Machine. Springer-Verlag, Berlin. Pp 335

Ellison, J., P. Clark, et al. (2004). "Effect of supplementation with folic acid throughout pregnancy on plasma homocysteine concentration." Thromb Res **114**(1): 25-27

Epstein, D. J., K. J. Vogan, et al. (1993). "A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 532-536.

Erickson, K. I., R. S. Prakash, et al. (2010). "Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume." J Neurosci **30**(15): 5368-5375.

Eriksson, J. G. (2005). "The fetal origins hypothesis--10 years on." BMJ **330**(7500): 1096-1097.

Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.

Eustache F, Desgranges B. Concepts et modèles en neuropsychologie de la mémoire : entre théorie et pratique clinique. In : Meulemans T, Desgranges B, Adam S, Eutache E, eds. Evaluation et prise en charge des troubles mnésiques. Marseille : Solal, 2003 : 13-49

Eves, E. M., M. S. Tucker, et al. (1992). "Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4373-4377

Faden, A. I., P. Demediuk, et al. (1989). "The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury." Science **244**(4906): 798-800.

Fattoretti, P., C. Bertoni-Freddari, et al. (1996). "Morphologic changes in cerebellar mitochondria during aging." Anal Quant Cytol Histol **18**(3): 205-208.

Fattoretti, P., C. Bertoni-Freddari, et al. (1998). "Impaired succinic dehydrogenase activity of rat Purkinje cell mitochondria during aging." Mech Ageing Dev **101**(1-2): 175-182.

Favier, A. and D. Caillat (1977). "[Determination of urinary alpha-keto-gamma-methylthiobutyric acid in hypermethionemia by use of gas chromatography and flame photometry (author's transl)]." Clin Chim Acta **79**(2): 419-423.

Feng, S., S. E. Jacobsen, et al. (2010). "Epigenetic reprogramming in plant and animal development." Science **330**(6004): 622-627.

Ferriero, D. M., D. M. Holtzman, et al. (1996). "Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury." Neurobiol Dis **3**(1): 64-71.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.

Finnell, R. H., G. M. Shaw, et al. (2002). "Does prenatal screening for 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations in high-risk neural tube defect pregnancies make sense?" Genet Test **6**(1): 47-52.

Fitch, J. M., J. M. Juraska, et al. (1989). "The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. I. Cell types." Brain Res **479**(1): 105-114.

Flood, D. G. (1993). "Critical issues in the analysis of dendritic extent in aging humans, primates, and rodents." Neurobiol Aging **14**(6): 649-654.

Fournié A , Connan L,Parant O, Lesourd-Pontonnier (1999). Souffrance fœtale aiguë. Encyclopédie médico-chirurgicale 5-077-A-30.Elsevier Paris

Ford, A. H., L. Flicker, et al. (2010). "The B-VITAGE trial: a randomized trial of homocysteine lowering treatment of depression in later life." Trials **11**: 8.

Forges, T., P. Monnier-Barbarino, et al. (2007). "Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health." Hum Reprod Update **13**(3): 225-238.

Forman, H. J., J. M. Fukuto, et al. (2004). "Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers." Am J Physiol Cell Physiol **287**(2): C246-256.

Foster, T. C. and C. M. Norris (1997). "Age-associated changes in Ca(2+)-dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity." Hippocampus **7**(6): 602-612.

Franco, R. F., A. G. Araujo, et al. (1998). "Analysis of the 677 C-->T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups." Thromb Haemost **79**(1): 119-121.

Frandsen, A. and A. Schousboe (1987). "Time and concentration dependency of the toxicity of excitatory amino acids on cerebral neurones in primary culture." Neurochem Int **10**(4): 583-591.

Frankel, S., P. Elwood, et al. (1996). "Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease." Lancet **348**(9040): 1478-1480.

Frautschy, S. A., W. Hu, et al. (2001). "Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology." Neurobiol Aging **22**(6): 993-1005.

Frosst, P., H. J. Blom, et al. (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase." Nat Genet **10**(1): 111-113.

Furuya, K., L. Zhu, et al. (2005). "Differences in infarct evolution between lipopolysaccharide-induced tolerant and nontolerant conditions to focal cerebral ischemia." J Neurosurg **103**(4): 715-723.

Fuso, A., L. Seminara, et al. (2005). "S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production." Mol Cell Neurosci **28**(1): 195-204.

Gage, F. H., S. B. Dunnett, et al. (1984). "Spatial learning and motor deficits in aged rats." Neurobiol Aging **5**(1): 43-48.

Gaiarsa, J. L., M. Beaudoin, et al. (1992). "Effect of neonatal degranulation on the morphological development of rat CA3 pyramidal neurons: inductive role of mossy fibers on the formation of thorny excrescences." J Comp Neurol **321**(4): 612-625.

Garcia-Alix, A., M. Martinez-Biarge, et al. (2009). "[Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: Incidence and prevalence in the first decade of the 21st century]." An Pediatr (Barc) **71**(4): 319-326.

Garcia, M. M., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2011). "Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1." J Pathol

Garcia-Segura, L. M., A. Sanz, et al. (2006). "Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection." Neuroendocrinology **84**(4): 275-279.

Gatz, M., J. A. Mortimer, et al. (2007). "Accounting for the relationship between low education and dementia: a twin study." Physiol Behav **92**(1-2): 232-237.

Geinisman, Y., O. Ganeshina, et al. (2004). "Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum." Neurobiol Aging **25**(3): 407-416.

Geisler, H. C., J. Westerga, et al. (1993). "Development of posture in the rat." Acta Neurobiol Exp (Wars) **53**(4): 517-523.

Geisler, H. C., J. Westerga, et al. (1996). "The function of the long back muscles during postural development in the rat." Behav Brain Res **80**(1-2): 211-215.

Gelineau-van Waes, J., S. Heller, et al. (2008). "Embryonic development in the reduced folate carrier knockout mouse is modulated by maternal folate supplementation." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **82**(7): 494-507.

Gely-Nargeot, M. C., C. Mure, et al. (2000). "[Effects of cognitive aging on memory performances]." Presse Med **29**(15): 849-857.

Gemma, C., M. H. Mesches, et al. (2002). "Diets enriched in foods with high antioxidant activity reverse age-induced decreases in cerebellar beta-adrenergic function and increases in proinflammatory cytokines." J Neurosci **22**(14): 6114-6120.

Gharib, A., B. Chabannes, et al. (1983). "In vivo elevation of mouse brain S-adenosyl-L-homocysteine after treatment with L-homocysteine." J Neurochem **40**(4): 1110-1112.

Giachello, C. N., F. Fiumara, et al. (2010). "MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity." J Cell Sci **123**(Pt 6): 881-893.

Gicquel, C., A. El-Osta, et al. (2008). "Epigenetic regulation and fetal programming." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **22**(1): 1-16.

Gidday, J. M., J. C. Fitzgibbons, et al. (1994). "Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat." Neurosci Lett **168**(1-2): 221-224.

Gidday, J. M., A. R. Shah, et al. (1999). "Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning." J Cereb Blood Flow Metab **19**(3): 331-340.

Gilland, E., M. Puka-Sundvall, et al. (1998). "Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors." J Cereb Blood Flow Metab **18**(3): 297-304.

Ginsberg, M. D. (2003). "Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture." Stroke **34**(1): 214-223.

Giugliano, D. and K. Esposito (2008). "Mediterranean diet and metabolic diseases." Curr Opin Lipidol **19**(1): 63-68.

Glenn, M. J., E. D. Kirby, et al. (2008). "Age-related declines in exploratory behavior and markers of hippocampal plasticity are attenuated by prenatal choline supplementation in rats." Brain Res **1237**: 110-123.

Goldberg, M. P. and D. W. Choi (1993). "Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury." J Neurosci **13**(8): 3510-3524.

Goldberg, M. P., V. Viseskul, et al. (1988). "Phencyclidine receptor ligands attenuate cortical neuronal injury after N-methyl-D-aspartate exposure or hypoxia." J Pharmacol Exp Ther **245**(3): 1081-1087.

Goldowitz, D. and K. Hamre (1998). "The cells and molecules that make a cerebellum." Trends Neurosci **21**(9): 375-382.

Gomez-Pinilla, F. (2008). "Brain foods: the effects of nutrients on brain function." Nat Rev Neurosci **9**(7): 568-578.

Goodman, Y., A. J. Bruce, et al. (1996). "Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons." J Neurochem **66**(5): 1836-1844.

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

Goyette, P., A. Pai, et al. (1998). "Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)." Mamm Genome **9**(8): 652-656.

Grabb, M. C. and D. W. Choi (1999). "Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors." J Neurosci **19**(5): 1657-1662.

Gray, G. E. (1989). "Nutrition and dementia." J Am Diet Assoc **89**(12): 1795-1802.

Greenwood, R. S., S. E. Godar, et al. (1981). "Cholecystokinin in hippocampal pathways." J Comp Neurol **203**(3): 335-350.

Grojean, S., H. Schroeder, et al. (2003). "Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: a long term follow-up." Neurobiol Dis **14**(2): 265-278

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

Grzanna, R., U. Berger, et al. (1989). "Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects." J Histochem Cytochem **37**(9): 1435-1442.

Gudnason, V., D. Stansbie, et al. (1998). "C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group." Atherosclerosis **136**(2): 347-354.

Gueant-Rodriguez, R. M., R. Spada, et al. (2011). "Homocysteine is a determinant of ApoA-I and both are associated with ankle brachial index, in an ambulatory elderly population." Atherosclerosis **214**(2): 480-485

Gueant-Rodriguez, R. M., Y. Juilliere, et al. (2005). "Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTRA2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population." Thromb Haemost **94**(3): 510-515.

Gueant-Rodriguez, R. M., C. Rendeli, et al. (2003). "Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans." Neurosci Lett **344**(3): 189-192.

Guerra-Shinohara, E. M., A. A. Paiva, et al. (2002). "Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12." BJOG **109**(7): 784-791.

Guilland, J. C., A. Favier, et al. (2003). "[Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease?. 1. Basic data]." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 101-110.

Guix, F. X., I. Uribesalgo, et al. (2005). "The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain." Prog Neurobiol **76**(2): 126-152.

Hadj-Sahraoui, N., F. Frederic, et al. (2001). "Progressive atrophy of cerebellar Purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse (Rora(+/sg))." Brain Res Dev Brain Res **126**(2): 201-209.

Hagberg, H., A. Lehmann, et al. (1985). "Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments." J Cereb Blood Flow Metab **5**(3): 413-419.

Hagberg, H., C. Mallard, et al. (2009). "Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria." J Child Neurol **24**(9): 1141-1146.

Hall, C. A. (1990). "Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects." Am J Hematol **34**(2): 121-127.

Halliwell, B. (2002). "Hypothesis: proteasomal dysfunction: a primary event in neurogeneration that leads to nitrative and oxidative stress and subsequent cell death." Ann N Y Acad Sci **962**: 182-194.

Hamrick, S. E., P. S. McQuillen, et al. (2005). "A role for hypoxia-inducible factor-1alpha in desferoxamine neuroprotection." Neurosci Lett **379**(2): 96-100.

Han, M. K. (2003). "Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage." Exp Mol Med **35**(2): 136-139.

Hara, T., J. Hamada, et al. (2003). "CREB is required for acquisition of ischemic tolerance in gerbil hippocampal CA1 region." J Neurochem **86**(4): 805-814.

Harrington, L. A. and C. B. Harley (1988). "Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in Caenorhabditis elegans." Mech Ageing Dev **43**(1): 71-78.

Hartshorne, J. K. and M. T. Ullman (2006). "Why girls say 'holded' more than boys." Dev Sci **9**(1): 21-32.

Headstrom, P. D., S. J. Rulyak, et al. (2008). "Prevalence of and risk factors for vitamin B(12) deficiency in patients with Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **14**(2): 217-223.

Heijmans, B. T., E. W. Tobi, et al. (2008). "Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(44): 17046-17049.

Herrmann, M., T. Widmann, et al. (2005). "Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations." Clin Chem **51**(12): 2348-2353.

Herrmann, M., J. Schmidt, et al. (2007). "Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations." Bone **41**(4): 584-591.

Hibbard, B. M. (1964). "The role of folic acid in pregnancy; with particular reference to anaemia, abruption and abortion." J Obstet Gynaecol Br Commonw **71**: 529-542.

Hibbard, B. M., E. D. Hibbard, et al. (1965). "Folic acid and reproduction." Acta Obstet Gynecol Scand **44**(3): 375-400.

Hilber, P. and J. Caston (2001). "Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging." Neuroscience **102**(3): 615-623.

Ho, P. I., D. Ashline, et al. (2003). "Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine." Neurobiol Dis **14**(1): 32-42.

Ho, P. I., D. Ortiz, et al. (2002). "Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage." J Neurosci Res **70**(5): 694-702.

Ho, P. I., S. C. Collins, et al. (2001). "Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress." J Neurochem **78**(2): 249-253.

Hochberg, Z., R. Feil, et al. (2011). "Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming." Endocr Rev **32**(2): 159-224.

Hoffer, B. J., G. Rose, et al. (1988). "Age-related changes in cerebellar noradrenergic function." Ann N Y Acad Sci **515**: 269-286.

Hogenkamp, H. P., R. K. Ghambeer, et al. (1968). "Cobamides and ribonucleotide reduction. VI. Enzyme-catalyzed hydrogen exchange between water and deoxyadenosylcobalamin." J Biol Chem **243**(4): 799-808.

Horiguchi, T., B. Kis, et al. (2003). "Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels is a trigger of 3-nitropropionic acid-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats." Stroke **34**(4): 1015-1020.

Hossmann, K. A. (2006). "Pathophysiology and therapy of experimental stroke." Cell Mol Neurobiol **26**(7-8): 1057-1083.

Howden, C. W. (2000). "Vitamin B12 levels during prolonged treatment with proton pump inhibitors." J Clin Gastroenterol **30**(1): 29-33.

Hoyte, L. C., M. Papadakis, et al. (2006). "Improved regional cerebral blood flow is important for the protection seen in a mouse model of late phase ischemic preconditioning." Brain Res **1121**(1): 231-237.

Hu, B. R., C. M. Fux, et al. (1999). "Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factor-2 transcription factors following transient cerebral ischemia in rat brain." Neuroscience **89**(2): 437-452.

Huang, C. M., N. Brown, et al. (1999). "Age-related changes in the cerebellum: parallel fibers." Brain Res **840**(1-2): 148-152.

Huang, C. M., L. Wang, et al. (2006). "Cerebellar granule cell: ascending axon and parallel fiber." Eur J Neurosci **23**(7): 1731-1737.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-642.

Hultberg, B., M. Berglund, et al. (1993). "Elevated plasma homocysteine in alcoholics." Alcohol Clin Exp Res **17**(3): 687-689.

Hussein, W. I., R. Green, et al. (1999). "Normalization of hyperhomocysteinemia with L-thyroxine in hypothyroidism." Ann Intern Med **131**(5): 348-351.

Isgor, C. and S. J. Watson (2005). "Estrogen receptor alpha and beta mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone." Neuroscience **134**(3): 847-856.

Ishibashi, M. (2004). "Molecular mechanisms for morphogenesis of the central nervous system in mammals." Anat Sci Int **79**(4): 226-234.

Ito, M. (1984). "The modifiable neuronal network of the cerebellum." Jpn J Physiol **34**(5): 781-792.

Ito, M. (1986). "Long-term depression as a memory process in the cerebellum." Neurosci Res **3**(6): 531-539.

Ito, S., L. Provini, et al. (1991). "L-homocysteic acid mediates synaptic excitation at NMDA receptors in the hippocampus." Neurosci Lett **124**(2): 157-161.

Jacobsen, D. W. (1998). "Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease." Clin Chem **44**(8 Pt 2): 1833-1843.

Jacobsen, D.W. (1994). The transcobalamin II delivery system : an overview. In : Bhatt HR, James VHT, Besser GM, Bottazzo GF, Keen H, eds. Advances in Thomas Addison's diseases. Bristol.″Journal of Endocrinology **2**: 229-40

Jacques, P. F., A. G. Bostom, et al. (2003). "Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study." Atherosclerosis **166**(1): 49-55.

Jacques, P. F., A. G. Bostom, et al. (1996). "Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations." Circulation **93**(1): 7-9.

Jakubowski, H. (2006). "Pathophysiological consequences of homocysteine excess." J Nutr **136**(6 Suppl): 1741S-1749S.

Jakubowski, H., G. H. Boers, et al. (2008). "Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylated protein levels in humans." FASEB J **22**(12): 4071-4076.

Jakubowski, H., J. Perla-Kajan, et al. (2009). "Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice." FASEB J **23**(6): 1721-1727.

James, S. J., P. Cutler, et al. (2004). "Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism." Am J Clin Nutr **80**(6): 1611-1617.

James, S. J., S. Melnyk, et al. (2010). "A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet **153B**(6): 1209-1220.

James W (1890) The Principles of Psychology. New York: Dover Publications, Inc., 1950. 689 pp.

Jara-Prado, A., A. Ortega-Vazquez, et al. (2003). "Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition." Neurotox Res **5**(4): 237-243.

Johnston, M. V., W. H. Trescher, et al. (2001). "Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain." Pediatr Res **49**(6): 735-741.

Joosten, E., E. Lesaffre, et al. (1997). "Is metabolic evidence for vitamin B-12 and folate deficiency more frequent in elderly patients with Alzheimer's disease?" J Gerontol A Biol Sci Med Sci **52**(2): M76-79.

Joseph, J. A., N. A. Denisova, et al. (2003). "Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model." Nutr Neurosci **6**(3): 153-162.

Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, et al. (1999). "Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation." J Neurosci **19**(18): 8114-8121.

Joseph, J. A., B. Shukitt-Hale, et al. (1998). "Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits." J Neurosci **18**(19): 8047-8055.

Kamath, A. F., A. K. Chauhan, et al. (2006). "Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice." Blood **107**(2): 591-593.

Kant, A. K. (2004). "Dietary patterns and health outcomes." J Am Diet Assoc **104**(4): 615-635.

Kapinya, K., R. Penzel, et al. (2000). "Temporary changes of the AP-1 transcription factor binding activity in the gerbil hippocampus after transient global ischemia, and ischemic tolerance induction." Brain Res **872**(1-2): 282-293.

Kaplan, M. S. and J. W. Hinds (1977). "Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs." Science **197**(4308): 1092-1094.

Kariko, K., D. Weissman, et al. (2004). "Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling--a unifying theme in ischemic tolerance." J Cereb Blood Flow Metab **24**(11): 1288-1304.

Kasischke, K., A. C. Ludolph, et al. (1996). "NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia." Neurosci Lett **214**(2-3): 175-178.

Kato, H., Y. Liu, et al. (1992). "MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus." Neurosci Lett **139**(1): 118-121.

Kato, H., Y. Liu, et al. (1994). "Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance." Brain Res **634**(2): 235-244.

Katsura, K., J. Kurihara, et al. (1999). "Acidosis enhances translocation of protein kinase C but not Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II to cell membranes during complete cerebral ischemia." Brain Res **849**(1-2): 119-127.

Kawahara, N., C. A. Ruetzler, et al. (1995). "Protective effect of spreading depression against neuronal damage following cardiac arrest cerebral ischaemia." Neurol Res **17**(1): 9-16.
Kawahara, N., C. A. Ruetzler, et al. (1999). "Cortical spreading depression increases protein synthesis and upregulates basic fibroblast growth factor." Exp Neurol **158**(1): 27-36.
Kelly, K. M., N. L. Nadon, et al. (2006). "The neurobiology of aging." Epilepsy Res **68 Suppl 1**: S5-20.
Kenyon, S. H., A. Nicolaou, et al. (1998). "The effect of ethanol and its metabolites upon methionine synthase activity in vitro." Alcohol **15**(4): 305-309.
Khalilov, I., M. Esclapez, et al. (1997). "A novel in vitro preparation: the intact hippocampal formation." Neuron **19**(4): 743-749.
Kiessling, M., G. Stumm, et al. (1993). "Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **13**(6): 914-924.
Kim, H., B. S. Park, et al. (2005). "Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid." J Agric Food Chem **53**(22): 8537-8541.
Kim, K. C., S. Friso, et al. (2009). "DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging." J Nutr Biochem **20**(12): 917-926.
Kim, J. P. and D. W. Choi (1987). "Quinolinate neurotoxicity in cortical cell culture." Neuroscience **23**(2): 423-432.
Kim, J. P., J. Y. Koh, et al. (1987). "L-homocysteate is a potent neurotoxin on cultured cortical neurons." Brain Res **437**(1): 103-110.
Kim, S. U. and J. de Vellis (2005). "Microglia in health and disease." J Neurosci Res **81**(3): 302-313.
Kimoto, Y., M. Tohyama, et al. (1981). "Fine structure of rat cerebellar noradrenaline terminals as visualized by potassium permanganate 'in situ perfusion' fixation method." Neuroscience **6**(1): 47-58.
Kirino, T. (2002). "Ischemic tolerance." J Cereb Blood Flow Metab **22**(11): 1283-1296.
Kirke, P. N., L. E. Daly, et al. (1992). "A randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. The Irish Vitamin Study Group." Arch Dis Child **67**(12): 1442-1446.
Kirke, P. N., A. M. Molloy, et al. (1993). "Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects." Q J Med **86**(11): 703-708.
Kitagawa, K., M. Matsumoto, et al. (1990). "'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain." Brain Res **528**(1): 21-24.
Klancnik, J. M., M. Cuenod, et al. (1992). "Release of endogenous amino acids, including homocysteic acid and cysteine sulphinic acid, from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation of Schaffer collateral-commissural fibres." Neuroscience **49**(3): 557-570.
Knowlton, B. J. and L. R. Squire (1996). "Artificial grammar learning depends on implicit acquisition of both abstract and exemplar-specific information." J Exp Psychol Learn Mem Cogn **22**(1): 169-181.
Kobilo, T., Q. R. Liu, et al. (2011). "Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment." Learn Mem **18**(9): 605-609.
Kramer, A. F., S. J. Colcombe, et al. (2005). "Fitness, aging and neurocognitive function." Neurobiol Aging **26 Suppl 1**: 124-127.
Kraus, J. P., M. Janosik, et al. (1999). "Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria." Hum Mutat **13**(5): 362-375.

Kraytsberg, Y., E. Nekhaeva, et al. (2003). "Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process?" Mech Ageing Dev **124**(1): 49-53.

Kroger, E., R. Verreault, et al. (2009). "Omega-3 fatty acids and risk of dementia: the Canadian Study of Health and Aging." Am J Clin Nutr **90**(1): 184-192.

Kronenberg, G., M. Colla, et al. (2009). "Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease." Curr Mol Med **9**(3): 315-323.

Kruman, II, C. Culmsee, et al. (2000). "Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity." J Neurosci **20**(18): 6920-6926.

Kruman, II, T. S. Kumaravel, et al. (2002). "Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease." J Neurosci **22**(5): 1752-1762.

Kruman, II, P. R. Mouton, et al. (2005). "Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors." Neuroreport **16**(10): 1055-1059.

Kulinskii, V. I., L. N. Minakina, et al. (2002). "Neuroprotective effect of hypoxic preconditioning: phenomenon and mechanisms." Bull Exp Biol Med **133**(2): 202-204.

Kurkinen, K., R. Busto, et al. (2001). "Isoform-specific membrane translocation of protein kinase C after ischemic preconditioning." Neurochem Res **26**(10): 1139-1144.

Kurkinen, K., R. Keinanen, et al. (2001). "Preconditioning with spreading depression activates specifically protein kinase Cdelta." Neuroreport **12**(2): 269-273.

Kuroiwa, T., I. Yamada, et al. (2000). "3-Nitropropionic acid preconditioning ameliorates delayed neurological deterioration and infarction after transient focal cerebral ischemia in gerbils." Neurosci Lett **283**(2): 145-148.

Kusaka, T., S. Matsuura, et al. (2004). "Relationship between cerebral interstitial levels of amino acids and phosphorylation potential during secondary energy failure in hypoxic-ischemic newborn piglets." Pediatr Res **55**(2): 273-279.

Lai, M. C. and S. N. Yang (2011). "Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy." J Biomed Biotechnol **2011**: 609813.

Lalonde, R., H. Barraud, et al. (2008). "Effects of a B-vitamin-deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice." Brain Res 1188: 122-131.

Landfield, P. W. (1987). "'Increased calcium-current' hypothesis of brain aging." Neurobiol Aging **8**(4): 346-347.

Landfield, P. W. (1988). "Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction." Neurobiol Aging **9**(5-6): 571-579.

Lang, J. T. and L. D. McCullough (2008). "Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant?" J Transl Med **6**: 33.

Lange-Asschenfeldt, C., A. P. Raval, et al. (2004). "Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice." J Cereb Blood Flow Metab **24**(6): 636-645.

Laraqui, A., A. Allami, et al. (2007). "Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease." Eur J Intern Med **18**(6): 474-483.

Lau, C., J. M. Rogers, et al. (2011). "Fetal programming of adult disease: implications for prenatal care." Obstet Gynecol **117**(4): 978-985.

Lauder, J. M. (1979). "Granule cell migration in developing rat cerebellum. Influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism." Dev Biol **70**(1): 105-115.

Laurence, K. M., N. James, et al. (1981). "Double-blind randomised controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects." Br Med J (Clin Res Ed) **282**(6275): 1509-1511.

Leal-Galicia, P., M. Castaneda-Bueno, et al. (2008). "Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging." Neurobiol Learn Mem **90**(3): 511-518.

Lee, E. S., H. Chen, et al. (2005). "Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents." Neurotoxicology **26**(3): 361-371.

Lee, E. and H. Son (2009). "Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors." BMB Rep **42**(5): 239-244.

Lee, H. T., Y. C. Chang, et al. (2004). "cAMP response element-binding protein activation in ligation preconditioning in neonatal brain." Ann Neurol **56**(5): 611-623.

Lehmann, M., C. G. Gottfries, et al. (1999). "Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker." Dement Geriatr Cogn Disord **10**(1): 12-20.

Leinekugel, X. (2003). "Developmental patterns and plasticities: the hippocampal model." J Physiol Paris **97**(1): 27-37.

Lemaire, V., S. Lamarque, et al. (2006). "Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis." Biol Psychiatry **59**(9): 786-792

Leulliot, N., S. Quevillon-Cheruel, et al. (2004). "Structure of protein phosphatase methyltransferase 1 (PPM1), a leucine carboxyl methyltransferase involved in the regulation of protein phosphatase 2A activity." J Biol Chem **279**(9): 8351-8358.

Levine, S. and H. Payan (1966). "Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (Meriones unguiculatus)." Exp Neurol **16**(3): 255-262.

Levites, Y., T. Amit, et al. (2003). "Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate." FASEB J **17**(8): 952-954.

Levites, Y., T. Amit, et al. (2002). "Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action." J Biol Chem **277**(34): 30574-30580.

Li, Q., Y. Zhu, et al. (2008). "Up-regulation of heme oxygenase-1 by isoflurane preconditioning during tolerance against neuronal injury induced by oxygen glucose deprivation." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(9): 803-810.

Li, Y. N., S. Gulati, et al. (1996). "Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene." Hum Mol Genet **5**(12): 1851-1858.

Lichtenstein, A. H., L. J. Appel, et al. (2006). "Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee." Circulation **114**(1): 82-96.

Lie, D. C., H. Song, et al. (2004). "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 399-421.

Lin, C. H., P. S. Chen, et al. (2008). "Glutamate preconditioning prevents neuronal death induced by combined oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons." Eur J Pharmacol **589**(1-3): 85-93.

Lin, J. K. and Y. C. Liang (2000). "Cancer chemoprevention by tea polyphenols." Proc Natl Sci Counc Repub China B **24**(1): 1-13.

Lindvall, O., P. Ernfors, et al. (1992). "Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 648-652.

Linnebank, M., J. Popp, et al. (2010). "S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease." Neurodegener Dis **7**(6): 373-378.

Lipton, S. A., W. K. Kim, et al. (1997). "Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5923-5928.

Liu, F., M. Day, et al. (2008). "Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory." Nat Neurosci **11**(3): 334-343.

Liu, J., I. Ginis, et al. (2000). "Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide." Am J Physiol Cell Physiol **278**(1): C144-153.

Liu, X. X., K. Wilson, et al. (2000). "Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa." Life Sci **66**(23): 2277-2288.

Liu, Y., H. Kato, et al. (1993). "Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus." Neuroscience **56**(4): 921-927.

Longo, L. D. and S. Packianathan (1997). "Hypoxia-ischaemia and the developing brain: hypotheses regarding the pathophysiology of fetal-neonatal brain damage." Br J Obstet Gynaecol **104**(6): 652-662.

Longo, L. D. and W. J. Pearce (2005). "Fetal cerebrovascular acclimatization responses to high-altitude, long-term hypoxia: a model for prenatal programming of adult disease?" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(1): R16-24.

Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system." Neuron **35**(4): 605-623.

Lopez-Quesada, E. L., M. A. Vilaseca, et al. (2000). "[Homocysteine and pregnancy]." Med Clin (Barc) **115**(9): 352-356.

Lorek, A., Y. Takei, et al. (1994). "Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy." Pediatr Res **36**(6): 699-706.

Loren, I., P. C. Emson, et al. (1979). "Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain." Neuroscience **4**(12): 1953-1976.

Lovblad, K., G. Ramelli, et al. (1997). "Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings." Pediatr Radiol **27**(2): 155-158.

Lowe, T. L., D. J. Cohen, et al. (1981). "Folic acid and B12 in autism and neuropsychiatric disturbances of childhood." J Am Acad Child Psychiatry **20**(1): 104-111.

Lubbers, K. and M. Frotscher (1988). "Differentiation of granule cells in relation to GABAergic neurons in the rat fascia dentata. Combined Golgi/EM and immunocytochemical studies." Anat Embryol (Berl) **178**(2): 119-127.

Lubbers, K., J. R. Wolff, et al. (1985). "Neurogenesis of GABAergic neurons in the rat dentate gyrus: a combined autoradiographic and immunocytochemical study." Neurosci Lett **62**(3): 317-322.

Lustig, C. and R. L. Buckner (2004). "Preserved neural correlates of priming in old age and dementia." Neuron **42**(5): 865-875.

Lynch, M. A. (1998). "Analysis of the mechanisms underlying the age-related impairment in long-term potentiation in the rat." Rev Neurosci **9**(3): 169-201.

Ma, D. K., M. A. Bonaguidi, et al. (2009). "Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system." Cell Res **19**(6): 672-682.

Mabuchi, T., K. Kitagawa, et al. (2001). "Phosphorylation of cAMP response element-binding protein in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate in vitro and ischemia in vivo." J Neurosci **21**(23): 9204-9213.

Maclean, K. N., M. Janosik, et al. (2002). "Cystathionine beta-synthase is coordinately regulated with proliferation through a redox-sensitive mechanism in cultured human cells and Saccharomyces cerevisiae." J Cell Physiol **192**(1): 81-92.

Mallard, E. C., H. J. Waldvogel, et al. (1995). "Repeated asphyxia causes loss of striatal projection neurons in the fetal sheep brain." Neuroscience **65**(3): 827-836.

Malouf, M., E. J. Grimley, et al. (2003). "Folic acid with or without vitamin B12 for cognition and dementia." Cochrane Database Syst Rev(4): CD004514.

Mangum, J. H., B. K. Murray, et al. (1969). "Vitamin B 12 dependent methionine biosynthesis in cultured mammalian cells." Biochemistry **8**(9): 3496-3499.

Mann, D. M. and P. O. Yates (1979). "The effects of ageing on the pigmented nerve cells of the human locus caeruleous and substantia nigra." Acta Neuropathol **47**(2): 93-97.

Marcoullis, G., J. L. Gueant, et al. (1986). "Radioimmunoassay for assessing exocrine pancreatic insufficiency, based on the differential enzymatic degradation of cobalamin-binding proteins." Clin Chem **32**(3): 453-460.

Mariani, J., F. Crepel, et al. (1977). "Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from Reeler mutant mouse." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **281**(978): 1-28.

Markle, H. V. (1996). "Cobalamin." Crit Rev Clin Lab Sci **33**(4): 247-356.

Markowska, A. L., M. Mooney, et al. (1998). "Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits." Neuroscience **87**(3): 559-569.

Markowska, A. L., W. S. Stone, et al. (1989). "Individual differences in aging: behavioral and neurobiological correlates." Neurobiol Aging **10**(1): 31-43.

Martin, N., G. Pourie, et al. (2010). "Conditioning-like brief neonatal hypoxia improves cognitive function and brain tissue properties with marked gender dimorphism in adult rats." Semin Perinatol **34**(3): 193-200.

Martin, Y. N., O. E. Salavaggione, et al. (2006). "Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics." Pharmacogenet Genomics **16**(4): 265-277.

Martindale, J. L. and N. J. Holbrook (2002). "Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival." J Cell Physiol **192**(1): 1-15.

Marwaha, J., B. Hoffer, et al. (1980). "Age-related electrophysiological changes in rat cerebellum." Brain Res **201**(1): 85-97.

Matsui, Y., Y. Kubo, et al. (1987). "S-adenosyl-L-methionine prevents ischemic neuronal death." Eur J Pharmacol **144**(2): 211-216.

Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." Physiol Rev **77**(4): 1081-1132.

Mattson, M. P. and T. B. Shea (2003). "Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders." Trends Neurosci **26**(3): 137-146.

Matthews PM (2001) Editorial commentary to Narayanan et al. Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. J Neurol 248:987

Maulik, N., R. M. Engelman, et al. (1999). "Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2." Circulation **100**(19 Suppl): II369-375.

McAndrew, P. E., J. T. Brandt, et al. (1996). "The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans." Thromb Res **83**(2): 195-198.

McCaddon, A., G. Davies, et al. (1998). "Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type." Int J Geriatr Psychiatry **13**(4): 235-239.

McCaddon, A., B. Regland, et al. (2002). "Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease." Neurology **58**(9): 1395-1399.

McCully, K. S. (1975). "Growth disorders and homocysteine metabolism." Ann Clin Lab Sci **5**(3): 147-152.
McDowell, I., G. Xi, et al. (2007). "Mapping the connections between education and dementia." J Clin Exp Neuropsychol **29**(2): 127-141.
McEwen, B. (2002). "Estrogen actions throughout the brain." Recent Prog Horm Res **57**: 357-384.
McKay, B. E. and R. W. Turner (2005). "Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell." J Physiol **567**(Pt 3): 829-850.
McKeever, M. P., D. G. Weir, et al. (1991). "Betaine-homocysteine methyltransferase: organ distribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat." Clin Sci (Lond) **81**(4): 551-556.
McQuillen, P. S. and D. M. Ferriero (2004). "Selective vulnerability in the developing central nervous system." Pediatr Neurol **30**(4): 227-235.
McWilliams, J. R. and G. Lynch (1984). "Synaptic density and axonal sprouting in rat hippocampus: stability in adulthood and decline in late adulthood." Brain Res **294**(1): 152-156.
Mecocci, P., U. MacGarvey, et al. (1993). "Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain." Ann Neurol **34**(4): 609-616.
Meller, R., J. A. Cameron, et al. (2006). "Rapid degradation of Bim by the ubiquitin-proteasome pathway mediates short-term ischemic tolerance in cultured neurons." J Biol Chem **281**(11): 7429-7436.
Mercier, F., J. T. Kitasako, et al. (2002). "Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network." J Comp Neurol **451**(2): 170-188.
Merkle, F. T. and A. Alvarez-Buylla (2006). "Neural stem cells in mammalian development." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 704-709.
Merlio, J. P., P. Ernfors, et al. (1993). "Increased production of the TrkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults." Neuron **10**(2): 151-164.
Mihaila, C., J. Schramm, et al. (2011). "Identifying a window of vulnerability during fetal development in a maternal iron restriction model." PLoS One **6**(3): e17483.
Miller, J. W. (2006). "Assessing the association between vitamin B-12 status and cognitive function in older adults." Am J Clin Nutr **84**(6): 1259-1260.
Miller, B. A., R. S. Perez, et al. (2001). "Cerebral protection by hypoxic preconditioning in a murine model of focal ischemia-reperfusion." Neuroreport **12**(8): 1663-1669.
Miller, J. W. (1999). "Homocysteine and Alzheimer's disease." Nutr Rev **57**(4): 126-129.
Mills, J. L., J. M. McPartlin, et al. (1995). "Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects." Lancet **345**(8943): 149-151.
Mills, J. L., J. M. Scott, et al. (1996). "Homocysteine and neural tube defects." J Nutr **126**(3): 756S-760S.
Minot, G. R. and W. P. Murphy (2001). "Treatment of pernicious anemia by a special diet. 1926." Yale J Biol Med **74**(5): 341-353.
Mitani, A. and K. Kataoka (1991). "Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study." Neuroscience **42**(3): 661-670.
Mitchell, H. K., E. E. Snell, et al. (1988). "Journal of the American Chemical Society, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams." Nutr Rev **46**(9): 324-325.
Miyagawa, H., M. Hasegawa, et al. (1998). "Dissociation of impairment between spatial memory, and motor function and emotional behavior in aged rats." Behav Brain Res **91**(1-2): 73-81.

Mizumori, S. J., A. M. Lavoie, et al. (1996). "Redistribution of spatial representation in the hippocampus of aged rats performing a spatial memory task." Behav Neurosci **110**(5): 1006-1016.

Molloy, A. M., D. G. Weir, et al. (1999). "Homocysteine, folate enzymes and neural tube defects." Haematologica **84 Suppl EHA-4**: 53-56.

Monteiro, R. A. (1991). "Age-related quantitative changes in the organelles of rat neocerebellar Purkinje cells." Histol Histopathol **6**(1): 9-20.

Mondal, D., L. Pradhan, et al. (2004). "Signal transduction pathways involved in the lineage-differentiation of NSCs: can the knowledge gained from blood be used in the brain?" Cancer Invest **22**(6): 925-943.

Morley, A. A. and K. J. Trainor (2001). "Lack of an effect of vitamin E on lifespan of mice." Biogerontology **2**(2): 109-112.

Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. Learn.Motiv. **12**:239–261

Morrison, L. D., D. D. Smith, et al. (1996). "Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease." J Neurochem **67**(3): 1328-1331.

Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell **132**(4): 598-611.

Mosharov, E., M. R. Cranford, et al. (2000). "The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes." Biochemistry **39**(42): 13005-13011.

Moyers, S. B. and N. B. Kumar (2004). "Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials." Nutr Rev **62**(5): 204-211.

Mudd, S. H., J. D. Finkelstein, et al. (2000). "Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(7): 1704-1706.

Mudd, S. H., F. Skovby, et al. (1985). "The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency." Am J Hum Genet **37**(1): 1-31.

Mugnaini, E. and A. L. Dahl (1975). "Mode of distribution of aminergic fibers in the cerebellar cortex of the chicken." J Comp Neurol **162**(4): 417-432.

Muller, W. E., L. Stoll, et al. (1991). "Central cholinergic functioning and aging." Acta Psychiatr Scand Suppl **366**: 34-39.

Murray, C. A. and M. A. Lynch (1998). "Dietary supplementation with vitamin E reverses the age-related deficit in long term potentiation in dentate gyrus." J Biol Chem **273**(20): 12161-12168.

Murray, J. A. (1999). "The widening spectrum of celiac disease." Am J Clin Nutr **69**(3): 354-365.

Nakase, H., A. Heimann, et al. (2000). "Early-onset tolerance in rat global cerebral ischemia induced by a mitochondrial inhibitor." Neurosci Lett **290**(2): 105-108.

Nakatomi, H., T. Kuriu, et al. (2002). "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." Cell **110**(4): 429-441.

Namour, F., J. Olivier, et al. (2001). "Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood." Blood **97**(4): 1092-1098.

Nehlig, A. (1993). "Imaging and the ontogeny of brain metabolism." Baillieres Clin Endocrinol Metab **7**(3): 627-642.

Nehlig, A., A. P. de Vasconcelos, et al. (1988). "Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development." J Neurosci **8**(7): 2321-2333.

Nelen, W. L., H. J. Blom, et al. (2000). "Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss." Obstet Gynecol **95**(4): 519-524.

Ngun, T. C., N. Ghahramani, et al. (2011). "The genetics of sex differences in brain and behavior." Front Neuroendocrinol **32**(2): 227-246.

Nicholson, D. A., R. Yoshida, et al. (2004). "Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments." J Neurosci **24**(35): 7648-7653.

Nicolle, M. M., M. Gallagher, et al. (1999). "No loss of synaptic proteins in the hippocampus of aged, behaviorally impaired rats." Neurobiol Aging **20**(3): 343-348.

Niesen, C. E., A. Baskys, et al. (1988). "Reversed ethanol effects on potassium conductances in aged hippocampal dentate granule neurons." Brain Res **445**(1): 137-141.

Nishio, S., Z. F. Chen, et al. (1999). "Hypothermia-induced ischemic tolerance." Ann N Y Acad Sci **890**: 26-41.

Nishio, S., M. Yunoki, et al. (2000). "Ischemic tolerance in the rat neocortex following hypothermic preconditioning." J Neurosurg **93**(5): 845-851.

Nishiyama, M., Y. Kato, et al. (2000). "Apolipoprotein E, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation and the risk of senile dementia--an epidemiological study using the polymerase chain reaction (PCR) method." J Epidemiol **10**(3): 163-172.

Nishizawa, S., C. Benkelfat, et al. (1997). "Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5308-5313.

Northington, F. J., D. M. Ferriero, et al. (2001). "Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis." Neurobiol Dis **8**(2): 207-219.

Northington, F. J., M. E. Zelaya, et al. (2007). "Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as "continuum" phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain." Neuroscience **149**(4): 822-833.

Nosal, G. (1979). "Neuronal involution during ageing. Ultrastructural study in the rat cerebellum." Mech Ageing Dev **10**(5): 295-314.

Obeid, R. and W. Herrmann (2006). "Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia." FEBS Lett **580**(13): 2994-3005.

Obrenovitch, T. P., J. Urenjak, et al. (1993). "Extracellular neuroactive amino acids in the rat striatum during ischaemia: comparison between penumbral conditions and ischaemia with sustained anoxic depolarisation." J Neurochem **61**(1): 178-186.

Ogata, R., K. Ikari, et al. (1984). "Age-related changes in the Purkinje's cells in the rat cerebellar cortex: a quantitative electron microscopic study." Folia Psychiatr Neurol Jpn **38**(2): 159-167.

Ohyama, H., M. Hiramatsu, et al. (1995). "Age-related differences in synaptosomal membrane fluidity." Biochem Mol Biol Int **37**(1): 133-140.

Oldreive, C. E. and G. H. Doherty (2007). "Neurotoxic effects of homocysteine on cerebellar Purkinje neurons in vitro." Neurosci Lett **413**(1): 52-57.

Oler, J. A. and E. J. Markus (2000). "Age-related deficits in the ability to encode contextual change: a place cell analysis." Hippocampus **10**(3): 338-350.

Olney, J. W., M. T. Price, et al. (1987). "L-homocysteic acid: an endogenous excitotoxic ligand of the NMDA receptor." Brain Res Bull **19**(5): 597-602.

Olton DS, Samuelson RJ (1976). Remembrance of places passed: spatial memory in rats. ″J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process **2**:97–116.

Pakkenberg, B., D. Pelvig, et al. (2003). "Aging and the human neocortex." Exp Gerontol **38**(1-2): 95-99.

Palay SL,Chan-Palay V (1974). Cerebellar cortex: cytology and organization 1vol.,Berlin,Heidelberg ,New York,Springer-Verlag

Palmer, T. D., A. R. Willhoite, et al. (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." J Comp Neurol **425**(4): 479-494.

Panagiotakos, D. B., K. Dimakopoulou, et al. (2009). "Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors." Int J Epidemiol **38**(3): 856-866.

Panza, F., V. Frisardi, et al. (2009). "Possible role of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and polyunsaturated fatty acids in predementia syndromes and Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **16**(3): 467-470.

Papez, J. W. (1995). "A proposed mechanism of emotion. 1937." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **7**(1): 103-112.

Pappolla, M. A., R. A. Omar, et al. (1992). "Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease." Am J Pathol **140**(3): 621-628.

Parsons, R. B., R. H. Waring, et al. (1998). "In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines." Neurotoxicology **19**(4-5): 599-603.

Parton, L. E., C. P. Ye, et al. (2007). "Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity." Nature **449**(7159): 228-232.

Patrick, G. W. and W. J. Anderson (2000). "Dendritic alterations of cerebellar Purkinje neurons in postnatally lead-exposed kittens." Dev Neurosci **22**(4): 320-328.

Pedersen, W. A., S. L. Chan, et al. (2000). "A mechanism for the neuroprotective effect of apolipoprotein E: isoform-specific modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal." J Neurochem **74**(4): 1426-1433.

Penrice, J., A. Lorek, et al. (1997). "Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain during acute hypoxia-ischemia and delayed cerebral energy failure in the newborn piglet." Pediatr Res **41**(6): 795-802.

Pentney, R. J., B. A. Mullan, et al. (2002). "The total numbers of cerebellar granule neurons in young and aged Fischer 344 and Wistar-Kyoto rats do not change as a result of lengthy ethanol treatment." Cerebellum **1**(1): 79-89.

Perez-Martin, M., V. Salazar, et al. (2005). "Estradiol and soy extract increase the production of new cells in the dentate gyrus of old rats." Exp Gerontol **40**(5): 450-453.

Perez-Pinzon, M. A. and J. G. Born (1999). "Rapid preconditioning neuroprotection following anoxia in hippocampal slices: role of the K+ ATP channel and protein kinase C." Neuroscience **89**(2): 453-459.

Perlman, J. M. (2006). "Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy." Pediatrics **117**(3 Pt 2): S28-33.

Perna, A. F., D. Ingrosso, et al. (2003). "Homocysteine and oxidative stress." Amino Acids **25**(3-4): 409-417.

Peretto, P., A. Merighi, et al. (1999). "The subependymal layer in rodents: a site of structural plasticity and cell migration in the adult mammalian brain." Brain Res Bull **49**(4): 221-243.

Perry, P., S. Sauer, et al. (2004). "A dynamic switch in the replication timing of key regulator genes in embryonic stem cells upon neural induction." Cell Cycle **3**(12): 1645-1650.

Peters, R., J. Peters, et al. (2008). "Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review." Age Ageing **37**(5): 505-512.

Petersohn, D., S. Schoch, et al. (1995). "The human synapsin II gene promoter. Possible role for the transcription factor zif268/egr-1, polyoma enhancer activator 3, and AP2." J Biol Chem **270**(41): 24361-24369.

Petrus, A. K., T. J. Fairchild, et al. (2009). "Traveling the vitamin B12 pathway: oral delivery of protein and peptide drugs." Angew Chem Int Ed Engl **48**(6): 1022-1028.

Piedrahita, J. A., B. Oetama, et al. (1999). "Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development." Nat Genet **23**(2): 228-232.

Pires, R. S., C. C. Real, et al. (2010). "Differential response of AMPA and NMDA glutamate receptors of Purkinje cells to aging of the chicken cerebellum." Neurosci Lett **478**(3): 146-149.

Plamondon, H., N. Blondeau, et al. (1999). "Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels." J Cereb Blood Flow Metab **19**(12): 1296-1308.

Poddar, R. and S. Paul (2009). "Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death." J Neurochem **110**(3): 1095-1106.

Pokorny, J. and T. Yamamoto (1981). "Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons." Brain Res Bull **7**(2): 113-120.

Poon, H. F., V. Calabrese, et al. (2004). "Free radicals and brain aging." Clin Geriatr Med **20**(2): 329-359.

Poon, H. F., V. Calabrese, et al. (2004). "Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(5): 478-493.

Porras-Garcia, E., J. Cendelin, et al. (2005). "Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice." Eur J Neurosci **21**(4): 979-988.

Porras-Garcia, E., R. Sanchez-Campusano, et al. (2010). "Behavioral characteristics, associative learning capabilities, and dynamic association mapping in an animal model of cerebellar degeneration." J Neurophysiol **104**(1): 346-365.

Potegal, M. (1969). "Role of the caudate nucleus in spatial orientation of rats." J Comp Physiol Psychol **69**(4): 756-764.

Potier, B., O. Rascol, et al. (1992). "Alterations in the properties of hippocampal pyramidal neurons in the aged rat." Neuroscience **48**(4): 793-806.

Pourie, G., S. Blaise, et al. (2006). "Mild, non-lesioning transient hypoxia in the newborn rat induces delayed brain neurogenesis associated with improved memory scores." Neuroscience **140**(4): 1369-1379.

Prass, K., A. Scharff, et al. (2003). "Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin." Stroke **34**(8): 1981-1986.

Pratt, J., J. Rataud, et al. (1992). "Neuroprotective actions of riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia." Neurosci Lett **140**(2): 225-230.

Prudova, A., Z. Bauman, et al. (2006). "S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(17): 6489-6494.

Purkinje, JE (1837) Bericht über die Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Prague Anat. Physiol. Ver. 3:177-180. (Report on the conference of German scientists and doctors in Prague.)

Pyapali, G. K. and D. A. Turner (1996). "Increased dendritic extent in hippocampal CA1 neurons from aged F344 rats." Neurobiol Aging **17**(4): 601-611.

Quackenbush, L. J., H. Ngo, et al. (1990). "Evidence for nonrandom regression of dendrites of Purkinje neurons during aging." Neurobiol Aging **11**(2): 111-115.

Rajagopalan, P., X. Hua, et al. (2011). "Homocysteine effects on brain volumes mapped in 732 elderly individuals." Neuroreport **22**(8): 391-395.

Rakic, P. (1971). "Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus." J Comp Neurol **141**(3): 283-312.

Rakic, P. and R. L. Sidman (1973). "Sequence of developmental abnormalities leading to granule cell deficit in cerebellar cortex of weaver mutant mice." J Comp Neurol **152**(2): 103-132.

Ramassamy, C., D. Averill, et al. (1999). "Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype." Free Radic Biol Med **27**(5-6): 544-553.

Ramón y Cajal S Drawing of Purkinje cells (A) and granule cells (B) from pigeon cerebellum by Santiago Ramón y Cajal, 1899. Instituto Santiago Ramón y Cajal, Madrid, Spain

Ramón y Cajal S Degeneration and Regeneration of the Nervous System. New York: Oxford University Press, American Branch, 1928, Vol. 1, pp. 396, and Vol. 2, pp. 369-769.)

Rao, A. M., M. K. Baskaya, et al. (1997). "Beneficial effects of S-adenosyl-L-methionine on blood-brain barrier breakdown and neuronal survival after transient cerebral ischemia in gerbils." Brain Res Mol Brain Res **44**(1): 134-138.

Rapp, P. R. and M. Gallagher (1996). "Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9926-9930.

Rasmussen, T., T. Schliemann, et al. (1996). "Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons." Neurobiol Aging **17**(1): 143-147.

Refsum, H., P. M. Ueland, et al. (1998). "Homocysteine and cardiovascular disease." Annu Rev Med **49**: 31-62.

Regland, B., B. V. Johansson, et al. (1995). "Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia." J Neural Transm Gen Sect **100**(2): 165-169.

Reis, E. A., A. I. Zugno, et al. (2002). "Pretreatment with vitamins E and C prevent the impairment of memory caused by homocysteine administration in rats." Metab Brain Dis **17**(3): 211-217.

Renaud, S., M. de Lorgeril, et al. (1995). "Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease." Am J Clin Nutr **61**(6 Suppl): 1360S-1367S.

Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.

Reynolds, E. H., J. M. Preece, et al. (1970). "Folate deficiency in depressive illness." Br J Psychiatry **117**(538): 287-292.

Rhodes, M. E. and R. T. Rubin (1999). "Functional sex differences ('sexual diergism') of central nervous system cholinergic systems, vasopressin, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in mammals: a selective review." Brain Res Brain Res Rev **30**(2): 135-152.

Rich-Edwards, J. W., M. J. Stampfer, et al. (1997). "Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976." BMJ **315**(7105): 396-400.

Richter, C., J. W. Park, et al. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6465-6467.

Riepe, M. W., W. N. Niemi, et al. (1996). "Mitochondrial oxidation in rat hippocampus can be preconditioned by selective chemical inhibition of succinic dehydrogenase." Exp Neurol **138**(1): 15-21.

Ringman, J. M., S. A. Frautschy, et al. (2005). "A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **2**(2): 131-136.

Ritz, E., K. Amann, et al. (2011). "Prenatal programming-effects on blood pressure and renal function." Nat Rev Nephrol **7**(3): 137-144.

Robert, K., C. Pages, et al. (2005). "Regulation of extracellular signal-regulated kinase by homocysteine in hippocampus." Neuroscience **133**(4): 925-935.

Robert, K., F. Vialard, et al. (2003). "Expression of the cystathionine beta synthase (CBS) gene during mouse development and immunolocalization in adult brain." J Histochem Cytochem **51**(3): 363-371.

Robscheit-Robbins, F. S. and G. H. Whipple (1929). "Blood regeneration in severe anemia : xiv. A liver fraction potent in pernicious anemia fed alone and combined with whole liver, liver ash and fresh bile." J Exp Med **49**(2): 215-227.

Rogers, J., S. F. Zornetzer, et al. (1981). "Senescent pathology of cerebellum: Purkinje neurons and their parallel fiber afferents." Neurobiol Aging **2**(1): 15-25.

Rogers, J., S. F. Zornetzer, et al. (1984). "Senescent microstructural changes in rat cerebellum." Brain Res **292**(1): 23-32.

Rondouin, G., M. J. Drian, et al. (1988). "Non-competitive antagonists of N-methyl-D-aspartate receptors protect cortical and hippocampal cell cultures against glutamate neurotoxicity." Neurosci Lett **91**(2): 199-203.

Rosenbaum, R. S., S. Kohler, et al. (2005). "The case of K.C.: contributions of a memory-impaired person to memory theory." Neuropsychologia **43**(7): 989-1021.

Rosenberg, I. H. (1990). "1989 Herman Award lecture. Folate absorption: clinical questions and metabolic answers." Am J Clin Nutr **51**(4): 531-534.

Rosenzweig, E. S. and C. A. Barnes (2003). "Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition." Prog Neurobiol **69**(3): 143-179.

Rosenzweig, E. S., G. Rao, et al. (1997). "Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits." Hippocampus **7**(5): 549-558.

Rosenzweig, H. L., N. S. Lessov, et al. (2004). "Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice." Stroke **35**(11): 2576-2581.

Rybnikova, E., T. Gluschenko, et al. (2008). "Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia." J Neurochem **106**(3): 1450-1458.

Sai, X., Y. Kawamura, et al. (2002). "Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid beta-protein." J Biol Chem **277**(15): 12915-12920.

Salford, L. G., F. Plum, et al. (1973). "Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications." Arch Neurol **29**(4): 234-238.

Salminen, A., P. K. Liu, et al. (1995). "Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain." Biochem Biophys Res Commun **212**(3): 939-944.

Sano, M., C. Ernesto, et al. (1996). "Rationale and design of a multicenter study of selegiline and alpha-tocopherol in the treatment of Alzheimer disease using novel clinical outcomes. Alzheimer's Disease Cooperative Study." Alzheimer Dis Assoc Disord **10**(3): 132-140.

Sano, M., C. Ernesto, et al. (1997). "A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study." N Engl J Med **336**(17): 1216-1222.

Saravia, F., J. Beauquis, et al. (2007). "Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice." Psychoneuroendocrinology **32**(5): 480-492.

Saravia, F., Y. Revsin, et al. (2004). "Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice." J Neuroendocrinol **16**(8): 704-710.

Sauerwald, A., C. Hoesche, et al. (1990). "The 5'-flanking region of the synapsin I gene. A G+C-rich, TATA- and CAAT-less, phylogenetically conserved sequence with cell type-specific promoter function." J Biol Chem **265**(25): 14932-14937.

Sawada, M. and H. E. Enesco (1984). "Vitamin E extends lifespan in the short-lived rotifer Asplanchna brightwelli." Exp Gerontol **19**(3): 179-183.

Scalabrino, G. (2005). "Cobalamin (vitamin B(12)) in subacute combined degeneration and beyond: traditional interpretations and novel theories." Exp Neurol **192**(2): 463-479.

Scarpa, S., A. Fuso, et al. (2003). "Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease?" FEBS Lett **541**(1-3): 145-148.

Schade, S. G. and R. F. Schilling (1967). "Effect of pepsin on the absorption of food vitamin B12 and iron." Am J Clin Nutr **20**(6): 636-640.

Scharfman, H. E. and N. J. Maclusky (2005). "Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue?" Trends Neurosci **28**(2): 79-85.

Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.

Seay-Lowe, S. L. and B. J. Claiborne (1992). "Morphology of intracellularly labeled interneurons in the dentate gyrus of the immature rat." J Comp Neurol **324**(1): 23-36.

Seetharam, B., S. S. Bagur, et al. (1982). "Isolation and characterization of proteolytically derived ileal receptor for intrinsic factor-cobalamin." J Biol Chem **257**(1): 183-189.

Seetharam, B., J. S. Levine, et al. (1988). "Purification, properties, and immunochemical localization of a receptor for intrinsic factor-cobalamin complex in the rat kidney." J Biol Chem **263**(9): 4443-4449.

Seki, T. and Y. Arai (1993). "Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat." J Neurosci **13**(6): 2351-2358.

Seller, M. J. and M. Adinolfi (1981). "The curly-tail mouse: an experimental model for human neural tube defects." Life Sci **29**(16): 1607-1615.

Selhub, J. (1999). "Homocysteine metabolism." Annu Rev Nutr **19**: 217-246.

Selhub, J., P. F. Jacques, et al. (1993). "Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population." JAMA **270**(22): 2693-2698.

Selkoe, D. J. (2001). "Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11039-11041.

Seress, L., M. Frotscher, et al. (1989). "Local circuit neurons in both the dentate gyrus and Ammon's horn establish synaptic connections with principal neurons in five day old rats: a morphological basis for inhibition in early development." Exp Brain Res **78**(1): 1-9.

Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2004). "Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus." J Comp Neurol **478**(4): 359-378.

Serot, J. M., D. Christmann, et al. (2001). "CSF-folate levels are decreased in late-onset AD patients." J Neural Transm **108**(1): 93-99.

Serra, M., A. Chan, et al. (2008). "Folate and S-adenosylmethionine modulate synaptic activity in cultured cortical neurons: acute differential impact on normal and apolipoprotein-deficient mice." Phys Biol **5**(4): 044002.

Servais, L., R. Hourez, et al. (2007). "Purkinje cell dysfunction and alteration of long-term synaptic plasticity in fetal alcohol syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9858-9863.

Seshadri, S., A. Beiser, et al. (2002). "Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease." N Engl J Med **346**(7): 476-483.

Seshadri, S., P. A. Wolf, et al. (2008). "Association of plasma total homocysteine levels with subclinical brain injury: cerebral volumes, white matter hyperintensity, and silent

brain infarcts at volumetric magnetic resonance imaging in the Framingham Offspring Study." Arch Neurol **65**(5): 642-649.

Shallice, T. (1979). Neuropsychological research and the fractionation of memory systems. In Perspectives in Memory Research., (L.-G. Nilsson), pp. 257-277

Shamloo, M., A. Rytter, et al. (1999). "Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in the hippocampal CA1 region in a rat model of global cerebral ischemic preconditioning." Neuroscience **93**(1): 81-88.

Sharp, F. R. and M. Bernaudin (2004). "HIF1 and oxygen sensing in the brain." Nat Rev Neurosci **5**(6): 437-448.

Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol **4**(5): E131-136.

Shea, T. B. and E. Rogers (2002). "Folate quenches oxidative damage in brains of apolipoprotein E-deficient mice: augmentation by vitamin E." Brain Res Mol Brain Res **108**(1-2): 1-6.

Shea, T. B., E. Rogers, et al. (2002). "Apolipoprotein E deficiency promotes increased oxidative stress and compensatory increases in antioxidants in brain tissue." Free Radic Biol Med **33**(8): 1115-1120.

Shen, J., C. A. Barnes, et al. (1997). "The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells." J Neurosci **17**(17): 6769-6782.

Shenkin, S. D., M. E. Bastin, et al. (2003). "Childhood and current cognitive function in healthy 80-year-olds: a DT-MRI study." Neuroreport **14**(3): 345-349.

Sherry, D. F.et Schacter, D. L. (1987). The evolution of multiple memory systems. ″Psychol Rev″ **94**: 439-454

Sherwin, B. B. and J. F. Henry (2008). "Brain aging modulates the neuroprotective effects of estrogen on selective aspects of cognition in women: a critical review." Front Neuroendocrinol **29**(1): 88-113.

Shi, Q., J. E. Savage, et al. (2003). "L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists." J Pharmacol Exp Ther **305**(1): 131-142.

Shigenaga, M. K. and B. N. Ames (1991). "Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage." Free Radic Biol Med **10**(3-4): 211-216.

Shigeno, T., T. Mima, et al. (1991). "Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor." J Neurosci **11**(9): 2914-2919.

Shiloh, R., A. Weizman, et al. (2001). "[Antidepressive effect of pyridoxine (vitamin B6) in neuroleptic-treated schizophrenic patients with co-morbid minor depression--preliminary open-label trial]." Harefuah **140**(5): 369-373, 456.

Shimada, N., R. Graf, et al. (1993). "Ischemia-induced accumulation of extracellular amino acids in cerebral cortex, white matter, and cerebrospinal fluid." J Neurochem **60**(1): 66-71.

Shpargel, K. B., W. Jalabi, et al. (2008). "Preconditioning paradigms and pathways in the brain." Cleve Clin J Med **75 Suppl 2**: S77-82.

Shughrue, P. J., M. V. Lane, et al. (1997). "Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system." J Comp Neurol **388**(4): 507-525.

Shughrue, P. J., P. J. Scrimo, et al. (2000). "Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ERalpha and ERbeta) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain." Neuroscience **96**(1): 41-49.

Siddiqui, A. and B. H. Shah (1997). "Neonatal androgen manipulation differentially affects the development of monoamine systems in rat cerebral cortex, amygdala and hypothalamus." Brain Res Dev Brain Res **98**(2): 247-252.

Sidman, R. L., P. W. Lane, et al. (1962). "Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum." Science **137**: 610-612.
Simon, R. P. (1999). "Hypoxia versus ischemia." Neurology **52**(1): 7-8.
Singhal, A., T. J. Cole, et al. (2001). "Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: two cohorts after randomised trials." Lancet **357**(9254): 413-419.
Singhal, A. and A. Lucas (2004). "Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis?" Lancet **363**(9421): 1642-1645.
Singhal, A., T. J. Cole, et al. (2004). "Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study." Lancet **363**(9421): 1571-1578.
Smith, A. C., J. L. Gerrard, et al. (2000). "Effect of age on burst firing characteristics of rat hippocampal pyramidal cells." Neuroreport **11**(17): 3865-3871.
Smith, A. D., S. M. Smith, et al. (2010). "Homocysteine-lowering by B vitamins slows the rate of accelerated brain atrophy in mild cognitive impairment: a randomized controlled trial." PLoS One **5**(9): e12244.
Smith, C. D., J. M. Carney, et al. (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10540-10543.
Smith, T. D., M. M. Adams, et al. (2000). "Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats." J Neurosci **20**(17): 6587-6593.
Smithells, R. W., N. C. Nevin, et al. (1983). "Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences." Lancet **1**(8332): 1027-1031.
Smithells, R. W., S. Sheppard, et al. (1976). "Vitamin dificiencies and neural tube defects." Arch Dis Child **51**(12): 944-950.
Smithells, R. W., S. Sheppard, et al. (1980). "Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation." Lancet **1**(8164): 339-340.
Smolin, L. A. and N. J. Benevenga (1982). "Accumulation of homocyst(e)ine in vitamin B-6 deficiency: a model for the study of cystathionine beta-synthase deficiency." J Nutr **112**(7): 1264-1272.
Smolin, L. A., T. D. Crenshaw, et al. (1983). "Homocyst(e)ine accumulation in pigs fed diets deficient in vitamin B-6: relationship to atherosclerosis." J Nutr **113**(10): 2022-2033.
Snowdon, D. A., C. L. Tully, et al. (2000). "Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun study." Am J Clin Nutr **71**(4): 993-998.
Sofi, F. (2009). "The Mediterranean diet revisited: evidence of its effectiveness grows." Curr Opin Cardiol **24**(5): 442-446.
Sohn, K. J., R. Croxford, et al. (2004). "Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate." J Natl Cancer Inst **96**(2): 134-144.
Sommer, C., A. Fahrner, et al. (2002). "[3H]muscimol binding to gamma-aminobutyric acid(A) receptors is upregulated in CA1 neurons of the gerbil hippocampus in the ischemia-tolerant state." Stroke **33**(6): 1698-1705.
Sontag, E., C. Hladik, et al. (2004). "Downregulation of protein phosphatase 2A carboxyl methylation and methyltransferase may contribute to Alzheimer disease pathogenesis." J Neuropathol Exp Neurol **63**(10): 1080-1091.
Sontag, J. M., V. Nunbhakdi-Craig, et al. (2008). "Folate deficiency induces in vitro and mouse brain region-specific downregulation of leucine carboxyl methyltransferase-1 and protein phosphatase 2A B(alpha) subunit expression that correlate with enhanced tau phosphorylation." J Neurosci **28**(45): 11477-11487.

Soriano, E., A. Cobas, et al. (1989). "Neurogenesis of glutamic acid decarboxylase immunoreactive cells in the hippocampus of the mouse. II: Area dentata." J Comp Neurol **281**(4): 603-611.

Squire, L. R. (1992). "Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans." Psychol Rev **99**(2): 195-231.

Squire, L. R. (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." Neurobiol Learn Mem **82**(3): 171-177.

Staff, R. T., A. D. Murray, et al. (2004). "What provides cerebral reserve?" Brain **127**(Pt 5): 1191-1199.

Stagliano, N. E., M. A. Perez-Pinzon, et al. (1999). "Focal ischemic preconditioning induces rapid tolerance to middle cerebral artery occlusion in mice." J Cereb Blood Flow Metab **19**(7): 757-761.

Stanger, O., B. Fowler, et al. (2009). "Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations." Expert Rev Neurother **9**(9): 1393-1412.

Steegers-Theunissen, R. P., G. H. Boers, et al. (1995). "Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid." Am J Obstet Gynecol **172**(5): 1436-1441.

Steegers-Theunissen, R. P., G. H. Boers, et al. (1994). "Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects?" Metabolism **43**(12): 1475-1480.

Stenzel-Poore, M. P., S. L. Stevens, et al. (2004). "Genomics of preconditioning." Stroke **35**(11 Suppl 1): 2683-2686.

Stenzel-Poore, M. P., S. L. Stevens, et al. (2003). "Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states." Lancet **362**(9389): 1028-1037.

Stevenson, R. E., C. E. Schwartz, et al. (1997). "Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks." Am J Hum Genet **60**(1): 229-230.

Streck, E. L., C. S. Bavaresco, et al. (2004). "Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task." Behav Brain Res **153**(2): 377-381.

Streck, E. L., D. Delwing, et al. (2003). "Brain energy metabolism is compromised by the metabolites accumulating in homocystinuria." Neurochem Int **43**(6): 597-602.

Stromberg, I., C. Gemma, et al. (2005). "Blueberry- and spirulina-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system." Exp Neurol **196**(2): 298-307.

Stubbe, J. (2011). "Biochemistry. The two faces of SAM." Science **332**(6029): 544-545.

Sugino, T., K. Nozaki, et al. (1999). "3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus in vivo." Neurosci Lett **259**(1): 9-12.

Susser, E., A. S. Brown, et al. (1998). "Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association." Biol Psychiatry **44**(2): 141-143.

Swan, G. E. and C. N. Lessov-Schlaggar (2007). "The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain." Neuropsychol Rev **17**(3): 259-273.

Sweeney, M. I., W. Kalt, et al. (2002). "Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage." Nutr Neurosci **5**(6): 427-431.

Swinny, J. D., J. J. van der Want, et al. (2005). "Cerebellar development and plasticity: perspectives for motor coordination strategies, for motor skills, and for therapy." Neural Plast **12**(2-3): 153-160; discussion 263-172.

Taga, K., P. M. Patel, et al. (1997). "Transient neuronal depolarization induces tolerance to subsequent forebrain ischemia in rats." Anesthesiology **87**(4): 918-925.

Takeuchi, Y., H. Kimura, et al. (1982). "Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing nerve fibers in the cerebellum." Cell Tissue Res **226**(1): 1-12.

Talaulikar, V. S. and S. Arulkumaran (2011). "Folic acid in obstetric practice: a review." Obstet Gynecol Surv **66**(4): 240-247.

Tanaka, K., T. Tsukahara, et al. (1994). "Effect of nerve growth factor on delayed neuronal death after cerebral ischaemia." Acta Neurochir (Wien) **129**(1-2): 64-71.

Tanaka, S., K. Kitagawa, et al. (2002). "Synergistic induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus." J Neurosci Res **67**(1): 37-47.

Tanapat, P., N. B. Hastings, et al. (2005). "Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner." J Comp Neurol **481**(3): 252-265.

Tang, Y., A. C. Nee, et al. (2003). "Blood genomic expression profile for neuronal injury." J Cereb Blood Flow Metab **23**(3): 310-319.

Tarim, O. (2011). "Thyroid hormones and growth in health and disease." J Clin Res Pediatr Endocrinol **3**(2): 51-55.

Tasaki, K., C. A. Ruetzler, et al. (1997). "Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats." Brain Res **748**(1-2): 267-270.

Tchantchou, F., M. Graves, et al. (2004). "Dietary supplementation with 3-deaza adenosine, N-acetyl cysteine, and S-adenosyl methionine provide neuroprotection against multiple consequences of vitamin deficiency and oxidative challenge: relevance to age-related neurodegeneration." Neuromolecular Med **6**(2-3): 93-103.

Tchantchou, F., M. Graves, et al. (2005). "N-acteyl cysteine alleviates oxidative damage to central nervous system of ApoE-deficient mice following folate and vitamin E-deficiency." J Alzheimers Dis **7**(2): 135-138; discussion 173-180.

Thiel, G., S. Schoch, et al. (1994). "Regulation of synapsin I gene expression by the zinc finger transcription factor zif268/egr-1." J Biol Chem **269**(21): 15294-15301.

Thomas, P. K., A. V. Hoffbrand, et al. (1982). "Neurological involvement in hereditary transcobalamin II deficiency." J Neurol Neurosurg Psychiatry **45**(1): 74-77.

Tiemeier, H., R. K. Lenroot, et al. (2010). "Cerebellum development during childhood and adolescence: a longitudinal morphometric MRI study." Neuroimage **49**(1): 63-70.

Tolstykh, T., J. Lee, et al. (2000). "Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits." EMBO J **19**(21): 5682-5691.

Tomat, A. L., L. Costa Mde, et al. (2011). "Zinc restriction during different periods of life: influence in renal and cardiovascular diseases." Nutrition **27**(4): 392-398.

Tomonaga, M., H. Yamanouchi, et al. (1975). "[Hirano bodies observed in the brain of the aged (1)]." Nihon Ronen Igakkai Zasshi **12**(1): 13-17.

Toyoda, T., N. F. Kassell, et al. (1997). "Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia." Neuroreport **8**(4): 847-851.

Tran, P., F. Hiou-Tim, et al. (2002). "The curly-tail (ct) mouse, an animal model of neural tube defects, displays altered homocysteine metabolism without folate responsiveness or a defect in Mthfr." Mol Genet Metab **76**(4): 297-304.

Trifunovic, A., A. Wredenberg, et al. (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." Nature **429**(6990): 417-423.

Troen, A. M., M. Shea-Budgell, et al. (2008). "B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12474-12479

Troen, A. M. (2005). "The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**(7): 1140-1151.

Trovarelli, G., G. E. De Medio, et al. (1983). "The effect of S-Adenosyl-L-methionine on ischemia-induced disturbances of brain phospholipid in the gerbil." Neurochem Res **8**(12): 1597-1609.

Truettner, J., R. Busto, et al. (2002). "Effect of ischemic preconditioning on the expression of putative neuroprotective genes in the rat brain." Brain Res Mol Brain Res **103**(1-2): 106-115.

Tulving, E., D. L. Schacter, et al. (1988). "Priming of semantic autobiographical knowledge: a case study of retrograde amnesia." Brain Cogn **8**(1): 3-20.

Tulving, E., C. A. Hayman, et al. (1991). "Long-lasting perceptual priming and semantic learning in amnesia: a case experiment." J Exp Psychol Learn Mem Cogn **17**(4): 595-617.

Tulving, E. (1995). Organisation of memory: Quo vadis? In The cognitive neurosciences, pp. 839-847. MIT Press: Cambridge

Turner, D. A. and D. L. Deupree (1991). "Functional elongation of CA1 hippocampal neurons with aging in Fischer 344 rats." Neurobiol Aging **12**(3): 201-210.

Tyagi, S. C., D. Lominadze, et al. (2005). "Homocysteine in microvascular endothelial cell barrier permeability." Cell Biochem Biophys **43**(1): 37-44.

Ubbink, J. B. (1995). "Is an elevated circulating maternal homocysteine concentration a risk factor for neural tube defects?" Nutr Rev **53**(6): 173-175.

Uekawa, A., K. Katsushima, et al. (2009). "Change of epigenetic control of cystathionine beta-synthase gene expression through dietary vitamin B12 is not recovered by methionine supplementation." J Nutrigenet Nutrigenomics **2**(1): 29-36.

Ullegaddi, R., H. J. Powers, et al. (2004). "B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke." Clin Sci (Lond) **107**(5): 477-484.

Ullman, M. T. (2004). "Contributions of memory circuits to language: the declarative/procedural model." Cognition **92**(1-2): 231-270.

Ulmann, L., V. Mimouni, et al. (2001). "Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relative cognitive deficit rats." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **64**(3): 189-195.

Uspenskaia, O., M. Liebetrau, et al. (2004). "Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels." BMC Neurosci **5**: 37.

Vafai, S. B. and J. B. Stock (2002). "Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease." FEBS Lett **518**(1-3): 1-4.

Valencia, R. (1974). "[Control of cellular division by vitamin B 12 and folates]." J Physiol (Paris) **69**(1): 5A-76A.

Van der Put, N. M., H. W. van Straaten, et al. (2001). "Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview." Exp Biol Med (Maywood) **226**(4): 243-270.

Van Dyk, K. and M. Sano (2007). "The impact of nutrition on cognition in the elderly." Neurochem Res **32**(4-5): 893-904.

Vannucci, R. C. and J. M. Perlman (1997). "Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy." Pediatrics **100**(6): 1004-1014.

Vannucci, R. C., J. Towfighi, et al. (1998). "Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates." J Neurochem **71**(3): 1215-1220.

Vannucci, R. C., J. Towfighi, et al. (2004). "Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat." J Cereb Blood Flow Metab **24**(10): 1090-1097.

Vannucci, R. C. and S. J. Vannucci (2000). "Glucose metabolism in the developing brain." Semin Perinatol **24**(2): 107-115.

Vannucci, R. C., J. Y. Yager, et al. (1994). "Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat." J Cereb Blood Flow Metab **14**(2): 279-288.

Vargha-Khadem, F., D. G. Gadian, et al. (1997). "Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory." Science **277**(5324): 376-380.

Veinbergs, I., E. Van Uden, et al. (2001). "Role of apolipoprotein E receptors in regulating the differential in vivo neurotrophic effects of apolipoprotein E." Exp Neurol **170**(1): 15-26.

Verde, P., L. Casalino, et al. (2007). "Deciphering AP-1 function in tumorigenesis: fra-ternizing on target promoters." Cell Cycle **6**(21): 2633-2639.

Villalobos, M. A., J. P. De La Cruz, et al. (2000). "Effect of S-adenosyl-L-methionine on rat brain oxidative stress damage in a combined model of permanent focal ischemia and global ischemia-reperfusion." Brain Res **883**(1): 31-40.

Vincent, S. R. and E. G. McGeer (1981). "A substance P projection to the hippocampus." Brain Res **215**(1-2): 349-351.

Vitvitsky, V., S. Dayal, et al. (2004). "Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(1): R39-46.

Vogelsberg-Ragaglia, V., T. Schuck, et al. (2001). "PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus." Exp Neurol **168**(2): 402-412.

Volpe JJ, Neurology of the Newborn, 5th edition, 2008

Voyer, D., S. Voyer, et al. (1995). "Magnitude of sex differences in spatial abilities: a meta-analysis and consideration of critical variables." Psychol Bull **117**(2): 250-270.

Wagner,C (1995). Biochemical role of folate in cellular metabolism. Bailey L.B. eds. Folate in Health and Disease 1995:23-42 Marcel Dekker New York, NY

Wald, D. S., A. Kasturiratne, et al. (2010). "Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive decline: meta-analysis of randomized trials." Am J Med **123**(6): 522-527 e522.

Walton, M., E. Sirimanne, et al. (1996). "The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair." Brain Res Mol Brain Res **43**(1-2): 21-29.

Waly, M. I., K. K. Kharbanda, et al. (2011). "Ethanol lowers glutathione in rat liver and brain and inhibits methionine synthase in a cobalamin-dependent manner." Alcohol Clin Exp Res **35**(2): 277-283.

Wang, G. L., B. H. Jiang, et al. (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5510-5514.

Wang, J. Z., C. X. Gong, et al. (1995). "Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B." J Biol Chem **270**(9): 4854-4860.

Wang, Q., X. N. Tang, et al. (2007). "The inflammatory response in stroke." J Neuroimmunol **184**(1-2): 53-68.

Wang, R. M., F. Yang, et al. (2006). "Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate Ca2+ influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats." Life Sci **79**(19): 1839-1846.

Wang, R. M., Q. G. Zhang, et al. (2005). "Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia." J Neurosci Res **80**(3): 391-399.

Wang, X. L., N. Duarte, et al. (1999). "Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population." Atherosclerosis **146**(1): 133-140.

Wang, Y., C. F. Chang, et al. (2005). "Dietary supplementation with blueberries, spinach, or spirulina reduces ischemic brain damage." Exp Neurol **193**(1): 75-84.

Watanabe, H., H. Abe, et al. (2000). "Protective effect of microglial conditioning medium on neuronal damage induced by glutamate." Neurosci Lett **289**(1): 53-56.

Watanabe, M., J. Osada, et al. (1995). "Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1585-1589.

Waterland, R. A. and K. B. Michels (2007). "Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis." Annu Rev Nutr **27**: 363-388.

Watkins, D., M. Ru, et al. (2002). "Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L." Am J Hum Genet **71**(1): 143-153.

Weaver, I. C. (2009). "Shaping adult phenotypes through early life environments." Birth Defects Res C Embryo Today **87**(4): 314-326.

Weisberg, I., P. Tran, et al. (1998). "A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity." Mol Genet Metab **64**(3): 169-172.

Weisberg, I. S., P. F. Jacques, et al. (2001). "The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine." Atherosclerosis **156**(2): 409-415.

Weiss, N., S. J. Heydrick, et al. (2003). "Influence of hyperhomocysteinemia on the cellular redox state--impact on homocysteine-induced endothelial dysfunction." Clin Chem Lab Med **41**(11): 1455-1461.

Wenstrom, K. D., G. L. Johanning, et al. (2000)a. "Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrafolate reductase genotypes, and neural tube closure sites." Am J Med Genet **90**(1): 6-11.

Wenstrom, K. D., G. L. Johanning, et al. (2000)b. "Role of amniotic fluid homocysteine level and of fetal 5, 10-methylenetetrahydrafolate reductase genotype in the etiology of neural tube defects." Am J Med Genet **90**(1): 12-16.

White, A. R., X. Huang, et al. (2001). "Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways." J Neurochem **76**(5): 1509-1520.

Whitfield, P. C., R. Williams, et al. (1999). "Delayed induction of JunB precedes CA1 neuronal death after global ischemia in the gerbil." Brain Res **818**(2): 450-458.

Wieloch, T., O. Lindvall, et al. (1985). "Evidence for amelioration of ischaemic neuronal damage in the hippocampal formation by lesions of the perforant path." Neurol Res **7**(1): 24-26.

Willett, W. C., F. Sacks, et al. (1995). "Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating." Am J Clin Nutr **61**(6 Suppl): 1402S-1406S.

Wills, L. (1931). "Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia"." Br Med J **1**(3676): 1059-1064.

Wilson, A., R. Platt, et al. (1999). "A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida." Mol Genet Metab **67**(4): 317-323.

Witte, H. and F. Bradke (2008). "The role of the cytoskeleton during neuronal polarization." Curr Opin Neurobiol **18**(5): 479-487.

Wolff, G. L., R. L. Kodell, et al. (1998). "Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice." FASEB J **12**(11): 949-957.

Woodruff-Pak, D. S. (2006). "Stereological estimation of Purkinje neuron number in C57BL/6 mice and its relation to associative learning." Neuroscience **141**(1): 233-243.

Woodruff-Pak, D. S., M. R. Foy, et al. (2010). "Differential effects and rates of normal aging in cerebellum and hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1624-1629.

Wu, C., R. Z. Zhan, et al. (2001). "A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice." J Neurosci Methods **107**(1-2): 101-106.

Wyse, A. T., A. I. Zugno, et al. (2002). "Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment." Neurochem Res **27**(12): 1685-1689.

Xu, M., H. Shibayama, et al. (1992). "Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients--a quantitative study." Acta Neuropathol **85**(1): 1-9.

Yagita, Y., K. Kitagawa, et al. (2001). "Induction of the HSP110/105 family in the rat hippocampus in cerebral ischemia and ischemic tolerance." J Cereb Blood Flow Metab **21**(7): 811-819.

Yamada, K., T. Tanaka, et al. (1999). "Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo." Eur J Neurosci **11**(1): 83-90.

Yanamoto, H., N. Hashimoto, et al. (1998). "Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression in rat brain." Brain Res **784**(1-2): 239-249.

Yasui, K., H. Kowa, et al. (2000). "Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa-treated patients with PD." Neurology **55**(3): 437-440.

Yates, Z. and M. Lucock (2003). "Interaction between common folate polymorphisms and B-vitamin nutritional status modulates homocysteine and risk for a thrombotic event." Mol Genet Metab **79**(3): 201-213.

Yoneda, M., K. Katsumata, et al. (1995). "Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome." Biochem Biophys Res Commun **209**(2): 723-729.

Young, E., J. Olney, et al. (1983). "Selective alterations of opiate receptor subtypes in monosodium glutamate-treated rats." J Neurochem **40**(6): 1558-1564.

Yrjanheikki, J., R. Keinanen, et al. (1998). "Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15769-15774.

Yrjanheikki, J., T. Tikka, et al. (1999). "A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13496-13500.

Yunoki, M., S. Nishio, et al. (2003). "Hypothermic preconditioning induces rapid tolerance to focal ischemic injury in the rat." Exp Neurol **181**(2): 291-300.

Zaman, K., H. Ryu, et al. (1999). "Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin." J Neurosci **19**(22): 9821-9830.

Zeise, M. L., T. Knopfel, et al. (1988). "(+/-)-beta-Parachlorophenylglutamate selectively enhances the depolarizing response to L-homocysteic acid in neocortical neurons of the rat: evidence for a specific uptake system." Brain Res **443**(1-2): 373-376.

Zemlan, F. P., O. J. Thienhaus, et al. (1989). "Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation." Brain Res **476**(1): 160-162.

Zetterberg, H. (2004). "Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications." Reprod Biol Endocrinol **2**: 7.

Zhang, C., T. Hua, et al. (2006). "Age-related changes of structures in cerebellar cortex of cat." J Biosci **31**(1): 55-60.

Zhang, D. and S. A. Lipton (1992). "L-homocysteic acid selectively activates N-methyl-D-aspartate receptors of rat retinal ganglion cells." Neurosci Lett **139**(2): 173-177.

Zhang, H., G. Zhang, et al. (2011). "Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation." PLoS Biol **9**(7): e1001112.

Zhang, S. M., M. A. Hernan, et al. (2002). "Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk." Neurology **59**(8): 1161-1169.

Zhao, Q., R. R. Behringer, et al. (1996). "Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene." Nat Genet **13**(3): 275-283.

Zhou, Z. D., U. Kumari, et al. (2010). "Notch as a molecular switch in neural stem cells." IUBMB Life **62**(8): 618-623.

Zhuo, J. M., W. D. Kruger, et al. (2010). "The Herp protein pathway is not involved in the pro-amyloidogenic effect of hyperhomocysteinemia." J Alzheimers Dis **20**(2): 569-576.

Zieminska, E., A. Stafiej, et al. (2003). "Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones." Neurochem Int **43**(4-5): 481-492.

Zornberg, G. L., S. L. Buka, et al. (2000). "Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study." Am J Psychiatry **157**(2): 196-202.

Zou, C. G. and R. Banerjee (2005). "Homocysteine and redox signaling." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 547-559.

Matériels et méthodes

MODELES ANIMAUX

1. Maintenance des animaux et Carence en donneurs de méthyle

Les animaux ont été traités selon les recommandations décrites dans le « Guide for care and use of laboratory animals » (NIH, MD, 1985). Les rats adultes (Wistar Han IGS, Charles River, Saint germain sur l'Arbresle, France) sont maintenus en conditions standard d'élevage, avec un cycle d'alternance jour/nuit de 12 h, et la mise à disposition d'eau et de nourriture à volonté. Un mois avant la mise en accouplement, les rats femelles ont été alimentées soit avec de la nourriture normal (Rats souris élevage, SAFE, Augy, France) contenant des vitamines B12 (0,04 mg/kg),des folates (0,9 mg/kg) et de la choline (2100 mg/kg), soit avec de la nourriture carencée en vitamines B12 (0 µg/kg), folates (0,01mg/kg) et choline (0,06mg/kg) (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Les rats males ont uniquement été alimenté avec de la nourriture normal avant l'accouplement. La carence en donneurs de méthyle se poursuit pendant toute la gestation (21 jours). Dans les 24 heures après la délivrance, la portée a été réduite à dix individus pour la standardisation de l'étude. Pour les animaux concernés, la carence a été maintenue jusqu'au moment du sevrage (21 jours postnatals) au travers de l'allaitement maternel ; au-delà, une alimentation standard a été donnée aux animaux.

2. Hypoxie néonatale modérée

Dans les 24 heures après la délivrance, la portée a été réduite à dix individus pour la standardisation de l'étude. La moitié des nouveau-nés a été placée pendant 5 minutes dans une chambre en plexiglas thermostaté à 36°C et saturée en azote. La seconde moitié des nouveau-nés, considérée comme témoin, a été maintenue en conditions de normoxie (21% d'oxygène et 79% d'azote) pendant le même temps. L'ensemble de la portée a ensuite été placé pendant 20 minutes en normoxie sur couverture chauffante à 36°C puis rendue à la mère. Du BrdU (Sigma-Aldrich) a été solubilisé dans une solution de NaCl à 0,9% contenant 0,007 N de NaOH à une concentration de 10mg/ml et administré en intrapéritonéal une fois par jour pendant 10 jours consécutifs entre 11 jours et 20 jours postnatales à raison de 50mg/kg.

3. Carencé en donneurs de méthyle et hypoxie néonatale modérée

Les ratons issus des rats femelles carencés en donneurs de méthyle ont subi dans les 24 heures après leur naissance une hypoxie néonatale de 5 minutes et ont été rendu à leur mère.

Au regard de ces traitements (régime et hypoxie), 4 groupes ont été définis : le groupe « témoin » (T) n'ayant pas subi d'hypoxie et dont la mère a reçu une nourriture standard ; le groupe « hypoxie » (H) correspondant aux rats exposés à une hypoxie et nourris par une mère recevant une nourriture standard ; le groupe « carencé » (C) qui n'ayant pas subi d'hypoxie et dont la mère a reçu une nourriture carencée ; le groupe « carencés avec hypoxie » (CH) associant la carence et l'hypoxie.

PRELEVEMENT ET GESTION DES ECHANTILLONS

1. Groupe témoin et carencé en donneurs de méthyle

Les portées ont été sacrifiées avec un excès d'isoflurane à l'âge de 21 ou 450 jours. Au préalable, un prélèvement sanguin intracardiaque a été réalisé pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine. Pour les animaux destinés à être sacrifié à 450 jours, de précédents prélèvements sanguins à la queue ont été réalisés en cinétique (205 et 330 jours) afin d'analyser les mêmes paramètres biochimiques. Le sang est recueilli dans des tubes contenant 50µl D'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et le plasma est récupéré en centrifugeant le sang à 4°C pendant 20 minutes à 3000g. Le cerveau a été rapidement collecté et sectionné dans son axe sagittal en deux hémisphères. Le demi-cerveau destiné au protocole d'immunofluorescence et de colorations histologiques ont été plongés dans une solution de méthylbutane froid (Sigma-Aldrich) à -30°C avant d'être stockés au congélateur à –80°C. Les fragments de l'autre demi-cerveau après dissections régionales (hippocampe, cortex, cervelet), destinés aux analyses biochimiques et de biologie moléculaire ont été congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

2. Groupe témoin et hypoxie

Les portées ont été sacrifiées avec un excès d'isoflurane à l'âge de 24 heures (1 heure posthypoxie ou 6 heures posthypoxie), 40 jours, 100 jours ou 720 jours. Le cerveau a été rapidement collecté et sectionné dans son axe sagittal en deux hémisphères. Le demi-cerveau destiné au protocole d'immunofluorescence et de colorations histologiques ont été plongés dans une solution de méthylbutane froid (Sigma-Aldrich) à -30°C avant d'être stockés au congélateur à –80°C. Les fragments de l'autre demi-cerveau après dissections régionales (hippocampe, cortex, cervelet), destinés aux analyses biochimiques et de biologie moléculaire ont été congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

3. Groupe témoin et carencé/hypoxie

Les portées ont été sacrifiées avec un excès d'isoflurane à l'âge de 80 ou 450 jours. Au préalable, un prélèvement sanguin intracardiaque a été réalisé pour l'analyse des concentrations plasmatiques en folates, vitamine B12 et homocystéine. Pour les animaux destinés à être sacrifié à 450 jours, de précédents prélèvements sanguins à la queue ont été réalisés en cinétique (205 et 330 jours) afin d'analyser les mêmes paramètres biochimiques. Le sang est recueilli dans des tubes contenant 50µl D'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique) et le plasma est récupéré en centrifugeant le sang à 4°C pendant 20 minutes à 3000g. Le cerveau a été rapidement collecté et sectionné dans son axe sagittal en deux hémisphères. Le demi-cerveau destiné au protocole d'immunofluorescence et de colorations histologiques ont été plongés dans une solution de méthylbutane froid (Sigma-Aldrich) à -30°C avant d'être stockés au congélateur à –80°C. Les fragments de l'autre demi-cerveau après dissections régionales (hippocampe, cortex, cervelet), destinés aux analyses biochimiques et de biologie moléculaire ont été congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

LIGNEE H19-7/IGF-IR-CONDITIONS DE CULTURE

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

1. Prolifération et différenciation de la lignée H19-7/IGF-IT

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

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

Tableau : Composition des milieux de culture

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

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

3. Etude de la carence en folates (vitamine B9)

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

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

(1) Poly-L-lysine : 15µg/ml dans de l'eau stérile (filtration 0,2µm)

(2) Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France

(3) PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} :Gibco/Invitrogen ;Cergy-Pontoise,France

(4) Tous les produits sont fournis par :Gibco/Invitrogen

(5) SVF, Sérum de veau fœtal non décomplémenté :Gibco/Invitrogen

(6) Complément N_2 (Gibco) mélange de progestérone, putrescine, sélénite de sodium, holo-transferrine humaine et insuline *« recombinant full chain »*

(7) DMEM classique (référence : 11960) : DMEM sans B9 (référence : D2429) SIGMA

DECONGELATION, REPIQUAGE ET CONGELATION DES LIGNEES

1. Décongélation

- Sortir le cryotube(1) de l'azote liquide et le réchauffer rapidement dans un bain-marie à 37°C
- Nettoyer l'extérieur du cryotube à l'alcool.
- Transvaser le contenu du cryotube dans un tube de 15 mL contenant 10 mL d milieu de prolifération
- Centrifuger 5 min à 700 g pour l'élimination du glycérol ou du DMSO(2)
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 5 mL de milieu de prolifération
- Ensemencer une boite de culture de 25 cm2
- Changer le milieu après 48h

2. Repiquage

Tous les produits doivent être à température ambiante

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire avec du PBS stérile(3)
- Ajouter de la trypsine-EDTA(4) 0,05% à raison de 40 µL par cm2 à trypsiner
- Incuber 5 à 10 min à 33° ou à 37°C, selon le type de lignée
- Préparer pendant ce temps un tube de 15 mL avec du milieu de culture correspondant à la lignée (2 fois le volume de trypsine)
- Décrocher les cellules à la pipette
- Resuspendre les cellules trypsinées dans le tube de 15 mL pour stopper la réaction
- Centrifuger à 700 g pendant 5 min
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 mL de milieu de culture correspondant au milieu dans lequel les cellules seront ensemencées.
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma(5)
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à N.104 cellules/mL
- Pour l'entretien des cellules, ensemencer à 1,5.104 cellule par cm2

3. Congélation

➢ Dans du DMSO (9% DMSO3, 36% SVF, 55% DMEM)

- Pour une ampoule contenant 2.106 cellules :
- Préparer le milieu de congélation dans de la glace : 70 µL de DMSO, 300 µL de SVF, 450µL de milieu de culture correspondant aux cellules, Après avoir trypsiné, et compté les cellules, centrifuger de nouveau et retirer le surnageant. Déposer délicatement les 800 µL de milieu de congélation en agitant légèrement le tube à 4°C
- Transférer les cellules ainsi suspendues dans un cryotube
- Placer les tubes dans la boite de congélation(6)

- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans un container à azote liquide
- Référencer les tubes congelés et décongelés dans les registres de cultures cellulaires

---

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

(2) DMSO (Dimethylsulfoxide) :Gibco/Invitrogen

(3) PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} :Gibco/Invitrogen

(4) Trypsine-EDTA trypsine 0,05% :Gibco Invitrogen

(5) Cellule de Thoma :VWR international

(6) Boite de congélation :Nalgène Cryo ;VWR international

TEST DE VIALABILITE CELLULAIRE ATPLITE

- Les cellules sont préalablement ensemencées avec 105 cellules par puits sur des plaques blanches(1) de 96 puits préalablement traitées avec de la poly-L-lysine 15 µg/mL
- Etablir une gamme étalon de densités cellulaires décroissantes : 100000, 50000, 25000, 12500, 6250,3125, 1562, 781, 390, 195, 97, 0 cellules par puits
- Introduire dans chaque puits 200 µL de réactif ATPLite(2)
- Agiter la plaque pendant 2 min, à l'abri de la lumière
- Maintenir 10 min à température ambiante et à l'obscurité
- Lire la plaque en mode luminescence sur le lecteur de plaques(3)

---

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

(2) Kit ATPLite,CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay : Promega,Charbonnières,France

(3) Lecteur de plaques Victor^3 Wallac Multilabel : Perkin Elmer

DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE DES VITAMINES

Principe : La vitamine B12 et les folates non marqués entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [57Co] et folates [125I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité lié est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube.

Les dosages ont été effectués sur des échantillons de plasma à l'aide du coffret commercial SimulTRAC-SNB (ICN Pharmaceuticals)

1. Préparation des réactifs

- Premier cas : si l'on doit utiliser un flacon de marqueur(1) dans les 30 jours→ verser le contenu d'un flacon de DTT(2) dans un flacon de marqueur (conserver à 4°C à l'abri de la lumière)
- Deuxième cas : si l'on doit utiliser un flacon de marqueur dans plus de 30 jours→ ajouter la même quantité de marqueur et de DTT (100µl de chaque)

2. Procédure de dosage

- Numéroter 16 tubes pour la courbe étalon. A partir du numéro 17, numéroter 2 tubes supplémentaires pour chaque échantillon
- Ajouter les étalons(3) (A à F) et les échantillons conformément aux indications données par le tableau suivant :

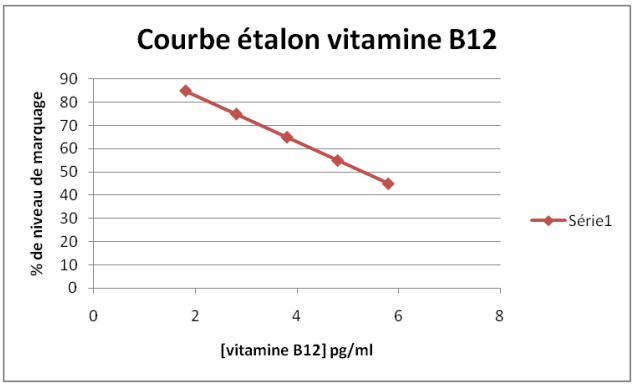
Tubes	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	échantillons
Etalons ou échantillons (µl)		200A	200A	200B	200C	200D	200E	200F	200

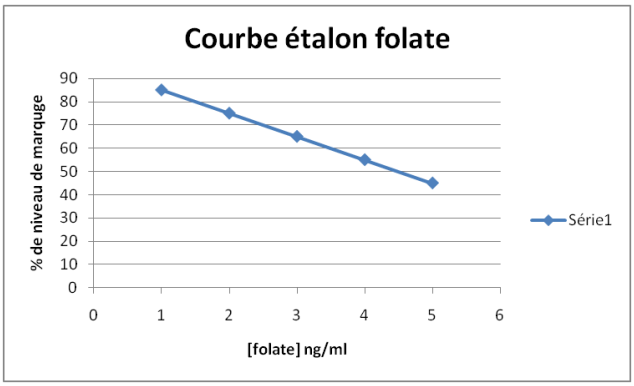
- Ajouter 200µl de solution active de marquage/DTT dans chaque tube y compris les tubes 1 et 2.Agiter les tubes au vortex
- Incuber à T°C ambiante (≈ 21°C) pendant 15 minutes
- Ajouter 100µl de réactif d'extraction(4) aux tubes 3 à 16 et aux tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex
- Incuber à T°C ambiante pendant 10 minutes
- Bien agiter le flacon de réactif neutre(5) et ajouter 1ml de ce réactif dans les tubes 3 et 4.
- Bien agiter le flacon de réactif de liaison(6) et ajouter 1ml de ce réactif dans les tubes de 5 à 16 et dans les tubes contenant les échantillons. Agiter les tubes au vortex.
- Incuber les tubes 3 à 16 et tous les tubes échantillons à T°C pendant 1 heure à partir du dernier ajout de réactif de liaison. Recouvrir les portoir de papier aluminium pour protéger de la lumière
- Centrifuger les tubes 3 à 16 et les échantillons à 1000g pendant 10 minutes (4°C)

- Décanter avec précaution et jeter le surnageant. Retirer la dernière goutte en posant les tubes sur du papier absorbant
- Compter la radioactivité dans les culots des tubes et dans les tubes 1 et 2, l'un après l'autre à l'aide d'un compteur gamma[7] (le nombre de coups total par minutes pour les tubes 1 et 2 doit se situer entre 10000 et 25000 pour le Cobalt 57 et entre 15000 et 35000 pour l'iode 125, en fonction de l'appareil et de l'âge du marqueur.

3. Calcul des résultats

- La courbe et les résultats pour la vitamine B_{12} sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage du Cobalt 57 et pour les folates, ils sont calculés à partir des résultats obtenus par comptage de l'Iode 125
- Faire la moyenne des mesures des tubes 3 et 4 (tubes « neutres ») et soustraire cette valeur de toutes les autres mesures pour obtenir des valeurs corrigées
- Faire la moyenne des mesures corrigées des tubes 1 et 2 pour obtenir le nombre de coups total corrigé pour chaque dosage
- Diviser la moyenne des mesures corrigées des tubes 5 et 6 par le nombre de coups total corrigé de façon à obtenir le coefficient de niveau de marquage B_0 (ce coefficient ne doit pas dépasser 36%)
- Diviser les mesures corrigées de chaque tube par la moyenne corrigée des tubes 5 et 6 pour obtenir le pourcentage de niveau de marquage de chaque tube.
- Tracer une courbe étalon : en abscisse la concentration des étalons de vitamine B_{12} en pg/ml et la concentration des étalons de folates en ng/ml et en ordonnée→ le pourcentage de niveau de marquage (B_{12} ou folates)/B_0





- La concentration de la vitamine B_{12} ou en folates dans la plasma est déterminée par extrapolation à partir de la courbe étalon donnant le pourcentage de niveau

de marquage par rapport à la valeur en pg/ml de vitamine B_{12} ou la valeur en ng/ml de folates.

---

(1) ***Marqueur Vitamine B_{12}/Folates SimulTRAC-SNB*** : contient moins de 1,5µCi (55,5kBq) de complexe Cobalt 57/vitamine B_{12} et moins de 3µCi (111kBq) de complexe Iode 125/folates (conserver à 4°C a l'abri de la lumière)

(2) ***Solution de Dithiothreitol SimulTRAC-SNB*** (conserver à 4 °C)

(3) Etalons A-F de vitamine B_{12}/folates SimulTRAC-SNB : la vitamine B_{12} et les folates sont dilués dans de la serumalbumine humaine, du chlorure de sodium et des agents stabilisateur et de conservation

Etalon	Concentration Vitamine B_{12}		Concentration folates	
	pg/ml	pmol/l	ng/ml	Nmol/l
A	0	0	0	0
B	100	74	1	2.3
C	200	148	2	4.5
D	400	296	4	9.1
E	1000	740	10	23
F	2000	1480	20	45

DOSAGE DE L'HOMOCYSTEINE, ACIDE METHYLMALONIQUE ET ACIDE SUCCINIQUE PAR LC-MS/MS (COLONNE UPLC HSST3)

Principe : La concentration plasmatique en homocystéine est mesurée par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance couplée à une détection par spectrométrie de masse en mode MRM positif.
L'homocystéine liée aux protéines est libérée par ajout d'un réducteur. Les protéines sont précipitées au méthanol. Les standards internes deutérés sont ajoutés et quelques µL sont injectés dans l'UPLC. La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma et à ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante.
Ce dosage a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU de Nancy-Brabois

1. Préparation des réactifs

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

	Homocystine (MM 268,4)	**Homocystine** d8 98%	**MMA** (118.09 ; >99%)	**MMA** d3 (98%)	**Acide succinique** (118.09 ; >99%)	**Acide succinique** d6 (MM 124.13 ; 98%)
Poudre (mg) *	13,27	13,8	11,809	12,356	11,806	12,666
HCl 0.1 N *(T° amb, hormones*)	50 ml	50 ml				
	Vortexer, soniquer					
NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)	1 ml	1 ml				
DTT	132,7 mg	132,7 mg				
HCl 0,1 N	Qsp 100 ml					
H_2O Milli Q			100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
	Vortexer, soniquer		Vortexer, soniquer			
Concentration sol. mère	1 mM (d'homocystéine)	1 mM (d'homocystéine d4)	1mM	1mM	1mM	1mM
	Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à – 20°C.					

* NB : Vérifier les quantités à peser pour chaque nouveau flacon en fonction de la masse et de la pureté du produit

2. Préparation de la gamme d'étalonnage

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

Concentration finale (µM)	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1
HCY	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781
Acide Succinique	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781
MMA	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078

- Préparer le mélange de standards internes : 150 µL de **HCYd4** à 1 mmol/L
  150 µL d'**ac succinique d6** à 1 mmol/L
  10 µL de **MMA d3** à 2 mmol/L
  4,5 ml de DTT2200 mmol/L

- Préparation des contrôles d'homocystéine : Plasma Control Level I (n°0072) + II (n°0073) lyophilizé

- Reconstituer chaque flacon avec 2 mL d'eau distillée HPLC grade, laisser reposer 10 à 15 minutes et agiter jusque dissolution totale. Faire des aliquots de 200 µL à conserver à -20°C

- Préparation de la solution d'extraction MeOH 0,1% (v/v) d'acide formique

3. Préparation des échantillons

- Préparation des extraits protéiques selon la procédure décrite précédemment *(fiche 29)*
- Ultra soniquer pour dilution complète, conserver à -80°C
- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 3500 tours par minutes)
- Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène :

	Double blanc	**Standards S0**	**Standards S1 à S8**	**Contrôles (pool, levels 1 & 2)**	**Patients**
Echantillon	50 µL pool	50 µL pool	50 µL	50 µL	50 µL
Solution de SI	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante (remettre les tubes patients au congélateur)					
MeOH + 0,1% Ac formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

NB : Travail possible à partir de 25 µL de plasma. Dans ce cas, diviser tous les volumes par 2

- Vortexer et incuber 30 min à + 4°C
- Vortexer et centrifuger à 16000 tours par minutes, 10 min

- Reprendre 100 µL de surnageant dans un godet de 1,5 ml (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMSMS) par 400 µL d'H2O 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 16000 rpm pendant 10 min
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après :

➢ Méthodes :

- Lancement de la méthode LCMSMS via Analyst :
- Méthode UPLC Acquity: &ISO_2.80 MIN_95-5_ FL.method
- Méthode d'acquisition : \&T3_HCY_MMA_AC SUCC_ISO_FL_H6.dam

2 périodes : MRM + pour HCY puis MRM – pour MMA & acide succinique et présence d'une valve pour permettre un switch vers la poubelle)

- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qm

ANALYSE DE MOLECULES ADENYLEES (SAM/SAH) PAR DERIVATION FLUORESCENTE A L'AIDE DU CHLOROACETALDEHYDE

Principe :

1. Préparation des solutions stocks (SAM ;SAH)

- Préparer de solutions stock de standard (SAM ; SAH) à 50mM dans de l'acide chlorhydrique 1N
- Ajouter 0.5v de NaOH 2N ,0.2v de citrate de sodium 1M (pH=5) et 0.3v d'eau ultra pure pour atteindre une concentration finale de 25mM
- Aliquoter et stocker à -20°C
- Préparer des solutions de travail stock de standard à 5µM final dans de l'eau ultra pure

2. Déprotéinisation des échantillons

- Mélanger 100µl d'échantillon (ou de standard) à 5µl d'$HClO_4$ à 60%, vortexer et incuber 5 minutes dans la glace
- Centrifuger à 20000g pendant 10 minutes (4°C)
- Eliminer le culot
- Ajouter un volume de KOH (0.5N) pour neutraliser et précipiter les sels de perchlorate et vortexer
- Ajouter 20 µl de KH_2PO_4 (1M) pour tamponner la solution, vortexer, centrifuger à 20000g pendant 10 minutes (4°C) et éliminer le culot

3. Dérivation des adényls

- Dans des microtubes noirs de 0.5ml, ajouter successivement :
  - 200µl d'échantillon ou de standard
  - 200µl d'acétate de sodium à 1M
  - 10µl de chloroacétaldéhyde à 50%
- Vortexer et incuber à 80°C pendant 20 minutes puis refroidir à 4°C

4. Procédure de séparation et d'analyse par HPLC

- Le matériel utilisé au laboratoire est une pompe à haute pression P1000XR, 0.8ml/minute (95 bar), une fourà colonne à 30°C, une colonne Resolve n°85711 C18 (150x3.9mm,5µ), un détecteur à fluorescence Shimadu RF10AXL (278nm :Ex/418nm :Em) et un intégrateur (logiciel Borwin 3.1)
- Déposer 50µl de quoi dans les inserts pour flacons d'échantillonneur automatisé AS100
- Injecter 10µl dans la colonne
- Solution pour la phase mobile

MESURE DE L'ACTIVITE METHIONINE SYNTHASE, MTR

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau milli-Q désoxygénée (sous flux d'azote gazeux durant 30 minutes) et le mélange réactionnel est maintenu sous un flux d'azote durant toute la préparation. Le méthyltétrahydrofolate (MeTHF) et l'hydroxocobalamine (OH-B12) étant photolabiles, ils sont conservés dans des tubes noirs.

- La réaction est réalisée dans un **volume final de 100 µL** contenant

Volume réac : 100µl	C réaction	C stock	Volume (µl)
Protéines	500µg	20µg/µl	25
$K_2H/KH_2(PO_4)$ pH 7,2	100 mM	1 M	10
DTT[(1)] (H_2O)	25 mM	580 mM	4,3
Na/Ascorbate[(1)] (H_2O)	25 mM	720 mM	3,5
SAM[(1)] (H_2O)	20 µM	2 mM	1
Methyl-B12[(2)] (H_2O)	50 µM	5 mM	1
Homocystéine[(1)] (HCl 1N)	5 mM	500 mM	1
MeTHF[(1)] (DTT 10mM)	0,225 mM	22,5 mM	1
[^{14}C] MeTHF[(3)] (DTT 10mM)	25 µM	2,5 mM	1
H_2O qsp 100µl			52,2

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme
- Arrêt de la réaction en chauffant les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace
- Centrifuger à 12.000 *g* pendant 10 min à 4°C
- Equilibrer les colonnes[(4)] par des lavages successifs (4x5 mL d'HCl 0,5 N), puis un autre lavage de 5x2 mL d'eau milli-Q
- Charger les colonnes avec l'échantillon (100 µL) puis rincer le gel avec 3x1 mL d'eau milli-Q
- La radioactivité est comptée dans des tubes en Polyéthylène[(5)] en mélangeant 1 volume d'éluat à 4 volumes de Pico-Fluor™[(6)]
- La [14CH3] méthionine produite a été mesurée sur un analyseur[(7)] TRI-CARB, 1900CA
- Eluer le [14C] méthyl-tétrahydrofolate en régénérant les colonnes avec 4x5mL d'acide chlorhydrique

(1) DTT(H2O), Na/Ascorbate(H2O), SAM(H2O), MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
(2) Methyl-B12(H2O) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

(3) [14C]MeTHF : GE Healthcare
(4) Colonne AG1x8, résine cationique échangeuse d'anions Cl- : Bio-Rad Laboratories, (Marnes-la-Coquette, France)
(5) Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20mL : Packard Biosciences, Etats-Unis
(6) PicoFluor : agent de scintillation (Packard Biosciences, (Etats-Unis). Colonnes AG 1-X8 BioRad Laboratories
(7) Analyseur TRI-CARB, 1990CA : Packard Biosciences, Etats-Unis

MESURE DE L'ACTIVITE DE LA METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR)

- La réaction est réalisée dans un volume final de 200 µL contenant

	Concentration réaction	Concentration stock	Volume (µl)	Volume réactionnel par échantillon : 200µl
Protéines			40	40
Tampon phosphate potassium pH 6,3	180 mM	1,8 M	20	Mix 160µl
Ménadione (K3)(1)	3,6 mM	90 mM	8	
EDTA(1)	1,4 mM	0,5 M	0,56	
Ascorbate(1)	7,2 mM	720 mM	2	
FAD(1)	178 µM	17,8 mM	2	
MeTHF(1)	50 µM	22,5 mM	0,44	
[^{14}C] MeTHF(2)	50 µM	2,5 mM	2	
H_2O qsp 160µl			125	

- Incuber le mélange réactionnel pendant 20, 40 60 et 80 min à 37°C dans un bloc chauffant thermostaté ; dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme.
- Chauffer les échantillons à 95°C, 5 min puis refroidir dans la glace.
- Un mélange contenant du formaldéhyde, du dimédone et de l'acétate de sodium est ajouté dans les proportions suivantes :

	Concentration réaction	Concentration stock	Volume réactionnel par échantillon (µl)
Formaldéhyde(1)	20,6 mM	1 M	10
Dimédone(1)	103,1 mM	0,25 M	200

Acétate de sodium(1)	463,9 mM	3 M	75

- Vortexer le mélange pendant 10s
- Chauffer à 95°C durant 15min (les tubes sont percés et maintenus sous une hotte aspirante durant la réaction)
- Les tubes sont refroidis dans la glace 10 min
- Ajouter dans chaque tube 1mL de toluène(3) (sous une hotte aspirante)
- Vortex pendant 30 s
- Centrifuger à 1000 g pendant 5 min à température ambiante
- La hase organique (supérieure) contient le [14C] provenant du produit final de la réaction : le méthylènetétrahydrofolate
- Ajouter chaque phase à 4 mL de Pico-FluorTM(4) dans des tubes en polyéthylène(5) avant de compter la radioactivité du [14C] contenu dans chaque phase sur un compteur béta(6)

(1) Ménadione bisulfite, EDTA, ascorbate, FAD, MeTHF : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
(2) [14C]MeTHF : GE Healthcare, (91898 Orsay Cedex, France)
(3) Toluène : VWR International, 94126 Fontenay sous-bois, France
(4) Picofluor : Pico-FluorTM peut être remplacé par de l'Ultima Gold non toxique pour l'environnement
(5) Fioles de comptage en polyéthylène de capacité 20 mL ; Packard Biosciences, (Etats-Unis)
(6) Analyseur TRI-CARB, 1990CA ; Packard Biosciences, (Etats-Unis)

MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CYSTATHIONINE-β-SYNTHASE (CBS)

- La réaction est réalisée dans un volume final de 100 µL contenant

	C réaction	C stock	Volume (µl)
Protéines	400 µg	20 g/L	20
Tris-HCl pH 8,6	50 mM	2 M	2,5
PLP(1) (HCl 1N)	1 mM	100 mM	1
Sérine(2) (H_2O)	5 mM	100 mM	5
[^{14}C] Sérine(3)	0,05µCi	50 µCi/ml	1
D,L Homocystéine(4) (HCl 1N)	15 mM	500 mM	3
H_2O qsp 100µl			67,5

- Incuber à 37°C pendant 20, 40,60 ou 80 min dans un bloc chauffant thermostaté (dans ces conditions, la réaction est linéaire, proportionnelle au temps d'incubation et à la concentration en enzyme
- Arrêt de la réaction en chauffant à 95°C pendant 5min
- Refroidir à 4°C dans de la glace
- Le pH est diminué en ajoutant 50 µL d'acide formique (98%) et 350 µL de tampons A(5)
- Centrifuger les tubes à 12.000 g pendant 10 min à 4°C
- Eliminer le culot
- Déposer le surnageant sur une colonne(6) PolyPrep Chromatography Columns préalablement équilibrée en ions Li+ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
- La [14C] Sérine en excès dans l'échantillon est éliminée en lavant le gel avec 1 mL, 3 mL et 3 x 5 mL de tampon A.
- La [14C] cystathionine produite lors de la réaction est éluée en lavant le gel avec 2 x 3 mL de tampon B(7)

- La radioactivité est mesurée dans des flacons en polyéthylène (20 mL) contenant 3 mL d'éluat et 15 mL de liquide de scintillation(8)

- Compter la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation TriCarb 1900CA(9)

---

(1) PLP : (Sigma-Aldrich, St Louis, France), pyridoxal 5'-phosphate, (vitamine B6) dissout à 100 mM dans HCl 1N. La solution est stockée à –20°C dans des tubes noirs car le PLP est photosensible
(2) D, L Sérine : (Sigma, S4375, (±)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) dissout à 100mM dans H2O
(3) L-[U-14C] Sérine : (Amersham Pharmacia Biotech, CFB.72, (S)-2-Amino-3-hydroxypropionic acid) à 50µCi/mL et 155mCi/mmol, soit 322µM.
(4) D, L Homocystéine (Hcy) : (Sigma, H4628, 2-Amino-4-mercaptobutyric acid) dissout à 500mM dans HCl 1N. La solution est désoxygénée en passant un flux d'azote gazeux durant 30min, et stockée par aliquotes à –20°C
(5) Tampons A: Ac. Maléique 25 mM, pH 1,8 et LiCl 200 mM
(6) Colonne PolyPrep Chromatography Columns, 731-1550 de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad Laboratories) contenant 1 mL de résine Dowex 50WX2-200 (Sigma) préalablement équilibrée en ions Li+ en lavant avec 4 x 5 mL de tampon A
(7) Tampon B : Acétate de sodium 50 mM, pH 5,2, LiCl 800 mM
(8) Liquide de scintillation : Hionic-Fluor, Packard Bioscience
(9) Compteur à scintillation TriCarb 1900CA ; Packard Bioscience, Etats-Unis

INCLUSION DES LAMES ET COUPE DES DEMI-CERVEAUX AU CRYOSTAT

1. Inclusion des lames en verre

Préparer une solution de gélatine porcine (Sigma) à 0,8%(1)

- Pour dissoudre la gélatine, mettre au bain marie et chauffer entre 40 et 45°C(ne pas dépasser 45°C.)
- Laisser refroidir jusqu'à environ 35°C
- Mettre les lames à bords rodés (Menzel-Glaser) sur un portoir et faire 2 allers-retours dans la gélatine diluée
- Laisser sécher les lames pendant 24 heures à T°C ambiante ou dans une étuve à 37°C

2. Coupe des cerveaux au cryostat

- Régler la température à l'intérieur du cryostat à environ -24°C et du porte-objet à -26°C
- Inclure le demi-cerveau dans une solution de carboxyméthylcellulose à 4%(2)
- Attendre que la carboxyméthylcellulose se soit solidifié avant de commencer à couper
- Faire des coupes dans l'axe sagittal du cerveau de 16µm d'épaisseur (20µm d'épaisseur pour les coupes utilisées pour le marquage de l'acétylcholinestérase)
- Stocker les coupes sur lame à -80°C

---

(1) ***Solution de gélatine porcine 0,8%*** : 8g de gélatine porcine dans 1L d'eau distillée

(2) ***Solution de carboxyméthylcellulose à 4%*** : 4g de carboxyméthylcellulose dans 100ml d'eau distillé

MARQUAGE DE L'ACETYLCHOLINESTERASE (PROTOCOLE DE PAXINOS ET WATSON (1998))

Principe : Le principe de la méthode histochimique est de mesurer le niveau de la thiocholine produite par hydrolyse de l'acétylthiocholine utilisée comme un analogue du substrat naturel. La révélation de la thiocholine est effectuée par le sodium sulfide.

1. Préparation des solutions

a) Préparation du tampon acétate

- Préparer un tampon acétate 0,1M de pH=5,0 :
  - Solution A : (pour 100ml) :0.57ml acide acétique glacial 1N (pour faire une solution à 0.1N) et 99,43ml d'eau distillée
  - Solution B : (pour 200ml) :1.64g sodium acétate pour une solution à 0.1N et qsp 200ml d'eau distillée
  - Solution finale = 59ml de solution A + 141ml de solution B (soit 200ml à 0.1M)
- Il faut utiliser le tampon acétate à 50mM, pH=5,0, ajouter 200ml d'eau distillée (dilution de la solution finale par 2)

b) Préparation de la solution stock

- Ajouter au tampon acétate (pour 400ml) :4mM de sulfate de cuivre (soit 0,2554 g) et16mM de glycine (soit 0,4804 g).
- Cette solution stock peut se conserver pendant des mois au réfrigérateur et des années au congélateur.

c) Préparation de la solution d'incubation :

- Ajouter à la solution stock (pour 100ml) :116 mg de S-acétylthiocholine iodide et 3 mg d'éthopropazine (bien mélanger la solution car l'éthopropazine se dissout difficilement)

2. Incubation, rinçage et révélation

- Incuber les lames à température ambiante, sans agitation pendant 24 heures
- Rincer rapidement les lames à l'eau distillée (3 fois) pour arrêter la réaction
- Révéler les coupes dans une solution de 1% de sodium sulfide $Na_2S_9H_2O$ à pH=7,5 (ajout d'acide acétique jusqu'à obtention du pH souhaité) pendant 10min
- Rincer rapidement les lames à l'eau distillée (3 fois) pour arrêter la réaction
- Fixer dans un bain de formaline (formaldehyde 4% tamponné) pendant 30 minutes
- Rincer à l'eau distillée (5 min et 2 x 2 min)
- Déshydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool (3 minutes chacun) de 50°, 70°,96°, puis de 100° (2 fois 5 minutes) et enfin de l'Histo-Clear™ (2 fois 5 minutes).
- Monter les lames à l'Eukitt
- Parallèlement, un contrôle négatif est immergé dans la même solution sans S-acétylthiocholine iodide, pendant le même temps d'incubation. Aucun marquage d'AChE n'est présent sur ces lames

- L’analyse du marquage se fait à l’aide d’un microscope à transmission classique (l'intensité du marquage est proportionnelle à la quantité de tissus analysée et au temps d'incubation, l'analyse de la densité de marquage se fait par mesure de l'absorbance)

MARQUAGE DE LA CYTOCHROME OXYDASE (TECHNIQUE HISTOCHIMIQUE DE WONG-RILEY(1979))

Principe : La révélation de l'activité de la cytochrome oxydase se fait par une réaction histochimique d'oxydoréduction. Lors de l'incubation, le cytochrome c, de couleur saumon, est réduit et devient rose; le produit de réaction est alors révélé au DAB (3,3'diaminobenzidine).Cette réaction est générée tant que le substrat peut-être réduit. Ainsi, l'intensité du marquage est directement proportionnelle à la quantité de la cytochrome oxydase présente dans les tissus.

1. **Technique sans fixation par perfusion intracardiaque**

- Sécher les lames à température ambiante
- Incuber à 37°C, à l'obscurité, sur agitateur pendant environ 1 heure (45 à 75 minutes - temps à déterminer suivant l'intensité de la coloration) dans la solution suivant :
  - pour 180 ml de tampon phosphate 0.1 M (pH 7.4) :40 mg de cytochrome c (SIGMA, type III, de cheval) ; 100 mg de DAB-4HCl ; 8 g de sucrose er 36 mg de catalase
- Rincer au tampon phosphate 0.1M sucrosé à 10% à 4°C pendant 5 min pour arrêter la réaction
- Fixer les coupes dans un bain de formaline (formaldehyde 4% tamponné) pendant 30 minutes
- Rincer 3 fois au tampon phosphate 0.1M (5 min et 2 x 2 min)
- Déshydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool (3 min chacun) de 50°, 70°, 96°, puis de 100° (2 fois 5 min) et enfin de l'Histo-Clear™ (2 fois 5 min).
- Montage à l'Eukitt™
- L'analyse du marquage se fait à l'aide d'un microscope à transmission classique (l'intensité du marquage est proportionnelle à la quantité de tissus analysée et au temps d'incubation, l'analyse de la densité de marquage se fait par mesure de l'absorbance)

2. **Préparation de 2 contrôles négatifs**

- Pour le premier contrôle, suivre le même protocole mais sans ajouter de DAB
- Pour le deuxième contrôle, suivre le même protocole en rajoutant dans la solution 6,5mg de potassium cyanide à 0,01M

MARQUAGE A LA THIOFLAVINE S

Principe : Mise en évidence par marquage fluorescent des dépôts d'amyloïde dans les coupes de cerveau congelé non perfusé

- Réhydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool (5 min chacun) de 95° et 70°
- Rincer dans de l'eau distillée pendant 5 minutes
- Colorer les coupes à l'hématoxyline de Harris pendant 5 minutes
- Rincer sous eau courante pendant 5 minutes puis rincer à l'eau distillée brièvement
- Incuber les coupes dans une solution de thioflavine S(1) entre 5 et 10 minutes
- Rincer dans de l'eau distillée 2-3 minutes
- Différencier dans un bain d'éthanol à 70° pendant 5 minutes
- Rincer à l'eau distillée brièvement
- Monter une lamelle avec un milieu de montage pour fluorescence
- Laisser sécher quelques heures et observer au microscope muni d'un filtre pour fluorescence ou FITC (les plaques amyloïdes apparaissent vertes sur fond noir)

(1) ***Solution de thioflavine S*** : 10mg/ml de thioflavine S dilué dans une solution d'éthanol absolue et d'eau distillée (1 :1) extemporanément

COLORATION HISTOLOGIQUE A LA THIONINE

Principe : la thionine, également connu sous le nom d'acétate de thionine ou violet de Lauth, est un colorant fortement métachromatique, utilisé pour la coloration des mucopolysaccharides acides. Il est également utilisé comme un colorant nucléaire commun et peut être utilisé pour la révélation de la substance de Nissl dans les cellules nerveuses du système nerveux central.

- Plonger les lames dans une solution d'Histo-Clear™ pendant 10 minutes
- Réhydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool (5 min chacun) de 100° et 70°
- Rincer dans de l'eau distillée pendant 3 minutes
- Colorer les coupes dans une solution de thionine(1) entre 7 et 10 minutes
- Faire deux rinçages de quelques secondes dans de l'eau distillée
- Déshydrater les coupes dans des bains successifs d'alcool (5 min chacun) de 70° et 100°
- Plonger les lames dans une solution d'Histo-Clear™ pendant au moins 3 minutes
- Montage d'une lamelle à l'Eukitt™
- Observer les coupes au microscope en lumière blanche

---

(1) ***Solution de thionine (1,5mol/L)*** : Pour 100ml→ 150mg de sel d'acétate de thionine (Sigma)

992mg d'acétate de potassium.$3H_2O$
575µl d'acide acétique glaciale
Qsp 100ml avec de l'eau distillée

MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE : TECHNIQUE MitoCapture™ (Perte du potentiel membranaire mitochondrial

Principe : La modification du potentiel membranaire mitochondrial est l'un des premiers événements intracellulaires qui survient après l'induction de l'apoptose. Le kit de détection de l'apoptose MitoCapture™ permet de distinguer les cellules saines et apoptotiques en détectant les changements du potentiel membranaire mitochondrial. Le kit utilise MitoCapture ™, un colorant fluorescent cationique qui agit différemment dans les cellules saines et les cellules apoptotiques. Dans les cellules saines, MitoCapture s'accumule dans la mitochondrie et les agrégats émettent une fluorescence rouge vif. Dans les cellules apoptotiques, MitoCapture ne peut pas s'agréger dans les mitochondries en raison du potentiel membranaire mitochondrial altéré, stagnant ainsi dans le cytoplasme dans sa forme monomère qui fluoresce en vert. Les signaux fluorescents peuvent être facilement détectés par microscopie à fluorescence ou analysées par cytométrie de flux.

- Ensemencer sur des lamelles en verre(1) traitées à la poly-L-lysine, 3.105 cellules
- Chauffer le tampon d'incubation présent dans le kit à 37°C
- Rincer les lamelles 2 fois avec le tampon
- Mélanger le tampon avec le réactif couplé au fluorochrome : 1/1000ème
- Bien homogénéiser la solution et maintenir à l'abri de la lumière
- Introduire 200 µL dans chaque puits
- Incuber 20 min à 37°C
- Rincer 2 fois avec le tampon d'incubation
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser immédiatement les lames au microscope à fluorescence(2)

MitoCapture Apoptosis detection Kit » : Calbiochem, VWR International, France

(1) Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldrich (St Louis, USA)
(2) Microscope : microscope à fluorescence : BX51WI ; Olympus, Rungis, France

DUOLINK

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

1. Protocole

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher)
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Fixer les coupes en ajoutant 200µl de paraformaldéhyde(1) à 4% pendant 15min à température ambiante
- Rincer les lames dans un bain de PBS(2) 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce (facultatif)
- Incuber les coupes dans un bain de Triton(3) à 0,1% afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200µl d'une solution de BSA(4) à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de chaque PLA probes(5) (diluer les anticorps au 1/5° dans une solution PBS 1X-BSA 10%) NB : les deux PLA probes utilisés doivent avoir une dénomination différente → un « espèce » minus et un « espèce » plus et incuber pendant 1h dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de TBST(6), 2 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock de ligation au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la ligase au 1/40°) et laisser incuber 30min dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de TBST, 2 fois pendant 2min à température ambiante sous agitation douce

- NB : ce réactif est sensible à la lumière donc à partir de cette étape procéder à l'obscurité. Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock d'amplification au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la polymérase au 1/80°) et laisser incuber 100min dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de tampon de lavage B[(7)], 2 fois pendant 10min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 200µl de DAPI[(8)] (dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incuber de 30s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain d'eau distillé, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C
- L'observation se fait au microscope à fluorescence à 555nm
- Pour le comptage, utiliser le logiciel

---

(1) Paraformaldéhyde (PAF) à 4%→ 20g de paraformaldéhyde dans 45O ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de PBS 10X

(2) PBS 10X → 12,1g de Na2HPO4, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

(3) Triton 0,1%→ Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X

(4) BSA 10%→ 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X

(5) PLA probes : Mouse, Rabbit, Goat MINUS ou PLUS, Kit Duolink Detection reagent Orange (Olink Bioscience, Suède)

(6) *Solution de TBST* (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H2O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%.TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M,pH 7,4,qsp H_2O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ;conserver à 4°C

(7) Tampon de lavage B : Dans 500 ml d'eau MilliQ dissoudre 5,84g de NaCl ; 4,24g de Tris base et 26g de Tris HCl. Ajuster le pH à 7,5 par ajout d'HCl et compléter à 1 litre avec de l'eau MilliQ. Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm et stocker à 4°C

(8) DAPI→ Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

TECHNIQUE D'IMMUNOCYTOCHIMIE PAR FLUORESCENCE INDIRECTE

Principe : L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire (dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire.)

- Ensemencer sur des lamelles(1) en verre, 3.105 cellules traitées avec une solution de poly-L-lysine de 15 µg/mL
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS(2)
- Fixer les cellules 10 min avec une solution de para-formaldéhyde(3) à 4%
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Perméabilisation membranaire : 2 fois 10 min avec une solution de Triton 0,1% (Triton X-100(4)/PBS)
- Rincer 3 fois 5 min avec du PBS
- Incuber 1h à température ambiante avec une solution de BSA(5) à 1%
- Incuber avec l'anticorps primaire, à 4°C, toute une nuit et sous agitation lente
- Rincer 3 fois avec une solution de Triton 0,05%
- Incuber 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire, à l'abri de la lumière et sous agitation lente
- Rincer 2 fois avec une solution de Triton 0,05%
- Incuber 20 secondes avec une solution de DAPI(6)
- Rincer 2 fois 5 min avec du PBS
- Rincer 1 fois avec de l'eau
- Monter les lamelles sur des lames à l'aide d'une goutte de solution de montage7
- Maintenir les lames à l'abri de la lumière
- Analyser les lames en microscopie à fluorescence

---

(1) Lamelles en verre diamètre 14 mm, stérilisées : CML, Nemours, France : Sigma Aldriche
(2) PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France sans CaCl2, ni MgCl2
(3) Para-formaldéhyde (4%) à dissoudre dans du PBS 1X : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
(4) Triton X-100 : BDH, VWR international, France
(5) BSA, Bovin Serum Albumin : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
(6) DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous-bois, France

TECHNIQUE D'IMMUNOHISTOCHIMIE PAR FLUORESCENCE INDIRECTE

Principe : L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire (dirigé contre l'isotype de l'anticorps primaire.)

2. Protocole

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher)
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Fixer les coupes en ajoutant 200µl de paraformaldéhyde(1) à 4% pendant 15min à température ambiante
- Rincer les lames dans un bain de PBS(2) 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce (facultatif)
- Incuber les coupes dans un bain de Triton(3) à 0,1% afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200µl d'une solution de BSA(4) à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 100µl d'anticorps secondaire (dilution 1/2000° dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si un seul anticorps primaire si deux 200µl et laisser incuber pendant 1h à l'obscurité dans une chambre humide à température ambiante
- Après cette étape mettre les lames dans du papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière
- Laver les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min sous agitation douce
- Déposer environ 200µl de DAPI(5) (dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incuber de 30s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C

---

(1) ***Paraformaldéhyde (PAF) à 4%***→ 20g de paraformaldéhyde dans 45O ml d'eau distillée+50 ml de PBS 10X

(2) ***PBS 10X*** → 12,1g de Na2HPO4 ; 7H20, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KCl
Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4
Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

(3) ***Triton 0,1%***→ Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X

(4) ***BSA 10%***→ 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X

(5) DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous-bois, France

LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN IMMUNOFLUORESCENCE

Nom	Fonction	Espèce reconnue	Fournisseur	Dilution
Actine	Proteine des microfilaments	Chèvre	Santa Cruz	1/200
Bromodeoxyuridine (BrdU)	prolifération	Souris	Oncogen/Calbiochem	1/200
Calbindine (CalD)	Transporteur calcium, marqueur cellule de Purkinje	Chèvre	Santa Cruz	1/200
Calretinine (CalR)	Transporteur calcium, marqueur cellule Purkinje et cellule granulaire	Chèvre	Santa Cruz	1/200
Caspase 3 clivée	Molécule intervenant dans l'apoptose	Lapin	Cell Signaling	1/200
Cystathionine β synthase (CBS)	Enzyme transulfuration	Souris	Abnova	1/300
Estrogen receptor alpha (ERα)	Récepteur nucléaire	Lapin	Santa Cruz	1/200
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Cellules gliales	Souris	Chemicon	1/500
Glutamic acid decarboxylase (GAD65/67)	Neurone GABA	Lapin	Chemicon	1/100
Growth Associated Protein (GAP 43)		Lapin	Chemicon	1/200
HDAC 4 (Histone déacétylase 4)	Histone déacétylase	Souris	Abcam	1/200
Homocystéine	Acide aminé soufré	Lapin	Millipore	1/200
Kinésine	MAPs	Souris	Millipore	1/200
Map2 (Microtubule-associated 2)	Stabilise les microtubules	Chèvre	Santa Cruz	1/200
Methionine synthase (MS)	Methionine synthase	Lapin	Abcam	1/200
Myelin basic protein (MBP)	Marqueur de la demyélinisation	Lapin	Chemicon	1/200
Neurofilament 68 (NF68)	neurones	Lapin	USBiological	1/200
Neurofilament D (NeuroD)	Neurones immatures	Chèvre	Santa Cruz	1/200

Neuronal Nuclei (NeuN)	Neurones matures	Souris	Chemicon	1/200
Ox-6 anti CMH classe II	Molécule du CMH de classe II (inflammation)	Souris	AbDserotec	1/100
Phospho sérine	Acide aminé	Souris	Cell signaling	1/200
Phospho Synapsine	Fixateur de vésicule	Lapin	Cell signaling	1/200
Phospho Tau	Protéine constitutif des centrioles			1/200
Phospho Tyrosine	Acide aminé	Souris	Cell signaling	1/200
Poly-Sialated Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM)	molécules d'adhésion neurales	Souris	AbCys	1/100
Postsynaptic density protein (PSD95)	Molécule réflétant l'activité postsynaptique d'une synapse	Lapin	Cell Signaling	1/200
Synapsine 1	Fixateur de vésicule (stroma)	Lapin	Calbiochem	1/200
Synapsine 2	Fixateur de vésicule (synapse)	Lapin	Abcam	1/200
Synaptotagmine	Molécule jouant un rôle dans l'exocytose des vésicules présynaptiques	Souris	Synaptic System	1/200
Tau	Protéine constitutif des centrioles	Souris	Millipore	1/200
TNF receptor-associated factor 4 (Traf 4)	Protéine impliquée dans le développement	Souris	IGBMC	1/200
Tyrosine Hydroxylase	Neurone dopamine	Lapin	Chemicon	1/100
Vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2)	Neurone glutamate	Souris	Chemicon	1/100
Vimentine	Cellule gliale (astrocyte)	Chèvre	Santa Cruz	1/200
Vinculine	Protéine membranaire et cytosquelettique	Souris	Abcam	1/200
α-tubuline	Protéine des microtubules	Lapin	Millipore	1/200

α-tubuline acétylée	Protéine acétylée des microtubules	Souris	Abcam	1/200
β-tubuline	Protéine des microtubules	Souris	Abcam	1/200
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGCα)	Co-activateur des PPAR	Lapin	Cell signaling	1/200

LISTE DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES

Anticorps secondaires	**Espèce hôte**	**Espèce reconnue**	**Fournisseur**	**Dilution**
Alexa Fluor 488 âne anti IgG de chèvre	âne	chèvre	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 488 âne anti IgG de lapin	âne	lapin	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 488 âne anti IgG de souris	âne	souris	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 488 chèvre anti IgM de souris	Chèvre	Souris	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 555 âne anti IgG de lapin	âne	lapin	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000
Alexa Fluor 555 âne anti IgG de souris	âne	souris	Molecular Probs (Invitrogen)	1/2000

MARQUAGE DES CELLULES APOPTOTIQUES (APOSTAIN™)

Principe : Ce test est basé sur la sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation thermique des cellules apoptotiques. Cette méthode permet la dénaturation de l'ADN par chauffage à 56°C en présence de formamide, et son marquage par l'anticorps monoclonal (Mab F7-26) spécifique de l'ADN simple brin

- Les cerveaux conservés dans du méthylbutane à -80°C ont été coupés au cryostat avec une épaisseur de 12µm. Les coupes sont déposées sur lames à bords rodés (Menzel-Glaser), non fixées, conservées à -80°C
- Fixer les coupes en plongeant les lames dans un bain de paraformaldéhyde(2) 5% pendant 10min à température ambiante (à faire sous la hotte)
- Rincer dans du PBS(3) 1X 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déshydrater les coupes en plongeant les lames dans une solution de méthanol(4) à 80% pendant 30min à température ambiante. (sous une hotte)
- Mettre les lames dans une solution de saponine(5) à 0,2mg/ml pour perméabiliser les membranes pendant 20 min à température ambiante.
- Laver une fois avec du PBS 1X rapidement (environ 30s) à température ambiante.
- Plonger les lames dans une solution de formamide(6) à 50% pendant 20 min au bain-marie à 56°C. (sous une hotte)
- Rincer avec du PBS 1X froid 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Sécher le pourtour des coupes avec du papier absorbant
- Entourer les coupes avec un stylo hydrophobe DakoPen™ et laisser sécher
- Déposer 100µl de solution de BSA à 10% (diluer dans du PBS 1X) contenant 0,2mg/ml de saponine afin de bloquer les sites non spécifiques sur les coupes pendant 1h à température ambiante et dans une chambre humide.
- Diluer au 1/10° l'anticorps primaire Apostain (anti-ADNsb/Apostain, AbCys SA) dans une solution de BSA à 10% contenant 0,2mg/ml de saponine
- Déposer 100µl d'anticorps primaire dilué sur chaque coupe et laisser incuber une nuit à 4°C (dans une chambre humide)
- Rincer les lames dans des bains de PBS 1X 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Sécher le pourtour des coupes avec du papier absorbant
- Diluer au 1/2000° l'anticorps secondaire (Alexa Fluor 555 de chèvre **anti IgM** de souris(7)) dans une solution de BSA à 10% diluée dans du PBS 1X.
- Déposer 100µl d'anticorps secondaire dilué sur chaque coupe et laisser incuber 1h à température ambiante et à l'obscurité. (dans une chambre humide)
- Laver avec du PBS 1X 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce

- Déposer sur les coupes 100µl de DAPI[8] (dilué au 1/200° dans de l'eau distillée soit une concentration finale de 5µg/ml) pendant 30s à température ambiante et à l'obscurité dans une chambre humide.
- Rincer les lames 3 fois pendant 5min dans de l'eau distillée sous agitation douce
- Monter les lamelles avec une solution Gel/Mount™ (sécher le pourtour des coupes et ajouter une goutte au milieu de la coupe) et laisser sécher à 4°C à l'obscurité.
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C

---

(9) AbCys SA

(10) ***Paraformaldéhyde (PAF) à 5%***→ 25g de paraformaldéhyde dans 45O ml d'eau distillée+50 ml de PBS 10X+quelques pastilles de soude jusqu'à dissolution complète du paraformaldéhyde

(11) ***PBS 10X*** → 12,1g de Na2HPO4, 2g de KH2PO4, 80g de NaCl, 2g de KCl
Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4

Pour du PBS 1X mélanger 1OOml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée

(12) ***Méthanol à 80%***→ Pour 1 litre : 800ml de méthanol et 200ml de PBS 1X

(13) ***Solution de saponine***→ Pour 1 litre : 200mg de saponine dans 1 litre de PBS 1X

(14) ***Solution de formamide***→ Pour 1 litre : 500ml formamide et 500ml d'eau distillée

(15) Alexa Fluor 555 de chèvre **anti IgM** de souris ;Invitrogen

(16) ***DAPI***→ Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

EXTRACTION DES PROTEINES A PARTIR DE TISSU CEREBRAL

NB : L'extraction des protéines se fait en condition dénaturante à partir des microdissections de cerveau.

1. **Extraction des protéines (travailler toujours sur de la glace)**

- Préparer du tampon de lyse RIPA[(1)] (Radioimmunoprecipitation Assay)
- Mettre le volume correspondant de tampon RIPA froid selon la microstructure

Microstructures	Cervelet	Cortex	Hippocampe	Zone subventriculaire	« Reste du cerveau »
Volume de tampon RIPA à ajouter (µl)	500	200	250	75	500

- Incuber 10 minutes dans la glace
- Homogénéiser par 10 à 20 allers-retours avec une seringue
- Faire 3 cycles congélation-décongélation (azote-bain marie à 37°C)
- Centrifuger 30 minutes à 4°C, 12000rpm
- Récupérer le surnageant et stocker à -80°C si le dosage n'est pas fait de suite.

Solutions stock

Tampon RIPA	NaCl	8 g/l	Dilué dans du PBS 1x
	Na_2HPO_4	1,44 g/l	
	KH_2PO_4	0,24 g/l	
	NP40	1 %	
	DOC	0,5 %	
	SDS	0,1 %	

PMSF 10 mg/ml d'éthanol

Na_3VO_4 à 100mM 18,39 mg/ml d'H_2O

(1) Tampon de lyse RIPA

Tampon RIPA

PMSF	10µl/ml RIPA	A ajouter dans le tampon RIPA juste avant de commercer l'extraction
Na_3VO_4	10µl/ml RIPA	
Cocktail antiprotéase	14µl/10ml RIPA	

EXTRACTION DE PROTEINES A PARTIR D'UNE CULTURE CELLULAIRE

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

- Entretien des cellules dans des boites de Pétri(1) (ø 100mm)
- Lorsque les cellules sont à « confluence » rincer 3 fois les boîtes avec 5 mL de PBS(2) froid
- Aspirer soigneusement le dernier rinçage pour bien assécher les flasques (possibilité de congeler les boites à -80°C jusqu'au jour de l'extraction)
- Introduire 500 µL de tampon RIPA(3) par boîte et maintenir sur de la glace pendant 10 min
- Gratter les cellules au policeman et transférer dans des microtubes.
- Effectuer 3 cycles de congélation et décongélation (Azote liquide-bain marie à 37°C)
- Centrifuger 30 min à 20 000 tours par min à 4°C
- Récupérer le surnageant et doser les protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

---

(1) Plastiques stériles à usage unique : Falcon, Dutscher, Brumath, France
(2) PBS sans Ca2+ ni Mg2+ : Gibco Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
(3) Tampon de lyse RIPA : NaCl 140 mM, sodium deoxycholate 0,5% (w/v), Nonidet P-40 1% (v/v), 0,1% (w/v), SDS, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, Meylan, France)

DOSAGE DES PROTEINES PAR KIT BCA[1]

Principe : Les concentrations protéiques ont été mesurées par la méthode BCA[2], ou BC Assay qui est un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique. Les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu(II) en Cu(I) en milieu alcalin. L'acide bicinchoninique est un réactif colorigène hautement spécifique pour le Cu(I), qui forme un complexe pourpre ayant une absorption optique entre 540 et 590nm). L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéines

1. **Préparation d'une gamme étalon de BSA (Bovin Serum Albumin)**

- Préparer une gamme étalon (2 ; 1,6 ; 1,2 ; 0,8 ; 0,4 ; 0,2 ; 0,1 et 0 mg/ml, en doubles) à partir d'une solution stock de BSA[3] de concentration 2mg/ml diluée dans la même solution que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA)

	Sol. BSA 2mg/ml	Tp lyse RIPA	[Protéines] µg/mL
A	50 µl BSA	0 µl	2000
B	40 µl BSA	10 µl	1800
C	30 µl BSA	20 µl	1200
D	20 µl BSA	30 µl	800
E	10 µl BSA	40 µl	400
F	5 µl BSA	45 µl	200
G	2,5 µl de BSA	47,5 µl	100
H	0	50µl	0

2. **Dosage en microplaque**

- Dans une plaque 96 puits à fond plat, mettre 25µl de chaque standard, du blanc (tampon de lyse RIPA) et de chaque échantillon dans les puits (2 prises d'essai).
- Ajouter 200 µL de réactif (kit BCA : 50 sol. A :1 sol. B) dans chaque puits.
- S'il faut diluer l'échantillon, utiliser le tampon de lyse RIPA pour la dilution
- Couvrir la plaque et l'incuber 30 min à 37°C.
- Lire l'absorbance à 570 nm sur le lecteur de microplaque Microplate Reader™ (Bio-rad) en tenant compte des facteurs de dilution

(1) BC Assay kit (Uptima-Interchim)
(2) D'après Paul Smith et al., Measurment of protein using bicinchoninic acid, Anal.Biochem.
(3) 2mg /ml d'une solution à 0,9% NaCl et 0,05% sodium azide

WESTERN BLOTTING

1. Electrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide en condition denaturante (sds-page)

a. Préparation des gels

- Passer les plaques de verre à l'alcool
- Monter l'appareil d'électrophorèse[(1)]: plaques de verre et spaceurs (en général 1,5mm)
- Préparer le gel de séparation à la concentration souhaitée[(2)]. Pour 2 gels prévoir 20ml de solution
- Couler les gels entre les deux plaques de verre
- Déposer environ 500µl d'isopropanol et laisser polymériser le gel environ 15 minutes (le temps de polymérisation est en fonction de la température ambiante)
- Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- Préparer le gel de concentration à 5%[(3)] **(**pour 2 gels prévoir 8ml) et couler le au-dessus du gel de séparation (couler en excès)
- Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles et laisser polymériser.
- Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration[(4)]
- Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central
- Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

b. Préparation des échantillons

Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30µg de protéines par puit.

- Dans un tube, ajouter 1 volume de tampon de dépot Laemmli 2X[(5)] à 1 volume d'échantillon
- Chauffer 5 mn les échantillons à 100°C
- Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire[(6)]

c. Migration sur un générateur à voltage constant

- Laisser migrer à 80V les échantillons dans le gel de concentration environ 15mn
- Une fois dans le gel de séparation, laisser migrer à 110V les échantillons environ 2 heures
- Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

2. Electro-transfert liquide

1. Préparation de la membrane

- Découper une membrane PVDF[(7)] ou en nitrocellulose[(8)] (le cas échéant) à la dimension du gel : 7x8,5 cm minimum

- Mettre la membrane (uniquement) PVDF dans du méthanol pendant 1 minute afin de la perméabiliser
- Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert[9] froid (5mn max) ainsi que les éponges et les filtres environ une demi-heure avant la fin de la migration.
- Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)

2. Transfert

- Préparer une cassette de transfert dans laquelle il faut superposer sur la face blanche dans l'ordre :
    - une éponge
    - un papier filtre[10]
    - la membrane PVDF ou nitrocellulose
    - le gel de polyacrylamide
    - un papier filtre (expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique)
    - une éponge
- Et fermer la casette
- Placer les cassettes dans le module de transfert[11], face noire vers face noire
- Mettre le glaçon et remplir la cuve avec du tampon froid
- Le transfert se fait à ampérage constant 350mA pendant 45mn.

3. Electro-transfert semi-sec

a. Préparation de la membrane

- Même procédure que pour le transfert liquide

b. Transfert

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
    - un papier filtre Whatman® 3MM3
    - la membrane de PVDF ou nitrocellulose
    - le gel de polyacrylamide
    - un papier filtre Whatman® 3MM
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau
- Eponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil[12] sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10V pendant 45 min

4. **Vérification du transfert (non obligatoire)**

- Colorer la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S[13] pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée.
  NB : A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure. Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

5. **Blocage**

- Mettre les membranes dans une solution de TBST[14] /lait écrémé 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante afin de bloquer les sites aspécifiques.

Nota : suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps)

6. **Anticorps primaire**[15]

- Découper une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
- Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5% (4 à 5ml au total)
- Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

7. **Lavage**

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4X10mn sous agitation rapide à température ambiante

8. **Anticorps secondaire**[16]

- Procéder de la même façon qu'avec le 1er anticorps
- Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

9. **Lavage**

Idem lavage ci-dessus

10. **Révélation ECL**

- Préparer la solution ECL™[17] (pour une membrane prévoir 1ml au total)
- Sur un film Saran™ déposer l'ECL™
- Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECL™, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles
- Incuber 1mn

- Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une cassette entre deux films Saran™, protéines vers le haut
- Préparer les bacs de révélateur[18] et fixateur[19] pour la révélation des films photographiques. Pour un résultat optimum, le révélateur, fixateur et film doivent être à température ambiante.
- Poser un morceau de film autoradiographique[20] sur la membrane, exposer dans un premier temps 1mn et révéler le film
- Réajuster le temps d'exposition si nécessaire.

---

(1) Mini-Protean II (Biorad)

(2) ***Solution pour préparation des gels de séparation (pour une solution d'acrylamide a 30%)***

		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	H_2O MQ	2.7	5.3	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1.5M pH 8.8[21]	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%[22]	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%[23]	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	H_2O MQ	2.3	4.6	7	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	Acrylamide Mix 29:1	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	H_2O MQ	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20

	Acrylamide Mix 29:1	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	H_2O MQ	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	H_2O MQ	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
	Acrylamide Mix 29:1	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

(3) ***Solution pour gel de concentration (acrylamide à 30%)***

		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Stacking	H_2O MQ	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
	Acrylamide Mix 29:1	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7

	Tris 0.5M pH 6.8[(24)]	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
	SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	APS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

(4) ***Tampon de migration 10x concentré (pour 1 litre)*** : Tris 25 mM contenant glycine 1,92 M et SDS 1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C).**A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter à 1litre** (Utiliser à température ambiante).

(5) Sigma-Aldrich

(6) Low Molecular Weight ; LMW - Amersham Pharmacia

(7) Membrane de polyvinylidene difluoride, porosité 0,45µm (Biorad)

(8) Biorad

(9) ***Tampon de transfert 10X (pour 1 litre)*** : Tris 480 mM, glycine 390 mM et SDS 0,375%(p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C).).**A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X+200ml d'éthanol 100% et compléter à 1litre** (Utiliser froid)

(10) Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma-Aldrich)

(11) Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (BioRad)

(12) Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Biorad)

(13) Solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2% (p/v), acide acétique 0.1% (v /v), filtrée 0.2µm, 4°C)

(14) ***Solution de TBST*** (Tris-Buffered Saline Tween-20) : **diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H2O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0,1%**.TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M,pH 7,4,qsp H_2O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ;conserver à 4°C)

(15) Voir fiche « liste des anticorps primaires utilisés en western blot »

(16) Voir fiche « liste des anticorps secondaires utilisés en western blot »

(17) Amersham Pharmacia Biotech

(18) Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)

(19) Fixateur radio (AL4 – Kodak)

(20) BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film)

(21) ***Tris-HCl 1,5M pH 8,8*** : 18,165 g de Tris/100ml H2O MQ (ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C)

(22) ***SDS 10%*** (sodium dodécylsulfate) : 10 g de SDS/100ml H2O MQ, sous agitation douce (conserver à température ambiante)

(23) ***APS 10% (***ammonium persulfate) : 1g/10ml H2O MQ, aliquoter par 400µl(conserver à -20°C)

(24) ***Tris-HCl 0,5M pH 6,8*** : 6,055 g de Tris/100ml H2O MQ (ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C)

LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT

Nom	Espèce reconnue	Fournisseur	Dilution anticorps primaire
Actine	Chèvre	Santa Cruz	1/1000
AKT	Lapin	Cell Signaling	1/1000
Caspase 3 clivée	Lapin	Cell signaling	1/2000
Caspase 9 clivée	Lapin	Cell signaling	1/1000
Cdk 2	Chèvre	Santa Cruz	1/3000
Cycline E	Lapin	Cell signaling	1/1000
Cystathionine β synthase (CBS)	Souris	Abnova	1/3000
Death associated protein kinase (DAPK)	Souris	Sigma	1/1000
Dynéine	Souris	Millipore	1/1000
Early Growth Response Protein 1 (EGR1)	Lapin	Cell Signaling	1/500
Estrogen receptor alpha (ERα)	Souris	Santa Cruz	1/200
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Souris	Chemicon	1/1000
Homocystéine	Lapin	Millipore	1/750
Kinésine	Souris	Millipore	1/1000
Map 2	Lapin	Millipore	1/1000
Mash 1	Lapin	Abcam	1/500
Methionine synthase	Chèvre	Abcam	1/500
Méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR)	Souris	Interchim	1/3000
p38 Mitogen-activated protein kinases (p38 MAPK)	Lapin	Cell Signaling	1/1000
p44/42 MAP kinase (ERK1/2)	Lapin	Cell Signaling	1/5000
Phospho Akt Kinase Transgenic (P-AKT)	Lapin	Cell Signaling	1/1000
Phospho p38 Mitogen-activated protein kinases (P-p38 MAPK)	Souris	Cell Signaling	1/1000
Phospho-Death associated protein kinase pSer308 (P-DAPK)	Souris	Sigma	1/500
Phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) (pERK1/2)	Lapin	Cell Signaling	1/500
Phospho-synapsine	Lapin	Cell Signaling	1/500
Postsynaptic density protein (PSD95)	Lapin	Cell Signaling	1/500
Protein arginine N-methyltransferase (PRMT1)	Lapin	Cell Signaling	1/700
Protein phosphatase 2 (PP2A)	Souris	Cell signaling	1/1000
Src	Lapin	Cell signaling	1/1000
Synapsine 1	Lapin	Calbiochem	1/2000
Synapsine 2	Lapin	Abcam	1/2000
Synaptotagmine	Souris	Synaptic System	1/500
Ubiquitylation	Souris	Millipore	1/1000
α-tubuline	Lapin	Millipore	1/1000

α-tubuline acétylée	Lapin	Abcam	1/1000
β-tubuline	Souris	Abcam	1/1000
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGCα)	Lapin	Cell signaling	1/1000

LISTE DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT

Anticorps secondaires	**Espèce hôte**	**Espèce reconnue**	**Fournisseur**
Anticorps HRP âne anti IgG de souris	âne	souris	Santa Cruz
Anticorps HRP âne anti IgG de lapin	âne	lapin	Santa Cruz
Anticorps HRP âne anti IgG de chèvre	âne	chèbre	Santa Cruz

DESHYBRIDATION DE MEMBRANE WESTERN BLOTTING (STRIPPING)

Principe: Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaire et secondaire peuvent être ré-incubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées

- Chauffer le tampon à 50°C
- Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon de déshybridation(1) chaud
- Immerger les membranes pendant 30 mn à 50°C en agitant de temps en temps
- Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée
- Rincer ensuite avec du TBST(2) 2x10 mn sous agitation
- Reprendre le protocole de western à partir du tampon bloquant

(1) ***Tampon de déshybridation*** : Pour 1 litre

100 mM 2-mercaptoethanol	7 ml
2 % SDS	20g
62,5mM Tris HCL pH 6,7	7,57g

(2) ***TBST 10x :*** Pour 1 litre

Tris 200 mM	24,2g
NaCl 1,5 M	87,5g

pH 7,4 à ajuster avec HCl

qsp H_2O MilliQ

Conserver à 4°C

CO-IMMUNOPRECIPITATION (kit Pierce Co-immunoprecipitation)

Principe :

NB : 10^6 cellules nécessaires min

1. Immobilisation de l'anticorps

NB : le protocole est fait pour coupler de 10 à 75µg d'anticorps affinity-purified dans une solution d'amines libre et de protéines couplées. Echelonner ce protocole à vos besoins (cf Tableau 1)

Table 1. Amounts of antibody, coupling resin, wash buffer and elution buffer to use.

Antibody Amount (µg)	Coupling Resin Volume (µl) (volume of 50% slurry)	Wash Volume (µl)	Elution Buffer Volume (µl)
250-1,000	100 (200)	400	100-150
75-250	50 (100)	300	75-100
10-75	25 (50)	200	50-75
≤ 10	10 (20)	200	50

- Equilibrer l'AminoLink Coupling Resin et les réactifs à température ambiante
- Préparer 2mL de Coupling buffer 1X pour chaque réaction de Co-IP
  100µL Coupling Buffer 20X et 1900µL eau ultra pure

- Agiter doucement la bouteille d'AminoLink Plus Coupling Resin pour obtenir une suspension homogène. Utiliser un cône coupé et ajouter 50µL de « resine slurry » dans la colonne. Placer la colonne dans un microtube à centrifuger et centrifuger à 1000g pendant 1min. Jeter le surnageant.
- Lavage : -200µL de Coupling buffer 1X
  -.centrifuger à 1000 g pendant 1min
  - jeter le surnageant
  } X2

- Taper doucement le fond de la colonne sur du papier absorbant pour éliminer l'exces de liquide. Inserer le bouchon inferieur.

- Préparer 10-75µg d'anticorps. Ajuster le volume a 200µL avec de l'eau ultra pure et du coupling buffer 20x dilué au final 1x. (10µL de coupling buffer 20x + V Ac + H20 UP qsp 200µL). Deposer la solution directement sur la colonne.

- **SOUS LA HOTTE** ajouter 3µL de sodium **cyanoborahydre** / 200µL de volume de réaction.
- Fermer le tube avec le bouchon à vis. Incuber avec agitation à température ambiante pendant 90 à 120 min! veillez à ce que la résine reste bien en suspension pendant l'incubation !!!
- Enlever et conserver le bouchon inferieur. Desserrer le bouchon à vis. Placer la colonne dans un tube collecteur et centrifuger. Conserver le surnageant pour vérifier le couplage de l'Ac.
- Ajouter 200µL de Tp de couplage 1x
  Centrifuger
  } X 2

  Jeter le surnageant

- Ajouter 200µL de quenching buffer sur la colonne.
  Centrifuger et jeter le surnageant

- Taper doucement le fond de la colonne sur du papier absorbant.
  Mettre le bouchon inferieur et ajouter 200µL de quenching buffer sur la résine.

- **SOUS LA HOTTE** ajouter 3µL de sodium cyanoborahydre. Fermer avec le bouchon à vis et laisser incuber 15 min sous agitation douce ou en remuant de temps en temps**.**
- Enlever le bouchon inferieur, et desserrer le bouchon à vis. Placer la colonne sur un tube collecteur et centrifuger
  Jeter le surnageant

- Enlever le bouchon à vis. Laver la résine :
  Ajouter 200µL de coupling buffer
  Centrifuger après chaque lavage
  } X 2

- Laver la résine avec 150µL de solution de lavage
  Centrifuger après chaque lavage.
  } X 6

- Soit faire la lyse des cellules pour l'immunoprécipitation
  Soit faire les étapes suivantes pour la conservation des colonnes

- Laver avec 200µL de coupling buffer 1X
  Centrifuger après chaque lavage
  } X 2

- Taper doucement le bas de la colonne sur du papier absorbant et placer le bouchon inferieur.
  Ajouter 200µL de coupling buffer 1x. Fermer le bouchon à vis.

  Stocker à 4°C

  * Pour du stockage à long terme ajouter du sodium azide de concentration final 0,02%

2. Lyse des cellules

a. Lyse de cellules adhérentes.

- Retirer le milieu de culture
- Laver les cellules avec du dublecco's PBS modifié 1x
- Ajouter le tampon de lyse et lavage (cf tableau 2) sur les cellules.
  Incuber 5 min sur glace en mixant de temps en temps.

Table 2. Suggested volume of IP Lysis/Wash Buffer to use for different standard culture plates.

Plate Size/Surface Area	Volume of IP Lysis/Wash Buffer
100 × 100 mm	500-1,000 µl
100 × 60 mm	250-500 µl
6-well plate	200-400 µl per well
24-well plate	100-200 µl per well

- Transférer le lysat dans un microtube.
  Centrifuger 10min a 13 000g

- Transférer le surnageant dans un nouveau tube pour déterminer la concentration en protéine faire des analyses complémentaires.

b. Lyses de cellules en suspension

- Centrifuger la suspension de cellules 5 min à 1 000g pour culoter les cellules
  Jeter le surnageant

- Laver une fois les cellules en re-suspendant le culot cellulaire dans du PBS
  Centrifuger 5 min à 1000g pour culoter les cellules

- Ajouter du tampon Ip lysis/wash froid sur le culot cellulaire. Utiliser 500µL de tampon pour 50mg de culot cellulaire mouillé (à savoir 10:1 v/w).
  Si vous utiliser une grosse quantité de culot cellulaire, ajouter déjà 10% du volume final de tampon re-suspendre le culot par refoulement avec la pipette puis ajouter le reste du volume aux cellules en suspension.

- Incuber 5 min sur la glace en remuant périodiquement.
  Centrifuger 10 min à 13 000g

- Transférer le surnageant dans un nouveau tube pour déterminer la concentration en protéine et faire les prochaines analyses.

3. Co Immunoprécipitation

TOUTE LA MANIPULATION SE FAIT A 4°C (sauf indication contraire)

NOTE : * Les temps d'incubations dépendent des protéines de l'anticorps utilisé et de l'affinité de l'anticorps

* Les lysats peuvent êtres pré nettoyés avec une résine de contrôle pour diminuer les liaisons non spécifiques.

* Le protocole utilise du tampon IP lyse/wash pour coupler et nettoyer l'immuno-complexe. Le Dulbecco PBS 20x modifié qui est fourni dans le kit comme un tampon binding/wash alternatif. Utiliser se tampon pour des complexe qui pourraient être altérés par des détergents.

* Pour chaque Co-IP préparer 2mL de Dulbelcco PBS modifié 1x dilué dans de l'eau ultra pure.

- Mélanger les protéines cibles et « proies » (si elles sont séparées) et préparer un contrôle.
- Diluer les protéines et le contrôle dans du tampon Ip lysis/wash ou un autre tampon qui convienne. Le volume final recommandé est de 100-500µL par colonne.
- Laver la résine en ajoutant 200µL de tampon IP lysis /wash directement sur la colonne contenant l'anticorps couplé à la résine.
  Centrifuger

  Jeter le surnageant.

- Taper doucement le bas de la colonne sur du papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. Insérer le bouchon inférieur.
- Ajouter l'échantillon avec les protéines et les contrôles sur les résines correspondantes. Mettre le bouchon (classique) et incuber sous agitation douce 1-2h ou la nuit à 4°C

Note : il est nécessaire d'optimiser le temps de couplage pour chaque application. Pour un grand volume

- Enlever le bouchon inférieur, desserrer le bouchon à vis et placer la colonne sur un tube collecteur. Centrifuger la colonne. Garder le surnageant pour des analyses postérieures.
- Enlever le bouchon à vis, placer la colonne dans un nouveau tube, ajouter 200µL d4IP Lysis/ Wash buffer et centrifuger. } X3

Note : Evaluer le nombre de lavage (A280, SDS PAGE, kit BCA) pour chaque Co-IP. Il ne doit plus y avoir de protéine dans le dernier lavage. Faire autant de lavage que nécessaire.

Lavage optionnel : Pour améliorer l'élution, effectuer un lavage supplémentaire avec 100µL de conditioning buffer 1X. Ce tampon contient peu de sels et du tampon minimum ; donc tester le « flow-through » pour confirmer que le complexe protéine cible et proie est intacte.

4. Elution de la Co-IP

Note : Si la protéine et/ou l'anticorps est sensible à un pH bas, utiliser un système pour neutralise le pH.

Pour des dosages enzymatiques ou fonctionnels par la suite, ajouter 5µL de Tris1M pH 9,5, dans le tube de collecteur, pour neutraliser le pH du tampon d'élution pendant la centrifugation

- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur. Ajouter 10µL de tampon d'élution et centrifuger.
- Laisser la colonne dans le tube et ajouter 50µL de tampon d'élution. Incuber 5 min à température ambiante. La colonne ne doit pas être fermée ou agitée.

Note : Pour concentre plus l'éluât, utiliser moins de tampon d'élution, cependant le rendement global peut être réduit.

- Centrifuger le tube et collecter l'éluât. Doser les protéines. Refaire des élution (étapes D1-D3) si nécessaire. Doser chaque éluât séparément pour être sûr que la protéine est complètement éluée.
- Pour préserver l'activité de l'anticorps couplé à la résine, procéder à l'étape E : régénération et stockage de la résine.

5. Re-géneration et stockage de la résine

- Ajouter 100µL de coupling buffer 1X sur la colonne.
  Centrifuger
  Jeter le surnageant
  } X2

- Replacer le bouchon inférieur sur la colonne. Ajouter 200µL de coupling buffer 1X sur la colonne. Replacer le bouchon à vis. Emballer le bas de la colonne avec du film cellophane pour éviter que la colonne sèche.
  Pour un stockage supérieur à 2 semaines ajouter de sodium azide a une concentration finale de 0,02%.

6. Préparation de l'échantillon pour l'analyse sur gel SDS-PAGE

- Equilibrer le « lane marker sample buffer 5X » à température ambiante. Agiter doucement le sample buffer par 5-10 retournements. Pour un gel en condition

- réductrice, ajouter du DTT 1M (diothiothréitol) au sample buffer 5X pour obtenir une concentration finale de 100mM.
- Ajouter du sample buffer 5X a l'echantillon pour obtenir une concentration final 1X (par exemple 5µL de sample buffer pour 20µL d'échantillon)
- Chauffer l'échantillon à 95-100°C pendant environ 5min. Laisser refroidir l'échantillon à température ambiante avant de déposer dans le gel.

EXTRACTION DES ARN TOTAUX (RNeasy® Lipid Tissue Mini kit,Qiagen)

NB : Ce kit est conçu et optimisé pour extraire les ARN totaux de 100mg de tissu riche en lipide comme le cerveau ou le tissu adipeux.

- Broyer les tissus dans un mortier en présence d'azote liquide
- Placer les tissus broyés dans un tube de 2ml et ajouter 1 ml de Qiazol(1) (sous la hotte)
- Homogénéiser à la seringue en faisant 10 allers-retours et laisser à T°C ambiante pendant 5 minutes
- Ajouter 200µl de chloroforme, secouer vigoureusement et laisser à T°C ambiante pendant 2-3 minutes
- Centrifuger les tubes à 12000g pendant 15 minutes à 4°C
- Transférer le surnageant dans un tube propre (on retrouve 3 phases dans le tube et la première correspond aux ARN)
- Ajouter 600µl d'éthanol à 70% (mélanger par aspiration-refoulement avec une pipette)
- Transférer 700µl de la solution sur une colonne munie d'un filtre(2) et adaptée sur un tube
- Centrifuger les tubes à 8000g pendant 15 secondes à T°C ambiante (±21°C) puis vider le contenu du fond du tube.
- Transférer le reste de la solution contenant l'éthanol (capacité maximal de la colonne : 700µl)
- Centrifuger les tubes à 8000g pendant 15 secondes à T°C ambiante (±21°C) puis vider le filtrat.
- Ajouter 350µL de tampon RW1 (fourni avec le kit) dans la colonne et centrifuger à 8000g pendant 15 secondes à T°C ambiante puis vider le filtrat.
- Ajouter 80µL de DNAse(3) dans la colonne et incuber 15 minutes à T°C ambiante
- Ajouter 350µl de tampon RW1 et centrifuger à 8000g pendant 15 secondes à T°C ambiante puis vider le filtrat.
- Ajouter 500µl de tampon RPE (Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE) et centrifuger à 8000g pendant 15 secondes à T°C ambiante puis vider le filtrat
- Ajouter une nouvelle fois 500µl de tampon RPE et centrifuger à 8000g pendant 2 minutes à T°C ambiante puis éliminer le filtrat
- Centrifuger les tubes à 12000g pendant 1 minute à T°C ambiante
- Transférer la colonne sur un tube de 1,5 ml (hors kit), ajouter 40µl de tampon d'élution(4) et centrifuger à 8000g pendant 1 minute à T°C ambiante
- Retirer la colonne du tube, l'ARN est au fond du tube
- Quantifier au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm et analyser les ARN sur gel d'agarose
- Stocker l'ARN à -80°C

---

(1) Qiazol lepsis reagent™ (Qiagen, Courtaboeuf,France)
(2) RNeasy Mini Spin Colunm™ (Qiagen)

(3) DNase set (Qiagen)
(4) RNAse free water (Qiagen)

DOSAGE DES ARN PAR SPECTROPHOTOMETRE

- Diluer les échantillons d'ARN au 1/30° soit 2µl d'ARN dans 58µl d'eau Milli-Q
- Les mesures des densités optiques (DO) se font sur un spectrophotomètre UVIKON 923 (Kontron instruments)
- Prendre les deux cuves en quartz propre dans laquelle on dépose 60µl (volume minimum pour lire une DO) d'eau Milli-Q afin de faire le blanc
- Déposer les échantillons d'ARN (soit 60µl) dans une autre cuve en quartz et prendre les mesures à 260nm (acide nucléique) et 280nm (protéine).Pour avoir une bonne estimation de la concentration, la DO doit être comprise entre 0,1 et 1 unité de DO (si on se situe en dehors de cet intervalle, il faut diluer ou concentrer les échantillons)
- Le rapport de DO 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2 pour considérer l'échantillon de qualité pur (Un ratio inférieur signifie une contamination par des protéines. Un ratio supérieur indique une dégradation des ARN)
- Pour calculer la concentration d'ARN : 1 mesure de DO=40µg/ml d'ARN et ne pas oublier de multiplier le résultat trouvé par la dilution choisie
- Faire des aliquots de 1 µg d'ARN pour faire les RT-PCR

TRANSCRIPTION INVERSE DES ARN (RT-PCR)

Principe : La RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) est une technique qui associe une transcription inverse (RT) suivie d'une PCR. Elle permet de synthétiser le brin complémentaire d'un ARN avec des désoxyribonucléotides en utilisant une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse).

NB : Utilisation du kit QuantiTect Reverve Transcription de Qiagen

1. Préparation des échantillons

- A partir des dosages fait précédemment, préparer un volume d'ARN équivalent à 1µg par échantillons et compléter avec de l'eau (RNase free water) jusqu'à 12µl
- Ajouter dans chaque tube 2µl de tampon gDNA Wipeout®
- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement à la centrifugeuse de paillasse
- Incuber 9 minutes à 42°C au thermocycleur
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

2. Préparation des réactifs de la RT-PCR

- Dans un microtube stérile, mélanger dans l'ordre :

	Pour 1 tube (échantillons)	Témoin négatif
Quantiscript RT Buffer	4µl	4µl
RT Primer Mix	1µl	1µl
Quantiscript Reverse Transcriptase (enzyme)	1µl	0µl
ARN+gDNA Wipeout	14µl	14µl

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger brièvement
- Placer dans le thermocycleur préchauffé
- Sélectionner le programme RT suivant : 15 minutes à 42°C, 3 minutes à 95°C pendant 1 cycle
- Conserver les ADNc produit à -20°C.

PCR SEMI-QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Principe : cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent.

NB : Utilisation du Kit Quantitect™ SYBR® Green PCR de Qiagen

1. Préparation du mix de PCR en temps réel

- Préparer le mélange réactionnel suivant à l'abri de la lumière et transférer 19 µL par capillaire[(1)]

Réactifs	Concentration finale	Volume pour 1 capillaire
Rnase free water	-	De 2 à 7µl selon la concentration de $MgCl_2$
Amorce S (10µM)	0 ,5µM	1µl
Amorce AS (10µM)	0,5µM	1µl
$MgCl_2$ (10mM)	De 2,5mM à 5mM selon les amorces	De 0 à 5µl selon la concentration de $MgCl_2$
QuantiTect SYBR Green PCR (2x)	1x	10µl

- Ajouter 1 µL d'ADNc dilué ou non selon pour faire une gamme étalon ou pour quantifier un échantillon
- Insérer les capillaires dans le LightCycler[(1)] et vérifier qu'il y a le même volume dans chaque capillaire

2. Conditions d'amplification et amorces choisies sur le LightCycler

Gène	Nombre de cycle	Etapes	Température	Durée
RSP29	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 minutes
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 57°C 72°C	10 secondes 15 secondes 10 secondes
Synapsine 1	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 minutes
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 57°C 72°C	10 secondes 15 secondes 10 secondes
Synapsine 2	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 minutes
	43	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 57°C 70°C	10 secondes 15 secondes 10 secondes
DAP kinase	1	Activation de la Taq polymérase	95°C	15 minutes
	50	Dénaturation Hybridation Elongation	95°C 58°C 72°C	10 secondes 15 secondes 10 secondes

Gène	Amorce Sens (5'→3')[3]	Amorce Anti-sens (5'→3')[3]	Taille de l'amplicon (pb)
RSP 29	ATGGGTCACCAGCAGCTCTA	GCCCGTATTTACGGATCAGA	106
Synapsine 1	GAGGCCCTCCACAACCAG	CTGCTGTGGGACTTGGTAGG	147
Synapsine 2	CATGGGTGTTTGCTCAGATG	TCTCTCGGTGATTGGGGTAG	96
DAP kinase	AGCTCCAGGATAAGGGAGGA	TGCCACGTGAAGAGCTGTC	140

3. Calcul et Interprétation des résultats

- Utiliser le logiciel RelQuant software[2] après avoir vérifié que le pic de la courbe de fusion correspond bien à la taille de l'amplicon sur gel.
- Les résultats seront exprimés en unité arbitraire.

---

(1) Light cycler : appareil thermocycler à fluorescence Roche Diagnostic (Meylan, France)

(2) Roche diagnostics, Manheim, Allemagne

(3) Les oligonucléotides sont commandés chez Eurogentec. Les oligonucléotides ont été choisis à l'aide du programme Primer 3 (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, USA) accessible par l'adresse internet, http://www.genome.wi.mit.edu.

PREPARATION D'UN GEL D'AGAROSE POUR ANALYSE QUALITATIVE D'ARN OU ADN PAR ELECTROPHORESE

- Pour préparer un grand gel 1x (pour 15/20 échantillons) → ajouter 0,8g d'agarose dans 80ml de tampon TBE(1) (Tris-Borate-EDTA) 1X
- Pour préparer un grand gel 1,5x (pour 15/20 échantillons) → ajouter 1,2g d'agarose dans 80ml de tampon TBE(1) (Tris-Borate-EDTA) 1X
- Pour préparer un petit gel 1x (pour 8 échantillons) → ajouter 0,5g d'agarose dans 50ml de tampon TBE 1X
- Pour préparer un petit gel 1,5x (pour 8 échantillons) → ajouter 0,75g d'agarose dans 50ml de tampon TBE 1X
- Prendre une cuve d'électrophorèse(2) et positionner le peigne en Téflon
- Chauffer le mélange au micro-onde afin de dissoudre l'agarose jusqu'à ce qu'il soit transparent (**Attention** à ne pas faire bouillir le mélange car il y a un risque de projection)
- Ajouter 1 goutte de BET (bromure d'éthidium) dans la solution (attendre que la solution refroidisse (environ 50°C) avant de l'ajouter) afin d'obtenir une concentration de 0,5 µg/ml et homogénéiser
- Couler le gel dans la cuve et laisser polymériser
- Déposer dans les puits du gel, 10µl d'échantillon mélangés à 2µl de solution de dépôt(3) ainsi que les marqueurs de taille(4).
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu (pôle négatif en haut de la cuve et pôle positif en bas de la cuve)
- Faire migrer les échantillons et les marqueurs de taille sous une tension constante selon la taille du gel : 80 volts pour un petit gel pendant 50min
  110 volts pour un grand gel pendant 50 min
- Les échantillons contenus dans le gel sont visualisés sur plaque UV (312nm) par Image Master™ VDS

---

(1) ***Tampon TBE 10X***→Tris 890mM, acide borique 890mM et EDTA 20nM à pH=8,2-8,3 (ajuster le pH si nécessaire avec de l'acide acétique glaciale).Pour du tampon TBE 1X, diluer 100ml de TBE 10X dans 900ml d'eau distillée pour 1 litre.

(2) Wide Mini-Sub™ Cell (Bio-Rad)

(3) ***Solution de dépôt 5X***→Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v) EDTA à 0,1mM (pH=8,0) et SDS 0,5% (p/v) (Sigma)

(4) Pour faire aliquots de marqueur de taille → 10µl de marqueur+90µl d'eau miliQ+20µl de bleu (1 aliquot=12µl)

PROTOCOLE DE BISULFITATION ET PCR

Principe: Cette technique consiste à traiter l'ADN méthylée avec du bisulfite, qui convertit les cytosines non méthylées en uracile. Les cytosines méthylées restent inchangées pendant le traitement. Une fois converti, le profil de méthylation de l'ADN peut être déterminé par amplification par PCR suivie de séquençage de l'ADN

La bisulfitation a été réalisé avec le kit EZ DNA Methylation-gold;Zymo research

1. Preparation des réactifs :

- **CT conversion reagent** *(à préparer 1 fois au début du kit)*

Dans le tube CT conversion reagent ajouter :
- 900µL H2O
- 300µL M-dilution buffer
- 50µL M-dissolving buffer

Mélanger à température ambiante en vortexant régulièrement pendant 10min
(Conserver la solution à -20°C et passer à 37°C avant utilisation)

- **M-wash buffer** : *(à préparer 1 fois au début du kit)*

Ajouter 24mL d'éthanol 100% aux 6mL de M-wash buffer concentré

2. Etape de bisulfitation

- Dans un tube pour PCR :
  130µL CT conversion reagent
  20µL ADN

Homogénéiser par refoulement a la pipette

- Mettre le tube dans le thermocycler

Programme : 1 - 98°C - 10min
2 - 64°C - 2h30min
3 - 4°C pour stockage (10°C si nuit)

- Dans une colonne Zymo-spin IC (placée dans un tube collecteur):
  600µL M-binding buffer
  Le produit du thermocycler. Fermer et remuer pas retournement

- Centrifuger a vitesse maxi (> 10 000 x g) pour 30s. Jeter le produit élué.

- Ajouter 100µL de M-wash buffer dans la colonne
  Centrifuger a vitesse maxi pendant 30s.

- Ajouter 200µL de M-wash buffer dans la colonne.
  Laisser 15-20min à température ambiante.
  Centrifuger a vitesse maxi pendant 30s

- ajouter 200µL de M-wash buffer dans la colonne } X2

Centrifuger a vitesse maxi pendant 30s

- Placer la colonne dans un tube de 1.5mL

Ajouter 10µL de M-elution buffer **directement sur la colonne et** centrifuger à vitesse maxi pendant 30s pour éluer l'ADN

3. Etape d'amplification par PCR

	Pour 1 tube (échantillons)
Tampon	2,5µl
dntp	0,5µl
$MgCl_2$	0,75µl
Amorces sens et antisens	0,5µl de chaque
Enzyme	0,15µl
Eau MilliQ	16,1µl
ADN	4µl
Volume final	25µl

- Programme d'amplification

Nombre de cycle	Etapes	Température	Durée
1	Activation de la Taq polymérase	94°C	2 minutes
40	Dénaturation Hybridation Elongation	94°C 54°C 72°C	30 secondes 30 secondes 30 secondes
	Stockage	10°C	Toute la nuit

PURIFICATION DE PRODUITS DE REACTION DE SEQUENÇAGE EN PLAQUE 96 PUITS-SEPHADEX G50

Principe : Cette étape a pour but de purifier par gel-filtration les produits de la réaction de séquençage. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons, d'éliminer les nucléotides non incorporés (les ddNTP marqués par un fluorochrome) et l'amorce utilisée pour la PCR de séquence présente en excès. La limite d'exclusion de la résine G50 correspond à un oligonucléotide d'environ 20 bases.

1. Précautions

- Les produits de la réaction de séquençage sont stockés à 4°C
- Manipulation des produits de séquençage en pièce post-PCR
- Prévoir de l'eau mQ du jour
- Utilisation d'une centrifugeuse pour plaque 96 puits
- Prévoir une plaque de récupération transparente à fond conique**.**

2. Préparation de la plaque de G50

- Retourner la plaque MultiScreen HV. Coller un film alu autocollant en dessous de la plaque Multiscreen de façon à bien protéger la membrane de chaque puits.
- Déposer de la résine Sephadex® G 50 dans chaque puits du chargeur de colonne,
- Retirer l'excès de résine sur le chargeur de colonne avec la raclette et récupérer l'excès de résine dans le pot stock,
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble,
- Taper légèrement sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.
- Ajouter 300 µl d'eau mQ dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque MultiScreen HV avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à 4°C.

Les plaques MultiScreen HV contenant de la résine Sephadex® G 50 imbibée d'eau peuvent être stockées à 4 °C pendant 2 semaines.

3. Tassement de la colonne avant la première utilisation de la plaque de G50

- Masquer avec un film aluminium les puits qui ne vont pas être utilisés.
- Sans retourner la plaque Multiscreen, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés.
- Placer la plaque de filtration Multiscreen HV sur la plaque de récupération de 350 µL.
- Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération
- Centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min.
- Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques.

4. Tassement de la colonne pour les utilisations suivantes de la plaque de G50

- Enlever le film aluminium au-dessus des puits qui vont être utilisés.
- Sans retourner la plaque Multiscreen, enlever le film aluminium sous les puits qui vont être utilisés.

- Réhydrater les puits en ajoutant de l'eau milliQ jusqu'à la surface du puits.
- Placer la plaque de filtration Multiscreen HV sur la plaque de récupération de 350 µL.
- Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération
- Centrifuger le montage à 910 g pendant 5 min.
- Vider la plaque de récupération et la conserver pour les prochaines plaques.

5. Purification

- Ajuster le volume de la réaction de séquençage à 20 µl à l'aide d'eau milliQ.
- Déposer la plaque de filtration Multiscreen HV sur une plaque neuve 96 puits transparente à fond conique de 250 µL.
- Déposer les 20 µl de produits de séquençage au centre de chaque puits de la plaque de filtration, sans toucher les bords et la résine.
- Equilibrer avec une plaque usagée et une plaque de récupération.
- Centrifuger à 910 g pendant 4 min.
- Couvrir la plaque neuve 96 puits transparente à fond conique de 250 µL par un film adhésif transparent, l'emballer dans du papier aluminium et la conserver à 4°C.

NEGATIVE GEOTAXIS

Principe : Ce test psychomoteur est un test de retournement des animaux de laboratoire (mammifères, souvent rongeurs) depuis la position « tête en bas » vers la position « tête en haut ». Il met en jeu la fonction motrice sur la commande des muscles des membres nécessaires à l'opération de retournement ainsi que la coordination des mouvements entre les quatre membres des individus. Ce test ce base sur le malaise de position des individus positionnés la tête en bas sur un plan incliné, ce qui engendre un reflex de retournement de ceux-ci afin de retrouver une position naturelle et préférée (position « tête en haut ») (Schroeder et al., 1995). De façon physiologique, ce reflex de retournement s'acquière avant le sevrage (au cours de la deuxième semaine après la naissance chez les rongeurs), mais le test peut être effectué à tous moment de la vie.

1. Procédure

Le jour du test, la mère allaitante est séparée dans sa portée pendant le temps de réalisation du test. Les jeunes individus sont testés un à un. Les individus sont placés délicatement sur leur quatre pattes en position « tête en bas » et maintenus par l'expérimentateur sur une surface plane inclinée à 20%; idéalement recouverte de feutrine. Sans latence, les individus sont lâchés et laissés libre de leur mouvements et un chronomètre est déclenché. Le temps nécessaire pour reprendre une position « tête en haut » sur le plan incliné (alignement du museau jusqu'au bas du dos) est mesuré. En général, quelques dizaines de secondes suffisent, avec en plus une diminution de ce temps en fonction de l'avancée en âge des individus. Ainsi, un temps maximum pour réaliser le test est fixé à 120 secondes. A la fin du test (échec total avec un temps de 120 secondes ou réussite en quelques secondes), chaque individu rejoint la cage maternelle, et la mère y est repositionnée lorsque tous les individus sont passés.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le temps nécessaire pour retrouver la position « tête en haut » est élevé, plus l'acquisition du reflex de retournement est mauvaise suggérant un trouble des fonctions motrices et de coordination au moment du test (jour post-natal).

Si ce test est réalisé en cinétique sur plusieurs jours, il est possible de mesurer l'amélioration de l'acquisition de ce reflex par une diminution du temps nécessaire. Ainsi, entre plusieurs groupes expérimentaux, il peut apparaître un retard d'acquisition des uns par rapport aux autres en fonction du niveau de maturation des circuits nerveux mis en jeu.

RIGHTING REFLEX

Principe : Ce test psychomoteur est un test de retournement des animaux de laboratoire (mammifères, souvent rongeurs) depuis la position « couché sur le dos » vers la position quadrupède. Il met en jeu la fonction motrice sur la commande des muscles nécessaires à l'opération de retournement ainsi que la coordination des mouvements entre « l'avant-main » et « l'arrière main » des individus. Ce test ce base sur le malaise de position des individus retournés et reposés dorsalement, ce qui engendre un reflex de retournement de ceux-ci afin de retrouver une position naturelle et préférée (position quadrupède) (Schroeder et al., 1995). De façon physiologique, ce reflex de retournement s'acquière au cours des premiers jours après la naissance et le test ne s'effectue donc plus après la première semaine.

1. Procédure

Le jour du test, la mère allaitante est séparée dans sa portée pendant le temps de réalisation du test. Les jeunes individus sont testés un à un. Les individus sont placés délicatement sur le dos en position allongée et maintenus par l'expérimentateur sur une surface plane; idéalement recouverte de feutrine. Sans latence, les individus sont lâchés et laissés libre de leur mouvements et un chronomètre est déclenché. Le temps nécessaire pour reprendre une position quadrupède (les quatre plantes des pattes en contact avec le support) est mesuré. En général, quelques secondes suffisent, avec en plus une diminution de ce temps en fonction de l'avancée en âge des individus. Ainsi, un temps maximum pour réaliser le test est fixé à 120 secondes. A la fin du test (échec total avec un temps de 120 secondes ou réussite en quelques secondes), chaque individu rejoint la cage maternelle, et la mère y est repositionnée lorsque tous les individus sont passés.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le temps nécessaire pour retrouver la position quadrupède est élevé, plus l'acquisition du reflex de retournement est mauvaise suggérant un trouble des fonctions motrices et de coordination au moment du test (jour post-natal).

Si ce test est réalisé en cinétique sur plusieurs jours, il est possible de mesurer l'amélioration de l'acquisition de ce reflex par une diminution du temps nécessaire. Ainsi, entre plusieurs groupes expérimentaux, il peut apparaître un retard d'acquisition des uns par rapport aux autres en fonction du niveau de maturation des circuits nerveux mis en jeu.

Les circuits nerveux mis en jeu sont les zones motrices primaires, les noyaux gris centraux et le cervelet. Ce test peut être complété par un test moteur strict (exemple le test de suspension) afin de préciser l'analyse entre les fonctions motrices et de coordination.

TEST DE SUSPENSION

Principe : Ce test évalue les performances motrices chez les rongeurs. Il met en jeu la fonction motrice sur la commande des muscles des membres antérieurs. Ce test évalue la capacité musculaire maximale des individus pour maintenir le poids de leur propre corps en suspension « au-dessus du vide ». De façon physiologique, ce test est plus pertinent après la première semaine chez les jeunes individus pour des raisons de maturation post-natale (Schroeder et al., 1995). Il peut être effectué chez l'adulte avec une adaptation du dispositif (hauteur et diamètre de la barre) mais il devient de moins en moins pertinent avec l'âge du fait de l'augmentation du poids des animaux et de l'existence de test plus adapté aux âges adultes (exemple le Rota-rod).

1. Procédure

Le jour du test, la mère allaitante est séparée dans sa portée pendant le temps de réalisation du test. Les jeunes individus sont testés un à un. Les individus sont placés délicatement en suspension par leurs pattes avant sur une tige métallique (1 mm de diamètre) tendue entre les deux cotés d'un cadre à environ 20 cm au-dessus d'une table. Une plaque de plexiglas est positionnée à un centimètre au-dessus de la tige pour empêcher les ratons de tourner autour d'elle et une aire d'accueil en coton est placée sous le dispositif en cas de chute. Le temps pendant lequel l'animal demeure en suspension est enregistré. Un temps maximum n'est pas essentiel dans ce test, mais peut être appliqué (exemple 120 seconde chez les individus avant le sevrage ; augmenter ce temps chez les individus plus âgés). A la fin du test (généralement déterminé par la chute de l'individu chez les jeunes sujets), chaque individu rejoint la cage maternelle, et la mère y est repositionnée lorsque tous les individus sont passés.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le temps de suspension est élevé, plus la capacité musculaire est importante.

Si ce test est réalisé en cinétique sur plusieurs jours, il est possible de mesurer l'augmentation des capacités musculaires par une augmentation du temps de suspension. Ainsi, entre plusieurs groupes expérimentaux, il peut apparaître un retard de maturation des uns par rapport aux autres en fonction du niveau de maturation des circuits nerveux ou des groupes musculaires mis en jeu. Les circuits nerveux mis en jeu sont essentiellement les zones motrices primaires.

HOMING

Principe : Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et de mémoire olfactivo-hippocampo-dépendantes chez les jeunes individus avant le sevrage. Il est basé sur les aptitudes des individus (essentiellement les rongeurs de laboratoire) à reconnaître et suivre les informations environnementales afin de retrouver leur environnement maternel habituel. Le parcours est caractérisé par un couloir de progression composé par un labyrinthe en T. A l'une des extrémités (base du T), la zone de départ est déterminée alors qu'aux autres extrémités du T (droite et gauche), deux zones d'arrivée ou de « sortie » du labyrinthe sont définies. Dans chacune de ces zones d'arrivée est déposé une quantité équivalente de litière soit fraîche, soit provenant de la cage maternelle d'élevage des jeunes individus testés. La répartition des deux type de litière est aléatoire (droite ou gauche en fonction des passages). Ce test est généralement effectué pendant la phase d'allaitement à partir du moment où l'activité exploratoire des individus commence à se développer développée (à partir de 5 jours post-natal).

1. Procédure

Le dispositif est un labyrinthe en T présentant un couloir de 9 cm de large et 30 cm de hauteur et dont la longueur de la barre « verticale du T » est de 46 cm et de la « barre horizontale du T » est de 60 cm. Les individus sont testés un à un aux jours 5, 7 9, 11 et 14 après la naissance. Au moment du test, chaque zone d'arrivée reçoit la même quantité de litière soit fraiche, soit appartenant à la boite d'élevage de l'individu testé. Chaque individu est déposé dans le bras de départ et il est laissé libre de ces mouvements pendant un temps maximum de 5 minutes. Le labyrinthe est débarrassé de la litière et nettoyé à l'alcool 50-70% entre chaque rat. Les paramètres enregistrés sont la latence d'entrée dans le compartiment contenant la litière connue (entrée avec les quatre pattes dans le compartiment) et le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans le bras contenant la litière fraîche ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »). Si l'animal n'a pas rejoint le compartiment contenant litière connue dans le temps imparti, le maximum de temps lui est attribué (5 min).

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type pour le temps de latence et les erreurs en fonction des groupes expérimentaux. Un pourcentage d'échec peut être calculé avec les individus qui n'ont pas rejoint la litière connue dans le temps imparti. Plus le nombre total d'erreurs et la latence de sortie sont importants, moins les performances mnésiques sont importantes. Si une différence n'apparait que pour la latence de sortie, il convient d'effectuer un test d'activité locomotrice pour vérifier que les individus ne présentent pas de trouble locomoteur qui serait perturbateur pour l'analyse mnésique de ce test. Les structures cérébrales impliquées sont essentiellement le tractus olfactif, le cortex olfactif et l'hippocampe.

LABYRINTHE EN MULTI-T

Principe : Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et mémorisation hippocampo-dépendantes. Il est basé sur les aptitudes des individus (essentiellement les rongeurs de laboratoire) à mémoriser un parcours dans lequel ils naviguent en fonction de repèrent environnementaux (non contrôlés par l'expérimentateur). Le parcours est caractérisé par un couloir de progression composé par l'enchainement linéaire de plusieurs labyrinthes en T « empilés » successivement et décalés les uns par rapport aux autres. A l'une des extrémités, la zone de départ est déterminée alors qu'à l'autre extrémité, la zone d'arrivée ou de « sortie » du labyrinthe est définie. En général, de 3 à 5 labyrinthes en T sont associés pour construire le parcours global. Ce parcours défini donc un tracé « idéal » dans lequel les individus ont une utilisation optimale de leurs ressources et des accès en « cul-de-sac » dans lesquels les individus perdent de l'efficacité comportementale. Afin de conserver une motivation optimale homogène chez tous les individus d'une étude, il est nécessaire de délivrer une récompense alimentaire aux animaux dès leur arrivée dans la zone de sortie du labyrinthe. Pour cela trois méthodes ; (i) soit les animaux sont préalablement (plusieurs semaines avant le test) habitués à recevoir une petite quantité (< une noisette par jour) de lait concentré sucré ou chocolat ou céréale sucré en flocon, (ii) soit les animaux sont maintenus à 90% de leur poids habituel deux semaines avant le test, (iii) soit les animaux sont mis à jeun 24 à 48 heures (en fonction de l'âge) avant chaque test. Dans ces deux derniers cas, les animaux reçoivent une croquette de leur aliment habituel lors de leur arrivée en zone de sortie et la termine dans leur cage d'élevage. Ce test peut être effectué à tous les âges à partir du moment où l'activité exploratoire des individus est bien développée (en général légèrement avant le sevrage chez les rongeurs).

1. Procédure

Le dispositif est un labyrinthe constitué par l'assemblage successif de 5 modules en T identiques présentant chacun un couloir de 9 cm de large et 30 cm de hauteur et dont la longueur de la barre « verticale du T » est de 46 cm et de la « barre horizontale du T » est de 60 cm. Pour cette phase du test, les animaux sont mis à jeun 24 heures avant le début du test et passent dans le labyrinthe 1 fois par jour et cela pendant 5 jours consécutifs entre le 14 ème et le 18 ème jour post-natal. Les individus sont testés un à un. Au moment du test, chaque individu est déposé dans le bras de départ et il est laissé libre de ces mouvements. Leur motivation est renforcée à chaque essai, en leur permettant de manger un bouchon de nourriture dans la zone d'arrivée du labyrinthe. Les couloirs du labyrinthe sont nettoyés à l'alcool 70% entre chaque rat. Les paramètres enregistrés sont le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière ») et la latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée). Cette phase constitue la phase d'acquisition du parcours dite « d'apprentissage ».

Par la suite, un test de réutilisation de l'acquisition dit « test de mémoire » peut être réalisé, par un seul passage dans le même dispositif, chaque mois (30 jours entre chaque essai – durée qui peut varier selon l'expérimentateur). Les mêmes paramètres que précédemment sont mesurés.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le nombre total d'erreurs et la latence de sortie sont importants, moins les performances mnésiques sont importantes. Si une différence n'apparait que pour la latence de sortie, il convient d'effectuer un test d'activité locomotrice pour vérifier que les individus ne présentent pas de trouble locomoteur qui serait perturbateur pour l'analyse mnésique de ce test.

EVITEMENT PASSIF

Principe : Ce test correspond à une étude des capacités d'apprentissage et mémorisation hippocampo-indépendantes. Il est basé sur les aptitudes des individus (essentiellement les rongeurs de laboratoire) à utiliser leur mémoire associative en mettant en relation une position ou une situation environnementale avec un stimulus généralement aversif. Ce test utilise la préférence de positionnement des rongeurs auxquels le choix est laissé entre un compartiment lumineux et un compartiment sombre d'une enceinte expérimentale. Dans ce type de dispositif de choix binaire, les rongeurs se positionnent préférentiellement dans le compartiment sombre, même si une exploration globale est généralement observée. Le stimulus aversif le plus couramment utilisé est le choc électrique modéré. Ce stimulus est appliqué au travers de barreaux ou d'une grille métallique qui composent le sol et il est délivré par l'expérimentateur lorsque les individus pénètrent dans le compartiment sombre. Le but est ici de recruter la mémoire associative des animaux pour qu'ils apprennent à éviter leur positionnement préféré (sombre) en associant celui-ci à une aversion stimulée. Ce test peut être effectué à tous les âges à partir du moment où l'activité exploratoire des individus est bien développée (en général au moment du sevrage chez les rongeurs).

1. Procédure

Le dispositif est constitué d'une enceinte composée de deux compartiments de taille équivalente (25 x 40 cm) séparé par une paroi au centre de laquelle est délimitée une ouverture (10 x 10 cm) laissant un passage libre entre les deux compartiments. Les murs de chaque compartiment ont une hauteur de 35 cm, empêchant les animaux de s'échapper vers le haut (les murs sont de couleur noire). Le sol des deux compartiments est composé d'une grille métallique à barreaux fins (< 1mm) permettant de délivrer indépendamment dans les deux compartiments des chocs électriques ponctuels ou répété (0.13 mA ; fréquence 1/sec). L'un des compartiments est éclairé par une lampe (à lumière froide) de 25W et l'autre compartiment est non éclairé. Les individus sont testés un à un. Au moment du test, chaque individu est déposé dans le compartiment éclairé et il est laissé libre de ces mouvements pendant un temps maximum de 2 minutes. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 50-70% entre chaque passage. .Le test se déroule en trois phases. La première phase dite de conditionnement consiste à laisser l'animal explorer librement le dispositif sans délivrer de choc électrique. Un seul passage est réalisé et le temps de latence de première entrée dans le compartiment sombre et le temps de présence dans ce même compartiment est relevé. Lors de la deuxième phase (qui peut être réalisée dès le lendemain), l'animal subit le même type de passage que précédemment mais des chocs électriques sont délivrés lorsque l'animal entre dans le compartiment sombre. Cette deuxième phase est réalisée selon deux passages minimum et le temps de sortie du compartiment sombre sous stimulation électrique est relevé.

Par la suite, un test de réutilisation de l'acquisition dit « test de mémoire » est réalisé (troisième phase), par un seul passage dans le même dispositif, chaque mois (30 jours entre chaque essai – durée qui peut varier selon l'expérimentateur). Ce sont le temps passé dans la compartiment éclairé et le nombre d'erreurs c'est à dire le nombre de retour dans le compartiment sombre qui sont mesurés.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Lors de la première phase, un temps de présence plus important dans le compartiment sombre montre une préférence de positionnement des animaux (validation du test).

Lors de la deuxième phase, une diminution du temps de présence dans le compartiment sombre indique une bonne association entre les paramètres (compartiment sombre et choc électrique).

Lors de la troisième phase, plus le temps de latence d'entrée dans le compartiment sombre est important, meilleure est la mémoire associative des individus.

OPEN FIELD

Principe : Ce test est celui de l'observation libre des comportements animaux dans une enceinte close homogène sans autre dispositifs particuliers. Ce test est issu de l'éthologie dont l'essor se situe dans les années 1970 et qui met en avant l'observation et la quantification des items comportementaux qui composent les grandes fonctions comportementales, selon le principe « l'animal montre lui-même son niveau d'activité en fonction du milieu dans lequel il se trouve, mais sans contrainte expérimentale particulière ; il revient au scientifique de capter et mesurer les différents items ». C'est une des méthodes les plus traditionnelles et largement utilisé pour l'évaluation des comportements locomoteur, exploratoire, ainsi que l'état émotionnel chez le rongeur (Tobach, 1969). Ce test peut être effectué à tous les âges à partir du moment où l'activité exploratoire des individus est bien développée (en général au moment du sevrage, vers une vingtaine de jour chez les rongeurs).

1. Procédure

Les individus sont testés un à un. Le dispositif se compose d'une arène circulaire de 1 m de diamètre et dont la hauteur des murs est de 35 cm. Le sol est constitué d'une plaque en verre sur laquelle a été dessiné au milieu un cercle dit central de 50 cm laissant apparaitre entre ce cercle et les murs du dispositif un deuxième cercle dit périphérique de 100 cm. Plusieurs lignes radiales traversent les deux zones divisant la surface de l'arène en 8 quartiers centraux et 8 quartiers périphériques. Les animaux testés sont délicatement placés au milieu du dispositif et l'explorent librement pendant un temps fixé (généralement entre 2 et 10 minutes en fonction de l'âge). Le dispositif est nettoyé à l'alcool 50 à 70% entre chaque rat. Les paramètres mesurés sont le nombre d'entrée dans les quartiers périphériques et centraux (quatre pattes dans le quartier) ainsi que le nombre de redressement (les deux pattes antérieures décollées du sol et les deux pattes postérieures au sol). A la fin du test, chaque individu rejoint sa cage d'élevage.

2. Analyse

Les données sont exprimées en moyenne ± écart type en fonction des groupes expérimentaux. Plus le nombre total de quartiers visités est important, plus l'activité locomotrice est importante. Une dichotomie entre les visites des quartiers périphériques et centraux peut être réalisée. Plus les individus visitent les quartiers périphériques au détriment des quartiers centraux, plus ils donnent d'indices d'anxiété. Il est toutefois nécessaire de confirmer ces indices par un test spécifique du niveau d'anxiété (exemple le labyrinthe en croix surélevé – elevated plus maze).

Enfin, plus les individus montrent de redressement, plus leur niveau d'exploration et d'intéressement à leur environnement est important. Les circuits nerveux mis en jeu sont multiples dans ce type d'approche éthologique mais on peut citer le système limbique avec notamment les amygdales, le thalamus et les aires sensitives et décisionnelles du cortex pariétal et temporal.

Liste des communications et publications

I. Communications affichées

1. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Schroeder H, Daval JL. Evaluation of a methyl donor deficient diet on the brain post-natal maturation in rat: from gene expression to related behavior. **6th FENS forum of European Neuroscience** *(Juillet 2008, Genève, Suisse)*

2. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL**.** Consequences of methyl donor deficiency on brain ageing in rats - influence of a neonatal hypoxia-physiological ageing. **IVème journée Claude Huriet de la recherche médicale** *(Décembre 2008, Nancy, France)*

3. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL**.** Conséquences d'une carence nutritionnelle en donneurs de méthyles sur la maturation cérébrale du rat : du gène à la fonction. JL**. Risque environnemental et neuropathologiques (Société de circulation et métabolisme du cerveau)** *(Avril 2009, Nancy, France)*

4. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. Effects of methyl donor deficient diet on the postnatal brain maturation in the rat: from gene expression to related behavior. **9ème colloque de la société des neurosciences** *(Mai 2009, Bordeaux, France)*

5. Pourié G, **Martin N**, Bossenmeyer-Pourié C, Beck B, Daval JL, Guéant JL. Effects of methyl donor deficient diet on the brain maturation in rat: from gene expression to related behaviors *(2009, Bangkok, Inde)*

6. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. Conséquences d'une carence nutritionnelle en donneurs de méthyles sur la maturation cérébrale du rat : du gène à la fonction. **36ème forum des jeunes chercheurs (interactions biologiques, de la molécule à la cellule)** *(Aout 2009, Nancy, France)*

7. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. La dérégulation du cycle de l'homocystéine au cours de la maturation cérébrale engendre des conséquences cognitives à long terme **Journées Nationales Homocystéine (Groupe Homocystéine France GHF)** (Prix de la meilleure communication affichée) *(Octobre 2009, Montpellier, France)*

8. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. La dérégulation du cycle de l'homocystéine au cours de la maturation cérébrale engendre des conséquences cognitives à long terme. **1ère Journée Scientifique de la FR3209 Bioingénierie Moléculaire, Cellulaire et Thérapeutique** *(Décembre 2009, Nancy, France)*

9. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. La dérégulation du cycle de l'homocystéine au cours de la maturation cérébrale engendre des conséquences cognitives à long terme **Vème journée Claude Huriet de la recherche médicale** *(Décembre 2009, Nancy, France)*

10. **Martin N**. L'hypoxie néonatale : Pour un meilleur vieillissement cérébral**. Doctoriales de Lorraine 2010** *(Mai 2010, Ventron, France)*

11. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. Homocysteine cycle deregulation during brain maturation leads to long term cognitive consequences. **7th FENS forum of European Neuroscience** (Prix FENS 2010 de la société des neurosciences française) *(Juillet 2010, Amsterdam, Pays Bas)*

12. Pourié G, **Martin N**, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Beck B, Daval JL, Guéant JL.A nutritional deficiency in methyl donor deals to brain specific deregulations: from gene expression to related behaviours.**7th FENS forum of European Neuroscience** *(Juillet 2010, Amsterdam, Pays-Bas)*

13. El Chakour El Hajj Chehadeh S, **Martin N**, Guéant JL, Daval JL, Leininger-Muller B. Conséquence d'une carence en donneurs de groupement méthyles sur l'expression de la protéine StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) dans le cerveau de rat. **VIème journée Claude Huriet de la recherche médicale (***Décembre 2010, Nancy, France)*

14. **Martin N**, Pourié G, Bossenmeyer-Pourié C, Koziel V, Guéant JL, Daval JL. Effects of a methyl donor deficient diet on the brain postnatal development in the rat: specific sensitivities according brain structures **The Luxembourgish Nutrition Conference** (Mai 2011, Mondorf les bains, Luxembourg)

15. El Chakour El Hajj Chehadeh S, **Martin N**, Guéant JL, Daval JL, Leininger-Muller B. Consequence of diet lacking methyl donors on the expression of protein StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) in the brain of rat. **10ème colloque de la société des neurosciences** *(Mai 2011, Marseille, France)*

16. **Martin N**, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL, Pourié G. Nutritional deficiency in methyl donors during development and brain maturation leads to long term tissue and functional disorders. **8th IBRO World Congress of Neuroscience** *(Juillet 2011,Florence,Italie)*

II. <u>Communication orale</u>

1. Conséquences d'une carence nutritionnelle en donneurs de méthyles sur la maturation cérébrale du rat**. Risque environnemental et neuropathologiques (Société de circulation et métabolisme du cerveau)** *(Avril 2009, Nancy)*

2. Effets d'une néo-neurogenèse induite par une hypoxie néonatale sur la maturation et le vieillissement de l'hippocampe chez le rat **VIème journée Claude Huriet de la recherche médicale** *(Décembre 2010, Nancy)*

3. Effets d'une néo-neurogenèse induite par une hypoxie néonatale sur la maturation et le vieillissement de l'hippocampe chez le rat **Colloque annuel de la société de circulation et métabolisme du cerveau (L'hypoxie)** *(Janvier 2011, Caen)*

III. Publication

MARTIN N, POURIÉ G, BOSSENMEYER-POURIÉ C, JAZI R, GUÉANT JL, VERT P, DAVAL JL Conditioning-like brief neonatal hypoxia improves cognitive function and brain tissue properties with marked gender dimorphism in adult rats
Seminars in Perinatology 2010 Jun;34(3):193-200

AKCHICHE N,GUEANT JL,**MARTIN N**,KEREK R,POURIÉ G,KOZIEL V,HELLE D,ALBERTO JM, ORTIOU S,CAMADRO JM, LÉGER T, DAVAL JL, BOSSENMEYER-POURIÉ C **Folate deficit alters differentiation and plasticity of neuroprogenitors by epigenetic pathways and homocystéinylation** (article soumis à Neuron)

POURIÉ G, **MARTIN N**, BOSSENMEYER- POURIÉ C, SPADA R, AKCHICHE N, LION A, GUEANT-RODRIGUEZ RM, PERRIN P, JEANNESSON E, LEVASSEUR L, EL HAJJ CHEHADEH S, DOVI-ACOUETEY S, BRACHET P, BOSCO P, ANELLO G, STELLA G,KOZIEL V, ALBERTO JM, HELLE D, DEBARD R, COSTE F, LEININGER-MULLER B, POUSSIER S, MARIE PY, ELIA M, ROMANO A, DAVAL JL, GUÉANT JL **Methyl donor deficiency alters synapsin-dependent cerebellum plasticity through impaired pathways of estrogen nuclear receptor alpha** (article soumis à Nature medicine)

MARTIN N, BOSSENMEYER- POURIÉ C, KOZIEL V, ROZAT J, AUDONNET S, VERT P, GUÉANT JL, DAVAL JL, POURIÉ G **Non-injurious neonatal hypoxia confers resistance to brain senescence in old male rats, with increased synaptic plasticity and enhanced memory** (article soumis à Journal of Neuroscience)

EL HAJJ CHEHADEH S, **MARTIN N**, POURIÉ G, BOSSENMEYER- POURIÉ C, CANABADY-ROCHELLE L, ALBERTO JM, FORGES T,DAVAL JL, GUÉANT JL **Methyl donor deficiency during gestation and lactation impairs key proteins of neurosteroidogenesis in hippocampus and cerebellum of rats pups** (article soumis à PLoS one)

Résumé

De nombreuses études ont montré qu'une altération du métabolisme de l'homocystéine, à l'origine de son accumulation dans les cellules, constituait un facteur de risque pour la survenue de différentes pathologies, en particulier les maladies neurodégénératives. Par ailleurs, alors que les effets délétères d'une hypoxie néonatale sévère sont bien documentés, il a été plus récemment montré qu'un épisode hypoxique suffisamment modéré pour ne pas induire de lésions cérébrales exerçait des effets neuroprotecteurs, avec une stimulation de la neurogenèse. Notre objectif principal était d'étudier les conséquences cérébrales d'une carence précoce en donneurs de groupements méthyles (folates, vitamine B12) combinée ou non à une stimulation hypoxie-dépendante de la neurogenèse. Les effets de la carence ont été explorés chez des rats nés de mères carencées en donneurs de méthyles au cours de la gestation et de la période d'allaitement. L'utilisation d'un modèle de progéniteurs neuronaux carencés a permis d'approfondir l'étude des mécanismes impliqués. Les résultats ont montré des atteintes de l'intégrité tissulaire de certaines aires cérébrales comme l'hippocampe et le cervelet ainsi que des déficits comportementaux associés, à différents stades de la vie chez les animaux carencés, en dépit d'un retour à une alimentation standard au sevrage. Ces perturbations ont été caractérisées comme essentiellement relatives à des processus épigénétiques et à l'homocystéinylation de protéines neuronales spécifiques. De plus, un dimorphisme sexuel est apparu, avec la participation de voies cellulaires dépendantes du récepteur ERα. La neurogenèse induite dans les zones germinatives par un épisode hypoxique néonatal bref a engendré des conséquences bénéfiques à long terme sur le vieillissement cérébral des rats mâles, avec un maintien de l'intégrité de l'hippocampe, en termes de densité cellulaire, phénotypes des circuits nerveux, plasticité synaptique et performances cognitives associées. Enfin, la combinaison des deux facteurs, carence et hypoxie, a montré que le conditionnement cérébral par l'hypoxie néonatale était capable d'améliorer le devenir tissulaire et fonctionnel du cerveau des animaux carencés. Les mécanismes clés interviendraient au cours de périodes critiques de maturation des différentes structures cérébrales, soulignant l'importance des processus de « programmation fœtale ».

Mot clés : Acide folique, vitamine B12, homocystéine, neurogenèse, hypoxie cérébrale, neuroplasticité, programmation fœtale

Summary

Numerous studies have shown that an alteration of homocysteine metabolism, leading to cell accumulation of homocysteine, constitutes a risk factor for various pathologies, including neurodegenerative diseases. Furthermore, whereas deleterious effects of severe neonatal hypoxia have been well documented, it was shown more recently that a moderate episode of hypoxia which does not induce apparent brain injury can exert neuroprotective effects, with a stimulation of neurogenesis. Our main goal was to study the consequences on the brain of an early deficiency of methyl donors (folate, vitamin B12) with or without a hypoxia-related stimulation of neurogenesis. The effects of deficiency were investigated in rats born from dams fed a deficient diet during gestation and the lactating period. In vitro neuroprogenitors were additionally used for the study of cell mechanisms involved. Data showed alterations of tissue integrity in some brain areas such as the hippocampus and the cerebellum, with associated behavioral deficits at various ages, in spite of a return to normal diet at weaning. Brain alterations were shown to be mainly related to epigenetic mechanisms and to homocysteinylation of specific neuronal proteins. Moreover, a prominent sexual dimorphism was depicted, with the participation of cellular pathways involving ERα receptor. Neurogenesis induced in germinative zones by a brief neonatal hypoxia led to long term beneficial effects on brain aging in male rats, with preserved integrity of the hippocampus, in terms of cell density, brain circuit phenotypes, synaptic plasticity, and related cognitive functions. Finally, the combination of deficiency and hypoxia revealed that brain conditioning by brief neonatal hypoxia was able to improve tissular and functional brain outcome in deficient rats. The key mechanisms involved would occur at critical periods during the maturation of the various brain structures, thus highlighting the role of fetal programming.

Key words: Folic acid, B12 vitamin, homocysteine, neurogenesis, brain hypoxia, neuroplasticity, fetal programming