



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

École doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Science de la vie et de la santé »

Par :

Lynda SABER CHERIF

Impact d'une carence périnatale en donneurs de méthyles sur
l'ontogenèse et la plasticité des réseaux hypothalamiques et
l'homéostasie énergétique.

Le 20 Novembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :

Dr. Virginie TOLLE	CR, U1266 INSERM, Paris, France
Dr. Patrick ANGLARD	DR, U7364 CNRS, Strasbourg, France

Examineurs :

Pr. Vincent BEREZOWSKI	PU, U1171 INSERM, Lille, France
Pr. Jean-Louis GUEANT	PU-PH, U1256 INSERM, Nancy, France
Dr. Jean-Luc DAVAL (Directeur de thèse)	DR, U1256 INSERM, Nancy, France
Pr. Carine POURIE (Co-directrice de thèse)	PU, U1256 INSERM, Nancy, France

Membre invité :

Pr. Thomas CLAUDEPIERRE	PU, UR AFPA INRA, Nancy, France
-------------------------	---------------------------------

Remerciements

Mes remerciements s'adressent :

-A Monsieur Jean-Luc DAVAL, directeur de thèse, et Mme Carine BOSSENMEYER-POURIE, co-directrice de thèse, pour leur encadrement et leur soutien, pour toutes les connaissances transmises et pour ce beau travail qu'on a accompli ensemble.

-A Monsieur Jean-Louis GUEANT, directeur de laboratoire, pour m'avoir accepté dans son laboratoire en tant que doctorante et pour avoir accepté d'être examinateur de ce travail.

-A Madame Virginie TOLLE et Mr Patrick ANGLARD, pour avoir accepté d'être rapporteurs pour ma soutenance de thèse et pour l'intérêt porté à ce travail.

-A Monsieur Vincent BEREZOWSKI, pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse et pour le temps et l'intérêt porté à ce travail.

-A Monsieur Thomas CLAUDEPIERRE, pour avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse et avoir accepté de faire partie de ce jury en tant que membre invité.

-A Monsieur Grégory POURIE, pour son aide, pour m'avoir formé au cryostat et à l'acquisition d'images au microscope. Merci pour le temps et l'intérêt que tu as accordé à ce projet.

-A Madame Natacha DREUMONT et Mme Céline CHERY pour leurs précieux conseils et leur disponibilité. Merci de m'avoir supervisé pour la partie méthylation.

-A tout le personnel technique du laboratoire, pour leur aide, leur disponibilité et leur contribution pour l'accomplissement de ce travail.

-A Madame Déborah HELLE, pour son accompagnement au début de ma thèse, pour son aide et ses conseils.

-A tout ceux qui ont apporté une pierre à l'édifice de ce travail.

-Aux doctorants du laboratoire et collègues de bureau pour la bonne ambiance et les moments passés ensemble.

-A tout ceux qui m'ont soutenue, qui m'ont encouragée et qui ont partagé mes craintes. Merci de m'avoir écoutée et d'avoir essayé de me consoler.

-A mes parents et ma famille, pour m'avoir soutenue et m'avoir permis et donné les moyens d'atteindre cet objectif. Je ne vous remercierai jamais assez, sans votre soutien ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Table des matières

Liste des figures	9
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations.....	13
Avant-propos.....	17
I-Synthèse bibliographique.....	19
I-Développement du système nerveux central	20
1-Mise en place du système nerveux central	20
1-A-La période embryonnaire	20
1-B-La période foetale.....	22
2-Mécanisme de la neurulation	23
2-A. La neurulation primaire.....	23
2-B. La neurulation secondaire.....	24
3-Développement de l'hypothalamus	25
4-Rôles de l'hypothalamus.....	29
4-1-Rôle de l'hypothalamus dans la prise alimentaire et la dépense énergétique	29
4-2-Les hormones périphériques intervenants dans la régulation de la prise alimentaire	30
4-3-Rôle des glucocorticoïdes dans la régulation de la prise alimentaire	36
5-Les régions du cerveau impliquées dans la régulation de la prise alimentaire	39
5-1-Les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire.....	39
5-2-Les régions extra-hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire	41
6-Régulation de la prise alimentaire au niveau central	42
II-Les donneurs de méthyles et l'homocystéine	47
1-Les folates (vitamine B9).....	47
2-La vitamine B12 (Cobalamine).....	51
3-Autres donneurs de méthyles	55
4-Cycle des monocarbones et homocystéine	55
5-L'homocystéine	57
5-1-Reméthylation de l'homocystéine	59
5-2-La voie de transsulfuration.....	61
III-Pathologies et carences en donneurs de méthyles	63
1-Carences en folates (vitamines B9).....	63
2-Carences en cobalamine (Vitamine B12).....	63
3-Supplémentation en folates.....	64
4-Exemples de pathologies liées aux carences en donneurs de méthyles.....	64
a-Anomalies du tube neural (NTDs)	64
b-Maladies cardiovasculaires	65
c-Diabète	66
d-Cancer	66
Objectifs de l'étude	69

II-Matériel et méthodes	71
1-Les modèles d'étude.....	72
1-1-Le modèle cellulaire	72
1-2-Le modèle animal	73
2-Étude de l'apoptose cellulaire.....	76
3-Étude de l'expression des gènes par Rétrotranscription (RT) et quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	76
4-Étude de l'expression des protéines par Western Blot	77
5-Etude de l'expression/localisation des protéines ainsi que leurs interactions par immunofluorescence et Duolink	77
6-Régulation de l'expression des gènes par méthylation.....	78
6-1-Étude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes par PCR quantitative..	78
6-2-Étude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes par la technique COBRA	79
7-Analyse statistique	79
III-Résultats	81
Première partie :.....	82
Developmental Impairments in Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid.....	83
Deuxième partie :	85
1-Persistence of the gastric mucosa inflammation in adult and old rats after fetal and early post-natal exposure to methyl donor deficiency	86
I-Introduction.....	87
II Résultats.....	88
1-Les rats MDD présentent un déficit pondéral définitif associé à une augmentation de l'homocystéinémie.....	88
2-Une MDD gestationnelle est responsable d'altérations irréversibles de l'estomac.....	89
3-L'accumulation tissulaire d'homocystéine s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose dans la muqueuse gastrique	91
4-La MDD engendre une accumulation et une perte de fonctions des formes N-homocystéinylées de l'actine et de la E-cadhérine.	92
5. La MDD induit une inflammation chronique de la muqueuse gastrique en lien avec une activation maintenue de la voie NFkB.	95
6-La MDD perturbe de manière irréversible l'organisation cellulaire de la glande gastrique.....	97
7-Un retour à une alimentation normale permet une normalisation progressive des teneurs plasmatiques en Ghréline	99
III. Discussion	101
2-Conséquences d'une supplémentation périnatale en folate sur la MDD gestationnelle-Étude du système à Ghréline	105
2-1-Analyse de l'expression du gène codant pour la Ghréline dans l'estomac des ratons de 21 jours en conditions de carence et de supplémentation en B9	105

2-2-Conséquences d'une supplémentation périnatale en B9 sur la localisation des cellules endocrines X/A à Ghréline dans la glande gastrique des ratons de 21 jours.....	106
2-3- Eude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression du gène de la Ghréline	108
Troisième partie :.....	112
1-Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus.....	113
2-Impact d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes	116
2-1-Impact de la carence en vitamines B9/B12 sur l'expression transcriptionnelle du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus	117
2-2-Impact de la carence gestationnelle sur l'expression protéique du récepteur aux glucocorticoïdes dans le modèle animal et dans la lignée cellulaire mHypoE46 (souris).....	118
2-3-Étude de la N-homocystéinylation du récepteur aux glucocorticoïdes	120
2-4-Conséquences d'une supplémentation en folate sur l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans le modèle animal.....	123
IV-Discussion Générale.....	127
V-Conclusion et perspectives	137
VI-Références bibliographiques.....	141
VII-Annexes	157
1-Publications	158
2-Fiches techniques	191
VII-Valorisation scientifique	225
1-Liste des publications	225
2- Liste des communications	225

Liste des figures

Figure 1: Le développement précoce du tube neural. Vue dorsale d'embryons reconstruits. ...	21
Figure 2: Les 5 importantes subdivisions du cerveau à 5 semaines de développement embryonnaire (Douira-Khomsy et al., 2009).	22
Figure 3: Schéma simplifié représentant le phénomène de neurulation (Nikolopoulou et al., 2017).....	25
Figure 4: Les facteurs de signalisation dans l'induction hypothalamique et la régionalisation	27
Figure 5: Schéma illustrant l'organisation de l'hypothalamus adulte.	28
Figure 6: Régulation de la prise alimentaire par les circuits neuronaux hédoniques et homéostatiques.	31
Figure 7: Interactions entre les hormones périphériques et les voies neurales régulant la prise alimentaire et la masse grasse	34
Figure 8: La signalisation hypothalamique contrôlant la balance énergétique	38
Figure 9: Schéma représentant le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique	43
Figure 10: Transformation chimiques des folates	48
Figure 11: Structure de l'acide folique (Scaglione and Panzavolta, 2014).....	49
Figure 12: Structure chimique de la cobalamine (vitamine B12) (Froese et al., 2019).	52
Figure 13: Schéma représentant l'absorption de la vitamine B12 (cobalamine)	54
Figure 14: Le métabolisme des monocarbone.	57
Figure 15: Structure de l'homocystéine (Oikonomidi et al., 2016).	58
Figure 16: Cycle de la méthionine	60
Figure 17: Voie de transsulfuration.....	62
Figure 18: Schéma récapitulatif du protocole de carence et de supplémentation en vitamine B9.	75
Figure 19: Analyse morphologique de l'estomac, ainsi que de ses différentes parties : Fundus, Body et l'Antre des rats exposés à un régime carencé (MDD) pendant la période gestationnelle.....	90
Figure 20: Marquage de l'homocystéine et de l'apoptose au niveau des cellules de la muqueuse gastrique.	92

Figure 21: Interactions des protéines du cytosquelette dans la glande gastrique des rats âgés de 21 jours, 80 jours et 450 jours.	93
Figure 22: Interaction de la E-cadherine et de la β -catenin dans la glande gastrique des rats contrôles et déficients (MDD) à différents âges : 21 jours, 80 jours et 450 jours.....	94
Figure 23: Analyse de l'expression de marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et de la voie NFkB dans la muqueuse gastrique des rats carencés (MDD) à 80 jours et à 450 jours par rapport aux contrôles (C).....	95
Figure 24: Immunohistochimie des mucous pit cells et Neck cells et des cellules pariétales (HK ⁺ ATP ase) au niveau de la glande gastrique à 21 jours, 80 jours et 450 jours chez les rats carencés (MDD) et contrôles (C).	98
Figure 25: Analyse du système exocrine à FI et endocrine à ghréline dans la glande gastrique.	100
Figure 26: Expression de l'ARNm de la ghréline dans l'estomac par rapport aux gènes de référence : RPS29 et pol II chez le raton de 21 jours.	106
Figure 27: Expression de la ghréline au niveau des glandes gastriques des ratons de 21 jours.	107
Figure 28: Caractérisation et régulation du promoteur du gène "ghréline" chez le rat et l'humain (Wei et al., 2005).	109
Figure 29: Taux de méthylation du site "A" de la région promotrice du gène de la ghréline dans la partie "body" de l'estomac des mères (N=3) et des ratons de 21 jours (N=3).	110
Figure 30: Digestion des échantillons d'estomacs (partie Body) des ratons de 21 jours avec l'enzyme DrDI.	111
Figure 31: Schéma des interactions entre les neurones à Ghréline et les autres types cellulaires du noyau arqué (Cowley et al., 1999).	114
Figure 32: Expression de l'ARNm du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus de rats de 21 jours, par rapport à 2 gènes de référence (RPS29 et GAPDH) et à un calibrateur externe, en conditions de carence en B9/B12.	117
Figure 33: Expression/localisation de la protéine GR dans l'hypothalamus de rats de 21 jours en conditions de carence en vitamines B9/B12.....	118
Figure 34: Expression de la protéine GR dans la lignée mHypoE46 de souris, après 24h de carence en folate.....	119
Figure 35: N-homocystéinylation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (spectrométrie de masse, rat).....	120
Figure 36: Illustration des résultats obtenus par Duolink et de l'interaction entre GR et l'homocystéine dans la lignée de souris (mHypoE46).	122

Figure 37: Expression de l'ARNm de GR par rapport à 2 gènes de référence (RPS29 et GAPDH) et à un calibrateur externe en conditions de supplémentation en B9. 123

Figure 38: Expression/localisation de la protéine GR dans l'hypothalamus des rats de 21 jours en conditions de supplémentation en acide folique..... 124

Liste des tableaux

Tableau 1: Poids corporel, taux plasmatique de vitamines du groupe B et concentration d'homocystéine (moyenne+SEM) chez des rats témoins âgés de 80 et 450 jours et chez des rats Wistar déficients en donneurs de méthyles (MDD) 89

Tableau 2: Amorces de qPCR et conditions d'utilisation..... 203

Tableau 3: Anticorps primaires (Western Blot et Immunomarquage)..... 212

Tableau 4: Amorces PCR et conditions d'utilisation..... 224

Liste des abréviations

5-FTHF : 5-formyl tétrahydrofolate

5-MTHFR: 5-méthyl tétrahydrofolate

AgRP: Agouti-related-protein

AP: Area Apostrema

AP1 : Activating Protein 1

apoAIV : Apolipoprotéine AIV

ARC : Noyau arqué

ATP : Adénosine triphosphate

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BMPs : Bone Morphogenetic Proteins

CA1 : Corne d'Ammon, Zone 1

CA3 : Corne d'Ammon, Zone 3

CART : Cocain-and-amphetamine-regulated transcript

Cbl : Cobalamine

CBS : Cystathionine β synthase

CCK: Cholécystokinine

CRH: Corticotrophin-releasing hormone

CSE : Cystathionine γ liase

DMH : Noyau dorsomédian

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2

Gaba : Acide gamma amino-butyrique

GC : Glucocorticoïdes

GHSR: Growth hormone secretagogue receptor

GL: Lumière gastrique

GLP-1: Glucagon like peptide-1

GOAT: Ghrelin O-acyltransferase
GR : Glucocorticoïdes récepteur
GREs : Glucocorticoïdes response elements

HHS: Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HSP: Heat Shock Proteins

IF: Facteur intrinsèque
IKK β : Inhibitor of κ B kinase β
Insr/IR: Insuline récepteur
I κ B α : Inhibitor of κ B α

LBD : Ligand-Binding Domain
LH : Aire hypothalamique latérale

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MC3R: Melanocortin 3 receptor
MC4R: Melanocortin 4 receptor
MCH: Melanin concentrated hormone
MDD B9: Methyl donor deficiency B9
MDD: Methyl donor deficiency
MSH: Melanocyte stimulating hormone
MTHFD1: Méthylènetétrahydrofolate synthétase 1
MTHFD2: Méthylènetétrahydrofolate synthétase 2
MTHFR : Méthyléntétrahydrofolate réductase

NC : Non carencé
NC B9: Non carencé B9
NF κ B: Nuclear factor κ B
NPY: Neuropeptide Y
NPYR : Neuropeptide Y récepteur
NTD : Anomalies du tube neural
NTS : Noyau du tractus solitaire

OX : Orexine

POMC : Protiomélanocortine

PP2Ac : Protein phosphatase 2Ac

PVH : Noyau Paraventriculaire

PYY : Peptide tyrosine-tyrosine

SAH: S-adenosyl homocysteine

SAM: S-adénosyl méthionine

Shh: Sonic Hedghog

SHMTs: Sérine hydroxymethyl transférase

SNC : Noyau suprachiasmatique

SOD : Superoxide dismutase

SON : Noyau supraoptique

TCb1R : Récepteur transcobalamine 1R

TRH : Tirotrrophin-releasing hormone

Avant-propos

Autrefois il était admis que les maladies étaient causées par des organismes infectieux et leurs toxines ; c'est la théorie des germes (Louis Pasteur 1822-1895, Robert Koch 1843-1902). Ainsi, des études ont identifié les organismes responsables de l'Anthrax, la Malaria, la Tuberculose, le Choléra, la Lèpre et la Diphtérie. D'autres maladies comme le Scorbut et le rachitisme étaient aussi considérées comme étant d'origine infectieuse.

Dans les Indes orientales néerlandaises, Christiann Eijkman (1858-1930) a observé chez les poulets nourris de riz une polynévrite, l'équivalent du Béribéri chez l'humain et a conclu à tort que l'amidon du riz véhicule les toxines. Gerrit Grijns (1865-1944) a poursuivi les travaux amorcés par Eijkman et a prouvé que le Béribéri est en réalité dû au manque de composants vitaux dans l'alimentation, c'est-à-dire une carence nutritionnelle.

Dans les années 90, des études ont montré que l'alimentation maternelle pendant la grossesse pouvait augmenter le risque de survenue de diverses pathologies à l'âge adulte, augmenter la prévalence des maladies coronariennes et de l'obésité. Ces études soutiennent la théorie du « fetal programming », connue comme « l'hypothèse de Barker »

Les besoins nutritionnels augmentent durant la grossesse, en raison de l'augmentation des demandes métaboliques de la mère mais aussi du développement du placenta et du fœtus. Cette augmentation des besoins concerne la majorité des micronutriments tels que les vitamines, et notamment les vitamines du groupe B (B9, B12...).

I-Synthèse bibliographique

I-Développement du système nerveux central

1-Mise en place du système nerveux central

La vie prénatale comprend la période embryonnaire qui dure jusqu'à la 8^{ème} semaine post-ovulatoire et la période fœtale qui s'étend jusqu'à la naissance.

La majorité des structures du corps se mettent en place durant la période embryonnaire. A la fin de cette période, l'embryon mesure approximativement 30 mm de long et pèse 2-2,7g. Il possède déjà plus de 90% des structures du corps adulte (O'Rahilly, 1979). La période fœtale quant à elle est caractérisée par la consolidation, la réorganisation et la maturation des structures préétablies.

1-A-La période embryonnaire

C'est le passage d'un œuf fertilisé à un organisme entier. Elle comprend la formation du zygote, sa segmentation lors de la descente dans les trompes qui a lieu pendant la 1^{ère} semaine, ainsi que l'implantation dans la paroi utérine durant la 2^{ème} semaine (Boyd and Hamilton, 1960).

Cette étape correspond à une succession de divisions cellulaires qui aboutissent à une augmentation du nombre de cellules sans augmentation de volume. L'embryon mesure de 0,1 à 0,2 mm à la fin de cette période. A 3 semaines post-fertilisation, a lieu la gastrulation correspondant à la mise en place des feuillettes, et des territoires embryonnaires et de la chorde. A partir de ce stade aura lieu l'induction neurale et la mise en place des mécanismes de neurulation. A 3 semaines et demi avec l'apparition de la flexion mésencéphalique, les 3 parties majeures (prosencephale, mésencéphale et rhombencéphale) du cerveau sont détectables dans les parois du sillon neural ouvert (figure 1B). Après la fusion des plis neuronaux à 4 semaines de développement, le diencéphale et le télencéphale médian deviennent détectables (figure 1C). A 5 semaines du développement, les 5 subdivisions majeures du cerveau sont identifiables : télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale, et myélocéphale (figure 2). A ce stade, on peut également mettre en évidence des mouvements fœtaux.

A 6 semaines de développement, la frontière entre le diencéphale et le télencéphale est transgressée partiellement puis complètement par l'éminence médiale. Elle appartient topographiquement au télencéphale. La division caudale du cerveau est constituée de neuromères. Les noyaux des nerfs crâniens (somatiques-viscéraux afférents et efférents)

conduisent à la complexification du cerveau postérieur. Le développement et la complexité de cette région survient à 8 semaines. A ce stade, le cerveau ressemble déjà à celui du nouveau-né et suggère un début précoce d'activité fonctionnelle (O'Rahilly and Müller, 2008) .

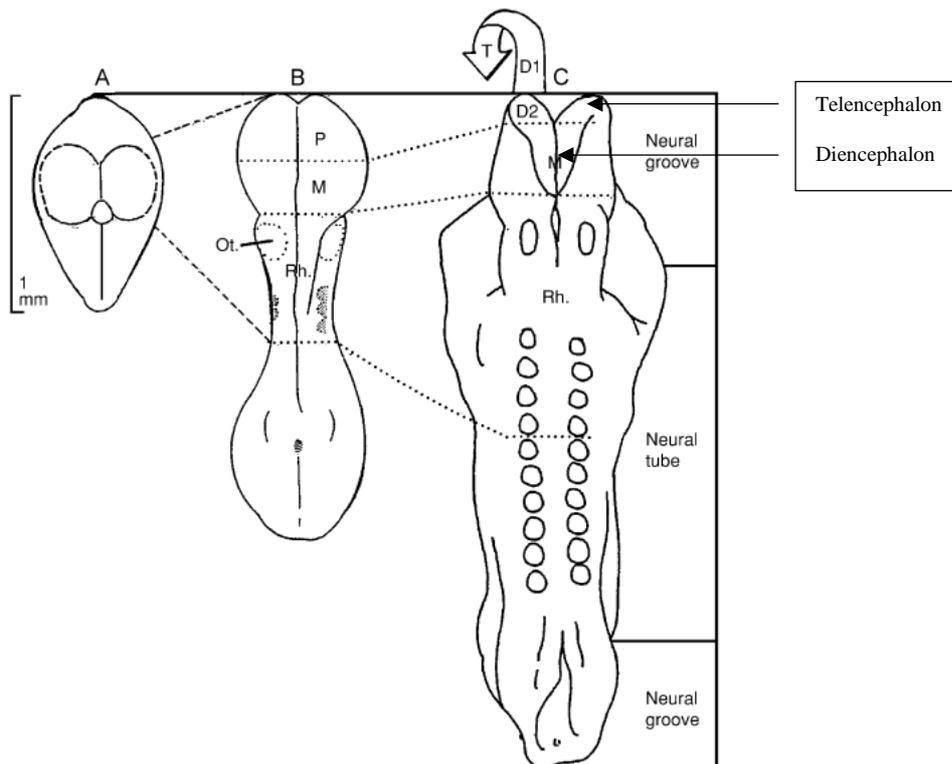


Figure 1: Le développement précoce du tube neural. Vue dorsale d'embryons reconstruits.

A : L'apparition de sillons neuronaux chez un embryon de 1mm. B : Identification des 3 parties majeures du cerveau à 2mm. C : Fusion des plis neuraux et identification du diencéphale et télencéphale à 3mm (O'Rahilly ; 1979).

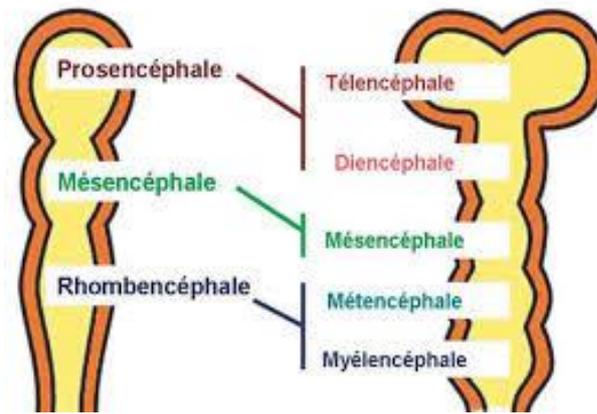


Figure 2: Les 5 importantes subdivisions du cerveau à 5 semaines de développement embryonnaire (Douira-Khomsî et al., 2009).

1-B-La période foetale

Durant cette période, l'embryon ne subit pas de modifications anatomiques majeures mais plutôt une maturation des structures déjà existantes. On note une croissance avec augmentation de la taille du fœtus et des organes, particulièrement le poids du cerveau qui augmente d'environ 40 fois entre la fin de la période embryonnaire et la naissance (O'Rahilly and Müller, 2008).

La période post-natale est caractérisée par des événements régressifs, comme la mort cellulaire, le « pruning » des axones et l'élimination des synapses qui sont nécessaires pour le raffinement des connexions intra-corticales déjà existantes, une arborisation dendritique et une augmentation de la synaptogenèse, donnant lieu à des connexions abondantes (Keunen *et al*, 2017). Ces événements sont cruciaux pour le développement et le fonctionnement du cerveau. Le pruning axonal permet d'éliminer les arborisations axonales exubérantes ou mal orientées, alors que d'autres plus appropriées du même neurone sont maintenues. La mort cellulaire neuronale a lieu à plusieurs stades du développement neural. Durant le développement du cerveau des vertébrés, 50% des neurones ne survivent pas à l'âge adulte. La majorité meurent par mort cellulaire programmée de type apoptose, entraînant la perte de la cellule et de toutes ses synapses. Cette mort cellulaire programmée semble avoir un rôle aussi au niveau de la différenciation des neurones immatures et des progéniteurs neuronaux

en division, durant les stades précoces du développement neural (Vanderhaeghen and Cheng, 2010).

Il existe deux types de pruning axonal : le pruning des branches terminales des axones courts et le pruning stéréotypé des axones longs. Le premier type implique l'intégration de facteurs environnementaux tels que l'activité neuronale, cependant ; lors du 2^{ème}, l'élimination des axones est génétiquement programmée (Riccomagno and Kolodkin, 2015).

Un exemple classique du pruning axonal court dans le système nerveux central en développement est le raffinement qui se produit dans le circuit de fibres grimpantes du cervelet. Ce processus est majoritairement dépendant de l'activité neuronale (Mariani and Changeux, 1981).

Concernant le pruning stéréotypé, on cite l'exemple du pruning hippocampo-septal, où les cellules pyramidales de CA1 (Corne d'Ammon, zone 1) envoient des axones au septum médial lors des stades prénatals tardifs. Une fois que ces axones ont développé des arborisations collatérales jusqu'au septum latéral, ils élaguent les projections originales jusqu'au septum médial, ne laissant la connexion hippocampo-septale de CA1 que sur le septum latéral (Bagri et al., 2003).

2-Mécanisme de la neurulation

La neurulation des vertébrés est un processus morphogénique complexe qui requière la coordination de plusieurs cellules ainsi que d'évènements moléculaires. Elle est régulée par le programme neurogénique qui comprend plus de 300 gènes exprimés de manière séquentielle très précise chez les mammifères.

2-A. La neurulation primaire

Elle a lieu après l'induction de la plaque neurale par les neuromédiateurs de la chorde libérés au niveau dorsal. Elle correspond à une série de déformations et de mouvements tissulaires qui convertissent le neuroépithélium plat présent à la surface de l'embryon en un tube intérieurisé dans l'embryon (figure 3A).

Ce mécanisme comprend plusieurs étapes distinctes. En premier la plaque neurale s'épaissit dans l'axe dorso-ventral qui est perpendiculaire aux axes antéro-postérieurs et médio-latéral de l'embryon et s'accompagne d'une augmentation de la hauteur apico-basale des cellules ectodermiques neuroépithéliales. En même temps, les bords latéraux de la plaque commencent à converger vers la ligne médiane dorsale pour compléter la fermeture de la plaque neurale. Cette convergence et extension de la plaque neurale est accompagnée par une intercalation cellulaire médio-latérale qui peut se produire par l'intermédiaire d'un remodelage jonctionnel polarisé ou bien par le biais de l'activité protrusive polarisée. De plus, les intercalations radiales transforment la plaque neurale de 2-3 couches cellulaires en un tube neural avec une couche cellulaire pseudo-stratifiée (Copp and Greene, 2013; Nikolopoulou et al., 2017; Sokol, 2016; Vijayraghavan and Davidson, 2017).

2-B. La neurulation secondaire

La neurulation secondaire (figure 3B) concerne la formation du tube neural caudal (secondaire) à hauteur du 31^{ème} somite dans la région terminale de la moelle épinière (DeSesso et al., 1999). Elle commence après la fermeture du neuropore caudal qui marque la fin de la neurulation primaire. Le tube neural secondaire se développe par la condensation d'une ligne primitive de cellules mésenchymateuses appelée l'éminence. Elle s'étend dans le bourgeon caudal. Lorsque la ligne primitive régresse caudalement, une partie de l'ectoderme de la ligne médiane est incorporée à l'éminence caudale pour former une tige compacte composée de cellules épithéliales très adhérentes, polarisées de manière apico-basale (Eibach et al., 2017; Yang et al., 2014).

En plus des cellules qui constituent le tube neural, d'autres tissus comme la crête neurale, l'ectoderme non nerveux et le mésoderme axial et paraxial participent à la neurulation en effectuant une migration individuelle ou collective (Sokol, 2016).

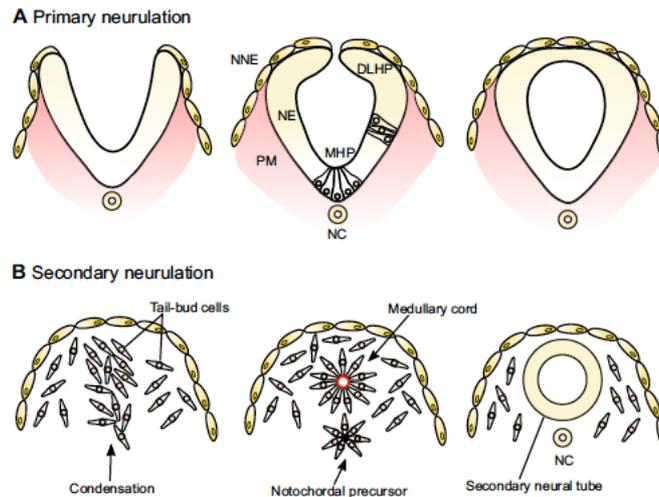


Figure 3: Schéma simplifié représentant le phénomène de neurulation (Nikolopoulou et al., 2017).

La fermeture du tube neural peut être affectée par des forces provenant de cellules neuroépithéliales elles-mêmes (forces internes) et celles provenant de l'extérieur de la plaque neurale (forces externes). La formation du tube neural est aussi régulée par un certain nombre de facteurs inducteurs (Myosine II non-musculaire, microfilaments d'actine, ...) sécrétés par le mésoderme sous-jacent permettant ainsi le couplage mécanique (Sokol, 2016).

3-Développement de l'hypothalamus

L'hypothalamus dérive de la partie ventrale antérieure du tube neural. Il se situe au-dessus de l'hypophyse. Anatomiquement et fonctionnellement, l'hypothalamus est complexe. Il se caractérise par une pléthore de noyaux organisés sous forme d'une mosaïque et interagissant entre eux pour assurer l'ensemble des fonctions neurovégétatives.

Son développement est initié au moment de la formation de la plaque neurale. La structuration globale du complexe plaque neurale/tube neural, comprenant la formation du futur hypothalamus se fait sous l'action de morphogènes diffusibles. Ceux-ci sont d'abord exprimés en organisant les tissus mésodermiques/endodermiques. Ensuite, les tissus axiaux comprenant la notochorde et le mésoderme préchordal, produisent des signaux diffusibles qui induisent et structurent la plaque neurale/tube neural sous-jacent (Burbridge et al., 2016).

Parmi ces signaux se trouvent des facteurs de signalisation connus pour agir sur le développement.

Le premier facteur intervenant dans le développement de l'hypothalamus est la signalisation Wnt/antagonisme Wnt, qui joue un rôle important dans la régulation des facteurs de transcription, tels que le facteur Six3 de l'homéodomaine maintenu dans certaines parties de l'hypothalamus y compris les régions tubéreuses pendant la période prénatale.

Brièvement, les antagonistes Wnt dérivent de la plaque préchordale et du mésoderme préchordal aux stades précoces. La signalisation Wnt/antagonistes Wnt joue un rôle itératif dans le devenir de l'hypothalamus.

Elle intervient dans la régionalisation de la plaque neurale nouvellement induite le long de son axe antéro-postérieur. Elle joue un rôle dans la promotion des identités antérieures et dans la promotion du devenir de l'hypothalamus. Les antagonismes Wnt sont nécessaires pour que les cellules de la ligne médiane/ventrale adoptent des identités hypothalamiques. Cette signalisation joue également un rôle dans l'affinement de l'identité antéro-postérieure une fois que la plaque du plancher hypothalamique s'est formée (Burbridge et al., 2016; Pearson and Placzek, 2013).

D'autres facteurs interviennent également, tels que Sox2 et Sox3 qui sont indispensables pour l'activation et le maintien de Shh (Sonic Hedgehog) requis pour la formation de la ligne médiane ventrale diencéphalique rostrale dont dérive la ligne médiane ventrale hypothalamique ou encore les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) qui jouent le rôle d'antagonistes de Shh (Burbridge et al., 2016).

La formation de l'infundibulum (une excroissance de la plaque du plancher hypothalamique tubéreux qui se projette ventralement et se place près de l'hypophyse antérieure en formation) est un événement important dans le développement de l'hypothalamus. L'infundibulum donne naissance à l'éminence médiane et l'hypophyse pituitaire, des structures qui sont importantes pour les fonctions hypothalamiques. Elles servent en tant que points d'intégration entre l'hypothalamus et les signaux périphériques.

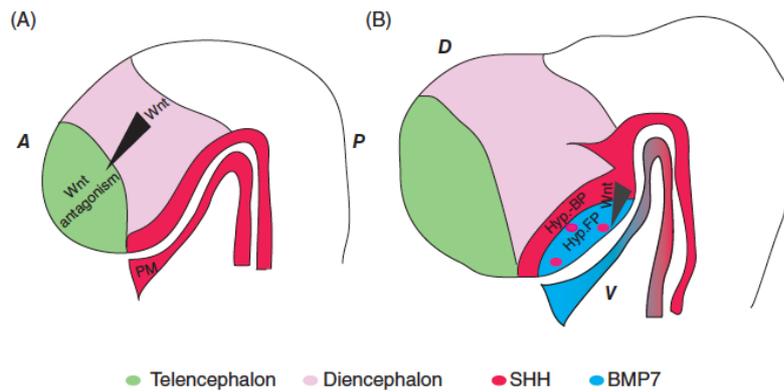


Figure 4: Les facteurs de signalisation dans l'induction hypothalamique et la régionalisation
 A : dans le tube neural précoce, Les antagonistes Wnt favorisent le devenir du tube neural/proencéphalique en réprimant la signalisation Wnt. B : La signalisation BMP dans le mésoderme préchordal réprime shh dans le plancher hypothalamique. Shh : Sonic Hedgehog, BMP : Bone Morphogenetic Proteins. (Schéma adapté de Burbridge et al., 2016).

Avant la formation complète de l'infundibulum, a lieu la structuration dorso-ventrale de l'hypothalamus. Les progéniteurs neuronaux acquièrent différentes identités transcriptionnelles en fonction de leur position dorsoventrale dans le tube neural mais aussi du temps d'exposition aux signaux de remodelage. Les programmes de transcriptions des progéniteurs neuronaux déterminent les types cellulaires matures qui seront produits par chaque progéniteur, ce qui aboutit à une carte spatiale de sous-types neuronaux distincts. Ceci constitue la première étape de l'assemblage des circuits neuronaux fonctionnels. Puis, les progéniteurs obtiennent les informations spatiales leur permettant d'établir le profil d'expression du bon facteur de transcription sous l'intervention des glycoprotéines secrétées, Shh, Wnts, BMPs. Ces facteurs de transcription jouent également un rôle dans la sélection de l'identité neuronale et des neurotransmetteurs, dans la migration, la survie et la croissance axonale. Ils interviennent aussi dans le choix de la lignée hypothalamique. La migration cellulaire participera à l'arrangement final des noyaux hypothalamiques contribuant à leur organisation finale (Burbridge et al., 2016; Liu and Niswander, 2005).

L'hypothalamus est constitué de nombreux noyaux (figure 5) qui sont des regroupements fonctionnels et anatomiques de neurones : le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire

(PVH), le noyau supraoptique (SON), le noyau suprachiasmatique (SCN), le noyau dorsomédian (DMH), le noyau ventromédian (VMH) et l'aire hypothalamique latérale (LH), décrits dans la partie 5-1 : les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire, page 39.

L'aire préoptique est originaire du télencéphale, tandis que les autres parties de l'hypothalamus dérivent du diencéphale (Yi et al., 2017).

Des anomalies de développement de l'hypothalamus ou son dysfonctionnement pourraient entraîner des défauts de croissance, une obésité, un diabète, une hypertension, etc. Ces anomalies développementales sont associées non seulement à des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer), mais aussi à des maladies neurodéveloppementales tel que l'autisme (Qin et al., 2018).

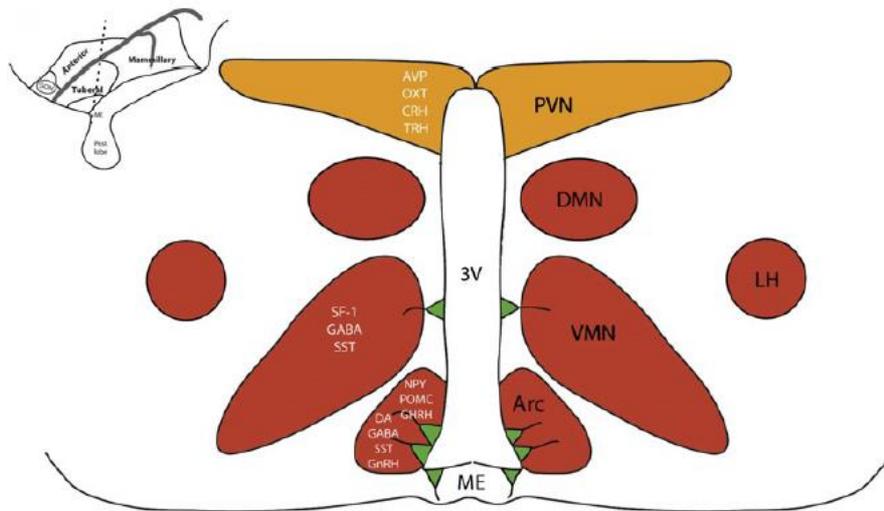


Figure 5: Schéma illustrant l'organisation de l'hypothalamus adulte.

Vert : Tanocytes dans l'éminence médiane, rouge : noyaux tubéreux, orange : noyaux antérieurs. ARC : noyau arqué, VMH : noyau ventromédian, DMH : noyau dorsomédian, PVN/PVH : noyau paraventriculaire, LH : aire hypothalamique latérale, ME : éminence médiane (Pearson and Placzek, 2013).

4-Rôles de l'hypothalamus

L'un des principaux rôles de l'hypothalamus est sa fonction neuroendocrine car il fait la liaison entre le système endocrinien et le système nerveux via un système de peptide hypophysiotrope au niveau de l'adénohypophyse. L'hypothalamus sécrète également 2 hormones (ocytocine et ADH) qui sont libérées au niveau de la neurohypophyse, formée principalement d'extensions axonales hypothalamiques. Principal centre de régulation des fonctions physiologiques, il régule toutes les fonctions végétatives, maintient l'homéostasie et intègre les réponses motrices viscérales et somatiques. L'hypothalamus constitue un capteur et un centre intégrateur de l'activité corporelle : il intervient dans le contrôle d'une large gamme de fonctions comportementales comme la reproduction, la thermorégulation, le contrôle du rythme circadien ou encore la faim par la sécrétion d'hormones. Il intègre ainsi les différents signaux permettant la prise alimentaire, qu'ils soient nerveux, comme ceux provenant de la distension de la poche gastrique, ou hormonaux comme la production d'insuline, de leptine et de ghréline (Qin et al., 2018).

4-1-Rôle de l'hypothalamus dans la prise alimentaire et la dépense énergétique

Nous nous intéresserons principalement au rôle de l'hypothalamus dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

L'hypothalamus est l'une des plus importantes parties du cerveau impliquée dans le contrôle de la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Gali Ramamoorthy et al., 2015).

Le noyau arqué (ARC) constitue le centre d'intégration des signaux métaboliques périphériques. Il est localisé près du 3^{ème} ventricule et de l'éminence médiane, un organe riche en capillaires fenêtrés conduisant à la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce qui facilite le passage d'hormones périphériques et de signaux nutritifs ainsi que leur détection par les neurones de l'ARC. Ainsi l'ARC intègre les signaux métaboliques hormonaux et nutritionnels de la circulation périphérique mais aussi centrale ce qui permet de générer une réponse coordonnée en retour (Timper et Bruning., 2017).

4-2-Les hormones périphériques intervenants dans la régulation de la prise alimentaire

L'axe intestin-cerveau est une voie de communication bidirectionnelle entre l'intestin et le cerveau, importante pour la régulation de l'équilibre énergétique, faisant appel à des signaux intestinaux neuronaux et hormonaux intégrés, dans les différentes zones cérébrales orexigènes et anorexigènes.

Les signaux mécaniques et chimiques induits par l'ingestion de nutriments stimulent la sécrétion intestinale de peptides qui, à leur tour, informent le système nerveux par l'action paracrine à travers la voie vagale et la colonne vertébrale ou par les voies endocriniennes. Dans une boucle de rétroaction, le système nerveux génère une réponse pour maintenir l'équilibre énergétique.

4-2-1-Les signaux anorexigènes à court terme

De nombreuses cellules endocriniennes gastro-intestinales produisent et sécrètent des hormones de la satiété supprimant la faim. Il s'agit principalement de la cholécystokinine (CCK), du peptide tyrosine tyrosine (PYY) et du glucagon-like peptide (GLP-1) (figure 6). D'autres hormones interviennent également dans la signalisation anorexigène à court terme : l'oxyntomoduline, le facteur de croissance 19 des fibroblastes et de l'apolipoprotéine AIV (apoAIV)(Rui, 2013).

La cholécystokinine (CCK) est un peptide gastro-intestinal sécrété par les cellules duodénales et jéjunales en réponse à la graisse et aux protéines apportées par l'alimentation, au niveau du système entérique ainsi que dans le système nerveux central.

Ce peptide joue un rôle dans la stimulation de la sécrétion pancréatique exocrine et dans la synthèse enzymatique. Il intervient également dans la contraction de la vésicule biliaire et le retard de la vidange gastrique (Matafome et al., 2017).

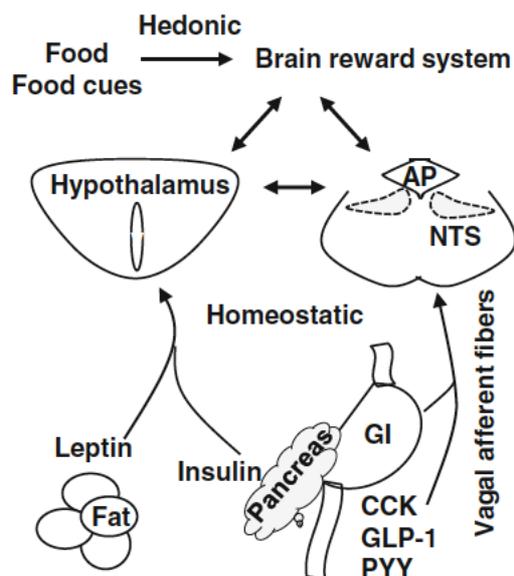


Figure 6: Régulation de la prise alimentaire par les circuits neuronaux hédoniques et homéostatiques.

CCK : Cholecystokinine, GLP-1 : glucagon like peptide 1, PYY : peptide tyrosine tyrosine, GI: Gastrointestinal, NTS: Noyau du tractus solitaire (Rui, 2013).

La principale forme de CCK dans l'organisme est CCK-8 qui se lie au récepteur CCK-1 (CCK-1R) dominant dans le tractus gastro-intestinal et au récepteur CCK-2 (CCK-2R) principalement localisé au niveau du cerveau.

Des études ont montré que les effets anorexigènes de CCK-8 sont médiés par l'activation de son récepteur CCK-1R sur les fibres nerveuses afférentes de l'intestin vagal par des voies paracrines, qui à leur tour projettent vers le noyau du tractus solitaire (NTS), puis vers le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (Monteiro and Batterham, 2017).

CCK traverse la barrière hémato-encéphalique et peut directement atteindre le tronc cérébral et les noyaux à neuropeptide Y (NPY)/Agouti-related protein (AgRP) dans le noyau dorsomédian (DMH) de l'hypothalamus par la circulation systémique (López et al., 2007).

Le peptide tyrosine tyrosine (PYY) est produit par les cellules endocriniennes "L" tapissant l'intestin grêle et le colon. Sa libération est précoce en phase postprandiale et proportionnellement aux calories ingérées. Elle est stimulée par les nutriments,

particulièrement les glucides et les lipides. Le PYY agit via les voies vagues afférentes au noyau du tractus solitaire. Ses effets sont médiés par les récepteurs au NPY appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Le PYY présente une haute affinité au récepteur Y2, ainsi il inhibe la prise alimentaire et réduit l'apport énergétique. Quand il est administré par voie périphérique, le PYY inhibe l'expression de NPY et d'AgRP (via le récepteur Y2 présent sur les neurones orexigènes de l'hypothalamus, ce qui induit la désinhibition des neurones adjacents exprimant la proopiomélanocortine (POMC) et favorise les phénomènes de satiété. Au niveau central, le PYY a des affinités équivalentes pour les récepteurs Y1 et Y2 et donc peut exercer des effets divergents sur le comportement alimentaire (Korner and Leibel, 2003; Monteiro and Batterham, 2017) . =

Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) est exprimé dans les cellules L intestinales, principalement dans le jéjunum, l'iléon, et le colon, ainsi que dans les neurones du tronc cérébral et les cellules α -pancréatiques. C'est un important signal de satiété libéré dans les 15 min suivant l'ingestion de nutriments, avant qu'ils atteignent l'intestin grêle distal pour stimuler directement les cellules L. GLP-1 joue un rôle physiologique dans l'inhibition de la prise alimentaire à court terme via l'action paracrine (Bauer et al., 2016).

GLP-1 sécrété par voie intestinale se dégrade facilement. Seulement 25% atteignent la circulation hépatoportale et moins de 10% atteignent la circulation systémique (Holst, 2007).

Il exerce ses effets anorexigènes en se liant au récepteur GLP-1 (GLP-1R). Principalement, il stimule la sécrétion d'insuline juste après le repas, il est responsable de 60% de la libération d'insuline postprandiale intervenant dans la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique (Mikulášková et al., 2016) .

Au niveau central, GLP-1 agit dans des zones spécifiques de l'hypothalamus inhibant la prise alimentaire en inhibant particulièrement les neurones à NPY/AgRP. Le récepteur GLP-1R est largement exprimé dans les noyaux ARC, VMH, PVN de l'hypothalamus mais aussi dans les neurones du tronc cérébral ainsi que dans les tissus périphériques, comme le pancréas et le tractus gastro-intestinal (Mikulášková et al., 2016).

4-2-2-Les signaux anorexigènes à long terme

Il s'agit principalement de **la leptine** et de **l'insuline** qui traversent la barrière hémato-encéphalique pour agir au niveau de l'hypothalamus, particulièrement sur les neurones orexigènes et anorexigènes dans l'ARC (figure 7).

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes (tissu adipeux blanc) proportionnellement à la masse grasse. Sa libération est stimulée en période de disponibilité d'éléments nutritifs et diminuée en période de demande d'énergie.

La leptine inhibe la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique et, indépendamment de ses effets anorexigènes, elle intervient dans le métabolisme du glucose et des lipides (van Swieten et al., 2014).

Les récepteurs à la leptine nécessaires pour exercer ses effets sont largement exprimés au niveau du cerveau, particulièrement au niveau des noyaux ARC, DMH et VMH de l'hypothalamus. Ils sont également mis en évidence dans les noyaux PVN et LH, mais le taux d'expression est plus faible (Münzberg and Morrison, 2015).

La leptine agit sur les neurones orexigènes et anorexigènes de l'hypothalamus pour contrôler la balance énergétique. La proximité du noyau ARC par rapport à la barrière hémato-encéphalique semi-perméable fait de ce noyau une zone sensible à l'action de la leptine. En effet, les neurones anorexigènes POMC/CART (Cocaine-and-amphetamine-regulated transcript) et orexigènes NPY/AgRP sont les cibles directes de la leptine. Elle active les neurones à POMC/CART et stimule la sécrétion de l' α -MSH (Melanocyte stimulating hormone), et inversement, elle inhibe les neurones à NPY/AgRP et réduit la libération de NPY, AgRP et du Gaba (acide γ -amino-butérique). Dans le noyau PVN, la leptine conduit à l'activation des TRH (tirotophin-releasing hormone), CRH (corticotrophin-releasing hormone) et ocytocine anorexigènes, alors qu'elle inhibe les neurones orexigènes MCH (Melanin concentrated hormone) et OX (orexine) dans le LH (Harwood, 2012).

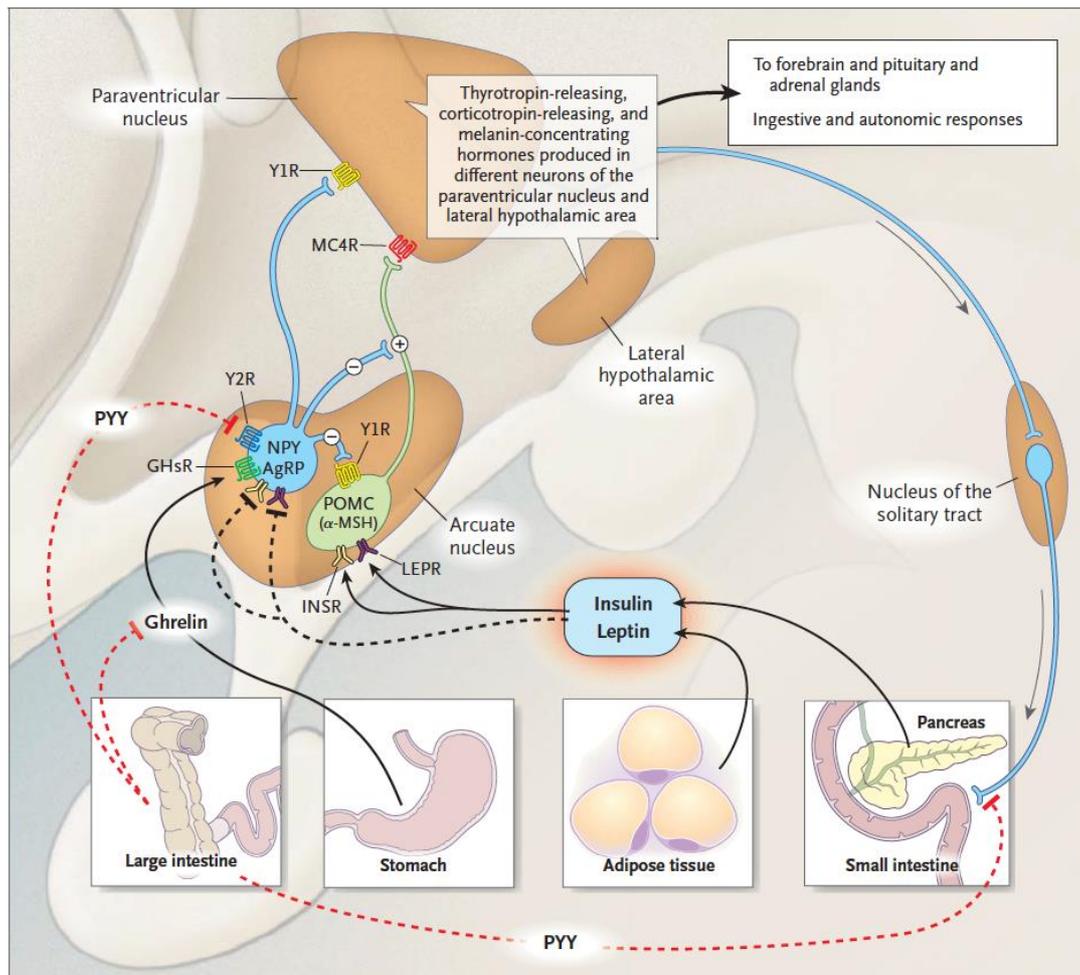


Figure 7: Interactions entre les hormones périphériques et les voies neurales régulant la prise alimentaire et la masse grasse

PYY: peptide YY, LepR: Leptin receptor, INSR: Insulin receptor, POMC: pro-opiomelanocortin, GhSR: Ghrelin secretagogue receptor, Y1R: NPY Receptor1, Y2R: NPY receptor 2, MC4R: Melanocortin 4 receptor (Korner and Liebel., 2003).

L'**insuline** est aussi un signal d'adiposité secrété par les cellules pancréatiques β . Ses concentrations plasmatiques sont en corrélation avec la masse adipeuse. La sécrétion d'insuline augmente rapidement après le repas, exerçant un effet anorexigène via le système nerveux central. Les récepteurs à l'insuline sont répandus dans le cerveau et présents dans les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (ARC, DMH, PVN) (Benoit et al., 2002).

Dans l'hypothalamus, les effets de l'insuline sont médiés par les neurones à NPY/AgRP et les neurones à POMC/CART dans l'ARC. L'insuline diminue la prise alimentaire en inhibant les neurones à NPY/AgPR et en stimulant les neurones à POMC/CART (López et al., 2007).

La régulation de la prise alimentaire sur le court terme concerne la prévention de « trop manger » pendant les repas et sur le long terme c'est plutôt le maintien des quantités normales de réserve d'énergie sous forme de graisses dans le corps.

Dans la régulation à court terme, les structures cérébrales contrôlent l'apport d'un repas, concernant son volume, son contenu énergétique et sa durée. Dans la régulation à long terme, le système nerveux central reçoit de nombreuses impulsions et signaux périphériques, particulièrement du tractus gastro-intestinal et du tissu adipeux en réponse à un équilibre constamment altéré (Lv et al., 2018).

4-2-3-Les signaux orexigènes

Il s'agit principalement de la **ghréline**, une hormone agissant via le récepteur secrétagogue de l'hormone de croissance (GHS-R1a) abondant dans l'hypothalamus, particulièrement dans le noyau ARC, DMH et PVH. Elle stimule la prise alimentaire via la production de NPY et d'AgRP au niveau du noyau arqué.

La ghréline est essentiellement produite par les cellules de la glande oxyntique gastrique (estomac), les cellules de type X/A chez les rongeurs ou les cellules de type P/D1 chez l'Homme. De faibles niveaux de production de la ghréline sont également détectés au niveau de l'intestin, pancréas, rein, ovaire, testicules et de l'hypothalamus (Cowley et al., 2003).

Elle est présente dans le plasma humain sous deux formes : la forme désacylée et la forme active ; la ghréline acylée synthétisée sous l'action de l'enzyme Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) qui transfère un groupement acyle des acides gras au résidu 3-Serine de la ghréline.

Cette hormone stimule l'appétit et la prise alimentaire indépendamment de la GH (Hormone de croissance) via son récepteur spécifique, GH secretagogue receptor 1a (GHSR1a). De plus, des études ont montré que le complexe : ghreline/GOAT/GHSR est impliqué dans la régulation du métabolisme énergétique et son adaptation aux modifications du bilan énergétique.

Pour exercer son effet orexigène, la ghréline atteint l'hypothalamus de 3 manières différentes : via la voie humorale, via les afférences vagales et via sa production et sécrétion locale au niveau de l'hypothalamus (Lu et al., 2018).

La forme acylée de la ghréline se lie au GHSR1a et induit la libération de l'hormone de croissance (GH) dans les cellules somatotropes de l'hypophyse. A travers le nerf vagal ou directement au niveau central, la ghréline module l'activité des neurones à NPY/AgRP et POMC dans le noyau ARC. Sa liaison au GHSR1a stimule la sécrétion des neuropeptides orexigènes (NPY et AgRP) via l'augmentation de la transcription des gènes et uniquement en présence de glucocorticoïdes, mais aussi inhibe la production de neuropeptides anorexigènes (α -MSH issue du clivage de la POMC) (Mihalache et al., 2016 ; Korner and Leibel, 2003; Monteiro and Batterham, 2017).

Les récepteurs à la ghréline sont également exprimés dans les neurones du LH, du tractus solitaire du tronc cérébral et dans la zone apostrema, suggérant une implication de ces zones cérébrales dans l'effet orexigène de la ghréline (Matafome et al., 2017).

4-3-Rôle des glucocorticoïdes dans la régulation de la prise alimentaire

Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol. Elles sont produites par la glande surrénale sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). Les glucocorticoïdes interviennent dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique (figure 8). Ils exercent leurs effets en se liant et activant leur récepteur (GR). Ceci déclenche une cascade d'événements donnant lieu à la translocation nucléaire de GR. Dans le noyau, GR modulera l'expression de gènes cibles soit en tant que facteur de transcription se liant aux séquences « glucocorticoid response elements (GREs) » présentes dans les promoteurs de certains gènes tels que, l'AgRP et le NPY ou en prenant le rôle d'inhibiteur et d'activateur transcriptionnel en se liant à d'autres facteurs de transcription comme AP1 (Activating Protein 1) ou NFkB (nuclear factor kB) (Gali Ramamoorthy et al., 2015).

En l'absence de glucocorticoïdes (ligand), les récepteurs GR dans le cytoplasme de la cellule sont liés à des protéines de choc thermique (HSP : Heat Shock Protein), particulièrement HSP90, HSP70 et HSP40, qui sont dites « protéines chaperones ». HSP70 reconnaît les molécules de GR nouvellement synthétisées et se lie au domaine de liaison (LBD : Ligand-Binding Domain) de GR pour former un complexe. Ce dernier permet la liaison de dimères de HSP90 tout en augmentant l'affinité de GR pour le ligand. D'une part, ce complexe facilite la liaison du ligand et participe à la translocation de GR dans le noyau, d'autre part, il module l'activation ou la répression transcriptionnelle de gènes cibles (Chen et al., 2017).

Dans les conditions physiologiques normales, les glucocorticoïdes interviennent dans la régulation de la prise alimentaire. L'appétit chez l'Homme et les animaux suit les changements de niveaux stéroïdes surrénaux. L'augmentation de l'appétit corrèle avec la surproduction de glucocorticoïdes (Bazhan and Zelena, 2013).

Les glucocorticoïdes sont des hormones orexigènes qui agissent sur le système nerveux central et stimulent la prise alimentaire. Ils agissent principalement sur les neurones à NPY/AgRP de l'ARC en stimulant leur expression au niveau de l'hypothalamus mais ils inhibent également la libération de la CRH qui, à l'inverse, est anorexigène et inhibe la production de NPY/AgRP (Ans et al., 2018).

De plus, les glucocorticoïdes ont des effets anoréxigènes (effets secondaires). Ils stimulent les neurones à NPY/AgRP mais, sous conditions de stress, leur expression est régulée différemment. Plus précisément, le stress réduit le nombre de cellules exprimant l'AgRP et le niveau d'ARNm d'AgRP dans l'ARC chez le rat. L'AgRP est l'antagoniste naturel du récepteur MC4R médiant les effets anoréxigènes de la mélanocortine. Ainsi, le stress induisant la diminution de l'expression des cellules à AgRP peut contribuer à l'inhibition de la prise alimentaire via l'activation du système à la mélanocortine (Liu et al., 2007) .

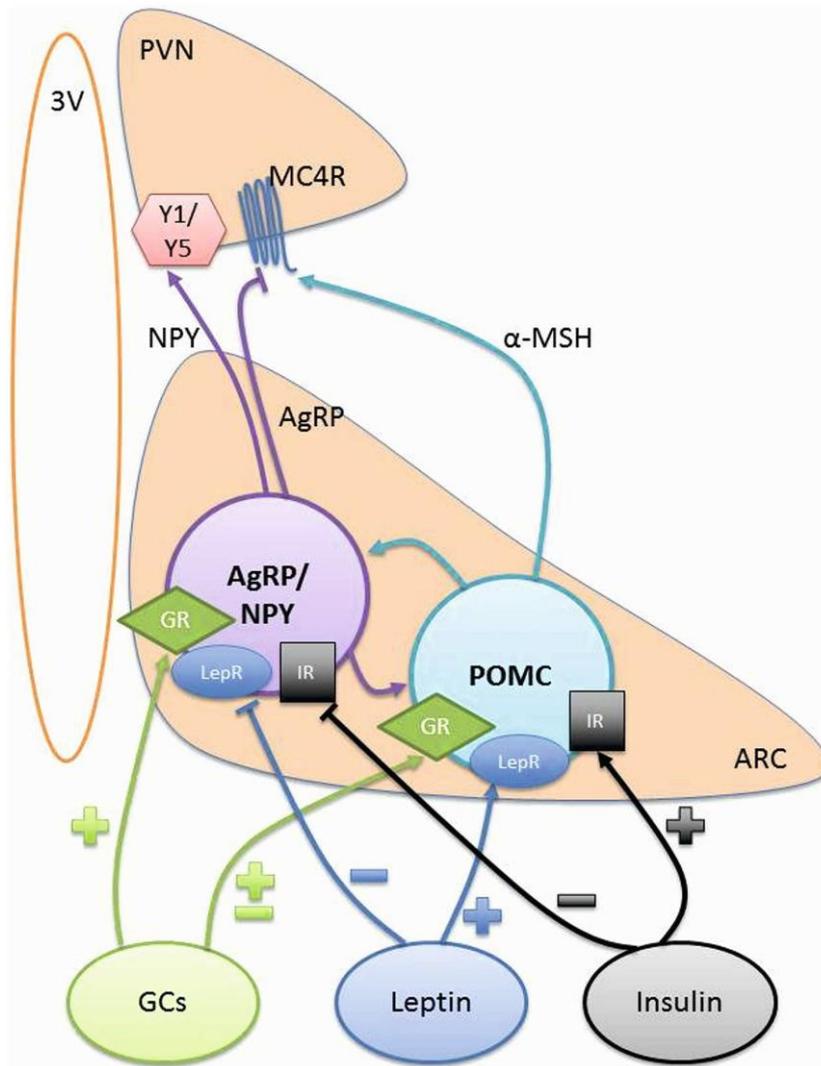


Figure 8: La signalisation hypothalamique contrôlant la balance énergétique

Gcs : glucocorticoïdes, GR : glucocorticoïdes receptor, IR : Insulin receptor, LepR : Leptin receptor (Liu et al., 2007).

5-Les régions du cerveau impliquées dans la régulation de la prise alimentaire

5-1-Les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire

Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire forment un réseau de circuits neuronaux interconnectés qui réagit aux changements de l'état énergétique en modifiant l'expression de neuropeptides spécifiques, entraînant des modifications de l'apport et de la dépense énergétiques.

5-1-1-Le noyau arqué (ARC)

L'Arc est considéré comme étant le principal centre hypothalamique du contrôle de l'alimentation. Il est situé entre le 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane. L'éminence médiane est un organe circumventriculaire dans lequel la barrière hémato-encéphalique est modifiée, permettant ainsi l'entrée de peptides et de protéines de la circulation périphérique (PYY, GLP-1, Leptine, Insuline) (López et al., 2007). Les populations Parvocellulaire et magnocellulaire de l'ARC expriment les neuropeptides orexigènes : NPY/AgRP et anorexigènes : POMC/CART clés dans la régulation du comportement alimentaire. Ce sont des neurones de premier ordre, intégrant les signaux métaboliques périphériques et, à leur tour, se projettent vers les neurones du second ordre dans d'autres régions hypothalamiques (PVN, VMH, LH) (Yu and Kim, 2012).

5-1-2-Le noyau paraventriculaire (PVN)

Le PVN intègre les signaux neuropeptidiques de différentes régions du système nerveux central, y compris de l'ARC et du tronc cérébral. Les neurones à CART/POMC originaires de l'ARC potentialisent la signalisation du neurotransmetteur inhibiteur GABA dans le PVN et réduisent l'appétit, tandis que les neurones à NPY/AgRP inhibent cette signalisation de GABA et à l'inverse stimulent la prise alimentaire (Cowley et al., 1999).

De plus, les neurones du PVN synthétisent et secrètent des peptides à effet catabolique, tels que la TRH, la CRH, la somatostatine, la vasopressine et l'ocytocine et contiennent des récepteurs MC3R et MC4R de la mélanocortine (Foster et al., 2010).

L' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) est un peptide anorexigène, produit par le traitement post-transcriptionnel (clivage) de la POMC. Ses effets (diminution de la prise alimentaire et stimulation de la dépense énergétique) sont médiés par sa liaison aux récepteurs

3 et 4 de la mélanocortine (MC3R et MC4R) dans les neurones du second ordre (Huszar et al., 1997).

5-1-3-Le noyau ventromédian (VMH)

Le VMH est considéré comme le centre de la satiété. Il reçoit principalement les projections des neurones à NPY/AgRP et CART/POMC du noyau ARC. Les neurones du VMH, projettent leurs axones vers les noyaux de L'ARC, DMH, LH, ainsi que les régions du tronc cérébral comme le noyau du tractus solitaire (Sternson et al., 2005).

Le VMH est considéré comme un noyau de réception pour les signaux périphériques ainsi que les signaux centraux. Les neurones du VMH présentent une grande abondance de récepteurs à la leptine, à la ghréline, aux œstrogènes, aux hormones thyroïdiennes et aux neuropeptides (Kalra et al., 1991).

5-1-4-Le noyau dorsomédian (DMH)

Le DMH, tout comme le VMH est considéré comme un centre d'intégration, traitant des informations provenant d'autres régions hypothalamiques (Kalra et al., 1991). Le DMH se trouve juste après le VMH et a des liens directs avec d'autres noyaux hypothalamiques (PVN et LH), ainsi qu'avec le tronc cérébral (Bellinger and Bernardis, 2002).

5-1-5-L'aire hypothalamique latérale (LH)

La LH est considérée comme le centre de la faim et de la satiété. Elle exprime MCH, qui est un peptide orexigène, ainsi que d'autres neuropeptides (galanine, dynorphine, CART) importants dans la régulation de la prise alimentaire. Ces neuropeptides sont exprimés par des populations cellulaires recevant des projections des neurones à NPY/AgRP et CART/POMC dans l'ARC (López et al., 2007).

De plus, la LH contient des neurones sensibles au glucose et exprime les récepteurs à la leptine (Bellinger and Bernardis, 2002).

Les neurones de la LH se projettent vers de nombreuses régions extra-hypothalamiques : le tronc cérébral, les noyaux pré-ganglionnaires sympathiques et parasympathiques, la moelle épinière, le locus coeruleus, le noyau du raphé médial, le noyau tubermammillaire et le cortex cérébral. Toutes ces régions jouent un rôle fondamental dans les différents aspects de la régulation de la prise alimentaire (Willie et al., 2001).

5-2-Les régions extra-hypothalamiques impliquées dans la régulation du comportement alimentaire

5-2-1-Le noyau du tractus solitaire (NTS)

Le tronc cérébral est une autre région du cerveau impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et la balance énergétique. Les signaux de satiété provenant du tractus gastro-intestinal sont intégrés au niveau du noyau du tractus solitaire à travers le nerf vague, le lien majeur entre l'intestin et le cerveau (Schwartz, 2000).

Le NTS est anatomiquement proche de l'apostrema (AP), il reçoit ainsi les signaux humoraux et neuronaux. Mais aussi, les projections du PVN indiquant qu'il existe une communication intime entre l'hypothalamus et le tronc cérébral (Ellacott et al., 2006).

5-2-2-Le thalamus

Le thalamus est le centre de référence pour une large gamme d'informations sensorielles provenant du corps. Particulièrement, le noyau ventral qui reçoit des entrées directes du noyau vague du tractus solitaire (Pribic et al., 2017).

De plus, le noyau paraventriculaire du thalamus est impliqué dans la perception hédonique, de la même manière que le noyau dorsomédian de l'hypothalamus, la matière grise, et le cortex préfrontal médial (Sewards, 2004).

5-2-3-Le système limbique

Les régions du cerveau liées à l'émotion, y compris l'hippocampe et l'amygdale, sont également impliquées dans la régulation du comportement alimentaire (Liu et al., 2014a).

L'hippocampe est connu pour son rôle dans la mémoire déclarative. Il a été démontré que ce type de mémoire influence la prise alimentaire (Higgs, 2008).

De même pour l'amygdale, des études montrent qu'elle est bien placée pour intégrer les signaux provenant de l'hypothalamus, du cerveau postérieur et du cortex afin de réguler la prise alimentaire (Coppin, 2016).

5-2-4-Le cortex frontal et temporal

Le cortex temporal est anatomiquement connecté au cortex préfrontal via le faisceau indécis. Ces deux régions sont responsables du fonctionnement cognitif, notamment l'évaluation de la

récompense, le maintien de la mémoire de travail et de l'attention, et participent au contrôle cognitif sur l'alimentation et les émotions (Gluck et al., 2017; Mohedano-Moriano et al., 2015).

5-2-5-Le noyau accumbens

Le noyau accumbens médie les caractéristiques de motivation primaire ou de récompense des stimuli naturels tels que la nourriture, l'eau et le sexe via le système dopaminergique (Salamone et al., 2005).

6-Régulation de la prise alimentaire au niveau central

Au niveau de l'hypothalamus, on distingue deux types de neurones dans l'ARC :

- les neurones orexigéniques, produisant le Neuropeptide Y (NPY), l'Agouti-related peptide (AgRP) et l'acide γ -aminobutyrique (GABA).

-Les neurones anorexigéniques exprimant la pro-opiomelanocortine (POMC) et la Cocain and amphetamin regulated transcript peptides (CART).

Les neurones anorexigéniques localisés au niveau de l'ARC se projettent principalement vers le noyau PVH, mais aussi LH et le tronc cérébral qui sont associés avec le contrôle de la balance énergétique. Les neurones orexigéniques localisés au niveau de l'ARC se projettent vers le PVH, DMH, LH, zone périfornicale et vers la zone préoptique médiale (Wu et al., 2009).

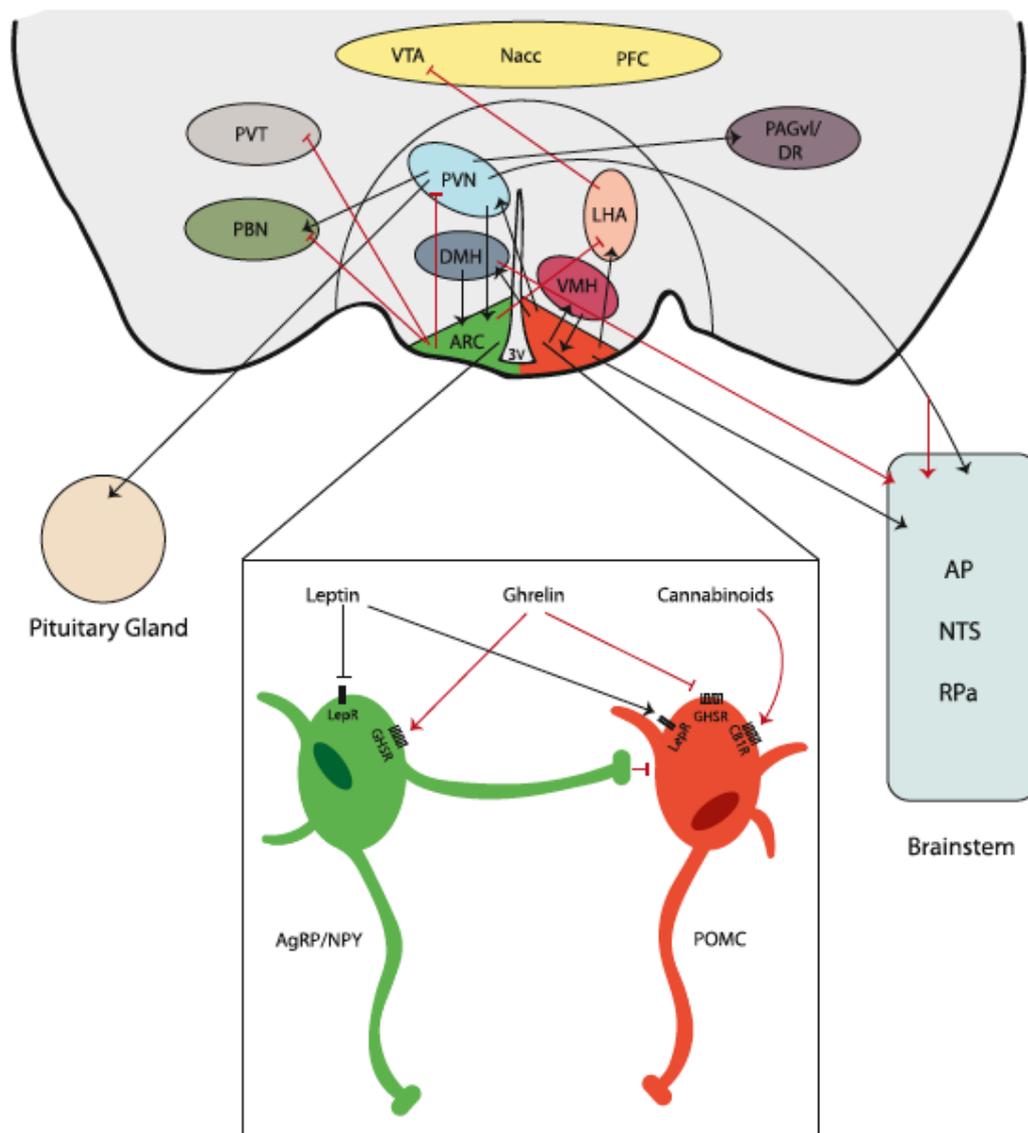


Figure 9: Schéma représentant le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique

3V : 3rd ventricle, AgRP : Agouti-related protein, AP : Area postrema, ARC : arcuate nucleus, CBR1 : cannabinoid receptor, DMH : dorsomedial hypothalamus, GHSR : growth hormone secretagogue receptor, LepR : Leptin receptor, LHA : Lateral hypothalamic area, Nacc : Nucleus accumbens, NPY : neuropeptide Y, NTS : Nucleus tractus solitarius, PAGvl/DR : ventrolateral periaqueductal gray and dorsal raphe complex, PBN : parabrachial nucleus, PFC : prefrontal cortex, POMC : proopiomelanocortin, PVN : paraventricular nucleus, PVT : paraventricular thalamus, RPa : raphe pallidus, VMH : ventromedial hypothalamus, VTA : ventral tegmental area (Waterson and Horvath, 2015).

Ces neurones oréxigéniques et anoréxigéniques se projetant sur les neurones du second ordre (PVH, DMH, LH) qui à leur tour projettent leurs signaux sur de multiples neurocircuits thalamiques et extra-hypothalamiques conduisant à une réponse intégrée de la composante énergétique (figure 9) (Gali Ramamoorthy et al., 2015 ; Timper et Bruning., 2017).

L'accomplissement de cette fonction (régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique) est essentiellement basé sur le système leptine-mélanocortine. La leptine sécrétée au niveau du tissu adipeux est importante pour l'initiation du signal de la mélanocortine (Alpha-MSH). Les récepteurs à la leptine sont largement exprimés dans l'hypothalamus, spécialement au niveau de l'ARC. Les neurones à AgRP et à POMC sont deux principaux types neuronaux exprimant le récepteur à la leptine dans l'ARC.

Après stimulation de la leptine, les neurones à POMC (clivage) sécrètent l' α melanocyte stimulating hormone (α -MSH) qui active les neurones à MC4R dans le PVH pour inhiber la prise alimentaire. En revanche, les neurones à AgRP sécrètent l'AgRP qui joue le rôle d'antagoniste de MC4R dans le PVH pour promouvoir son rôle dans la prise alimentaire (Horvath and Diano, 2004) .

Chez l'homme, les mutations de MC4R (décalage du cadre de lecture, délétion d'iframe, mutations non-sens et faux sens) représentent environ 6% des cas d'obésité sévère précoce, ce qui confère un rôle important au système central de la mélanocortine dans le contrôle du métabolisme énergétique. Par conséquent, les mutations dans le gène MC4R sont la forme monogénique la plus courante d'obésité sévère précoce (Tao, 2005).

Les neurones à AgRP sécrètent également le neuropeptide Y (NPY) et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) pour induire rapidement la prise alimentaire. NPY exerce ses effets par liaison à ses récepteurs Y1 et Y5 au niveau de l'hypothalamus.

Les neurones à NPY/AgRP inhibent directement les neurones à POMC via l'action inhibitrice du GABA au niveau de l'ARC. Ainsi Ces neurones peuvent moduler négativement l'action de la POMC par un mécanisme synaptique GABAergique direct et indirectement en antagonisant les récepteurs MCR post-synaptiques (Mercer et al., 2013).

De plus, la libération de GABA à partir de projections d'AgRP/NPY sur les neurones extra-hypothalamiques, en particulier dans le noyau parabranchique, joue également un rôle dans la stimulation de la prise alimentaire (Wu et al., 2009).

Les deux types neuronaux (neurones à AgRP et à POMC) répondent au signal à la leptine mais seulement les neurones à POMC expriment c-Fos, un marqueur d'activation neuronale (Waterson and Horvath, 2015).

II-Les donneurs de méthyles et l'homocystéine

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

1-Les folates (vitamine B9)

a-Structure et besoins

Les folates est un terme générique faisant référence à toute une famille de composés incluant l'acide folique et ses dérivés (figure 10) qui sont : 5-méthyltetrahydrofolate (5-MTHF), 5-formyltetrahydrofolate ou acide folinique (5-FTHF), 10-Formyl-THF, 5-10-méthylène-THF et le THF non substitué. Ils sont présents dans la nature sous forme réduite (Ducker and Rabinowitz, 2017).

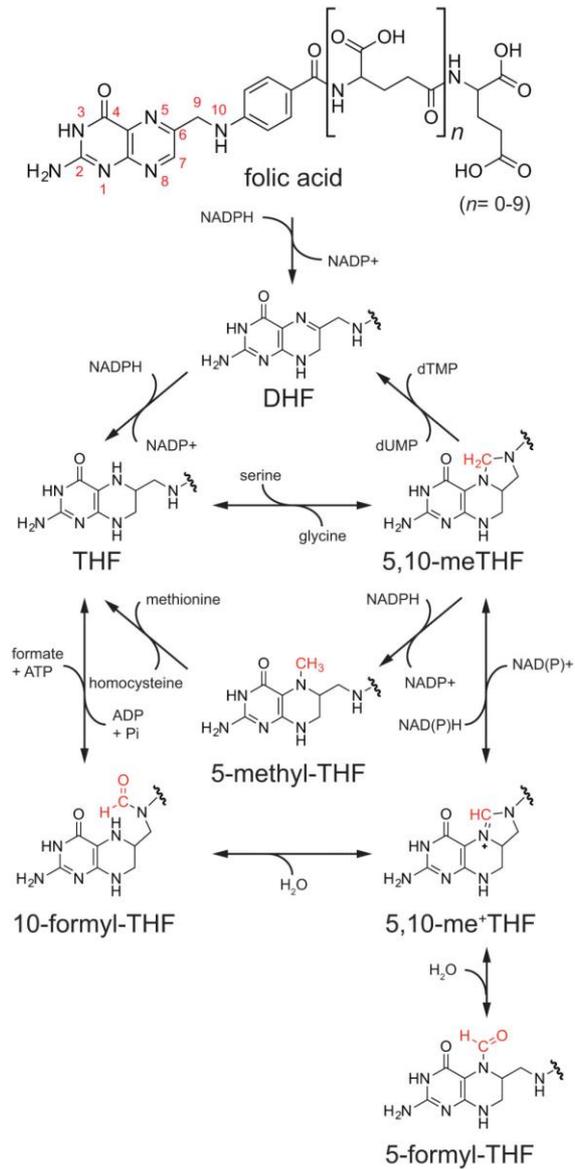


Figure 10: Transformation chimiques des folates

DHF : dihydrofolate, THF : tetrahydrofolate, 5MTHF : 5-methyltetrahydrofolate, 5,10-MeTHF : 5-10-methylene-THF (Ducker and Rabinowitz, 2017).

L'acide folique est la forme monoglutamate oxydée qui se produit rarement naturellement. Il est présent dans les aliments enrichis et les suppléments diététiques. L'acide folique est composé de 2 structures essentielles : un groupe ptéroyl lié à un résidu d'acide glutamique (figure 11). L'acide folique n'est pas actif comme coenzyme et doit subir différentes étapes métaboliques à l'intérieur de la cellule pour être converti sous la forme de THF métaboliquement actif (Ebara, 2017; Scaglione and Panzavolta, 2014) .

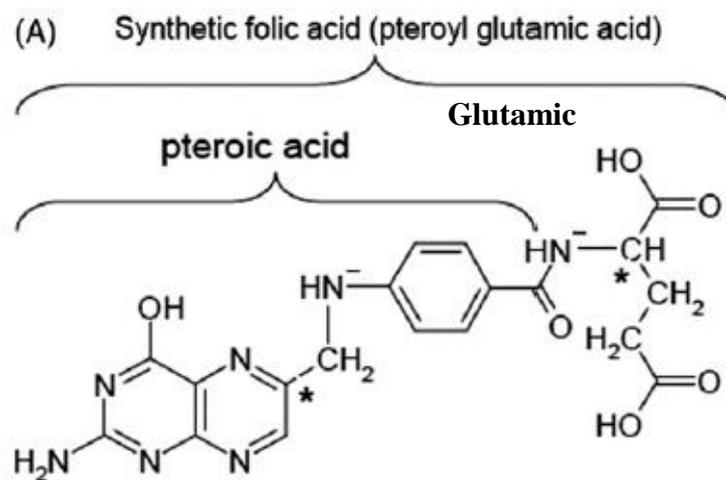


Figure 11: Structure de l'acide folique (Scaglione and Panzavolta, 2014).

Selon les apports nutritionnels conseillés (ANC) pour la population française, les besoins en acide folique sont de l'ordre de 300 µg/jour pour les femmes et de 330 µg/jour pour les hommes adultes. Pour les femmes enceintes ou planifiant une grossesse, la dose recommandé est de 400 µg/jour pour prévenir le risque d'anomalies de tube neural (Ebara, 2017; Martin, 2001).

b-Les sources alimentaires de folates

Les folates sont présents dans beaucoup d'aliments tels que les légumineuses (haricots, pois), les agrumes, les légumes (épinards, brocoli, chou-fleur). Ils sont également présents dans le foie et les produits laitiers, surtout quand ces derniers sont fermentés (fermentation par des micro-organismes pouvant synthétiser l'acide folique) (Iyer and Tomar, 2009).

c-Absorption et biodisponibilité des folates

Dans l'alimentation, les folates existent sous la forme de polyglutamate qui doit être converti en monoglutamate pour être absorbé dans la lumière intestinale. Cette réaction est catalysée par la ptéroylpolyglutamate hydrolase intestinale et l'hydrolase intracellulaire.

L'absorption des folates se fait par deux mécanismes : passif et médié.

L'absorption passive se fait principalement en cas de fortes doses de folates, alors que le transport médié se fait par trois systèmes : le transport de folates réduits, les récepteurs des folates et le transport de folates couplés aux protons, qui transporte les folates réduits et oxydés avec une efficacité similaire (Scaglione and Panzavolta, 2014).

La biodisponibilité est la proportion de nutriments ingérés qui devient disponible pour les processus métaboliques ou le stockage. La biodisponibilité des folates sous la forme de monoglutamates est plus élevée que celle sous la forme de polyglutamates en raison du besoin de son hydrolyse.

La chaîne de polyglutamates à laquelle sont liés les folates naturels entrave la biodisponibilité des folates alimentaires et doit être dégradée par les deux enzymes citées ci-dessus pour leur absorption.

Les données suggèrent que la forme polyglutamates est biodisponible de 60 à 80% comparée à la forme monoglutamates. L'efficacité d'absorption des folates naturels est approximativement réduite de moitié par rapport à celle de l'acide folique synthétique (Iyer and Tomar, 2009).

2-La vitamine B12 (Cobalamine)

a-Structure et besoins

La vitamine B12 ou cobalamine est un coenzyme complexe, constitué d'un atome de cobalt qui peut former entre 4 et 6 liaisons et peut exister sous forme de Cob (III), Cob (II) ou Cob(I)alamin. Quatre liaisons de cobalt sont toujours occupées par des atomes d'azote du noyau corrin entourant le cobalt. L'atome Cobalt peut lier un ligand axial, le dimethylbenzidine (DMB) se liant au cycle corrin (figure 12), comme il peut également lier un ligand axial supérieur (groupe R) qui peut être constitué d'un nombre quelconque de composés (Froese et al., 2019).

Selon le parlement Européen et le conseil de l'Union Européenne en 2011, l'apport quotidien de référence en vitamine B12 pour un adulte en bonne santé est de 2,5µg /jour.

Pour les femmes enceintes, l'apport quotidien de référence est augmenté de 0,2 µg/jour pour couvrir les besoins du fœtus. De même pour les femmes allaitantes, les besoins en vitamines B12 sont accrus. Ils sont de l'ordre de 2,8µg /jour, calculés sur la base des besoins pour une femme non allaitante, plus le taux de vitamine B12 sécrétée dans le lait maternel avec un statut adéquat en B12 (Bailey, 2004).

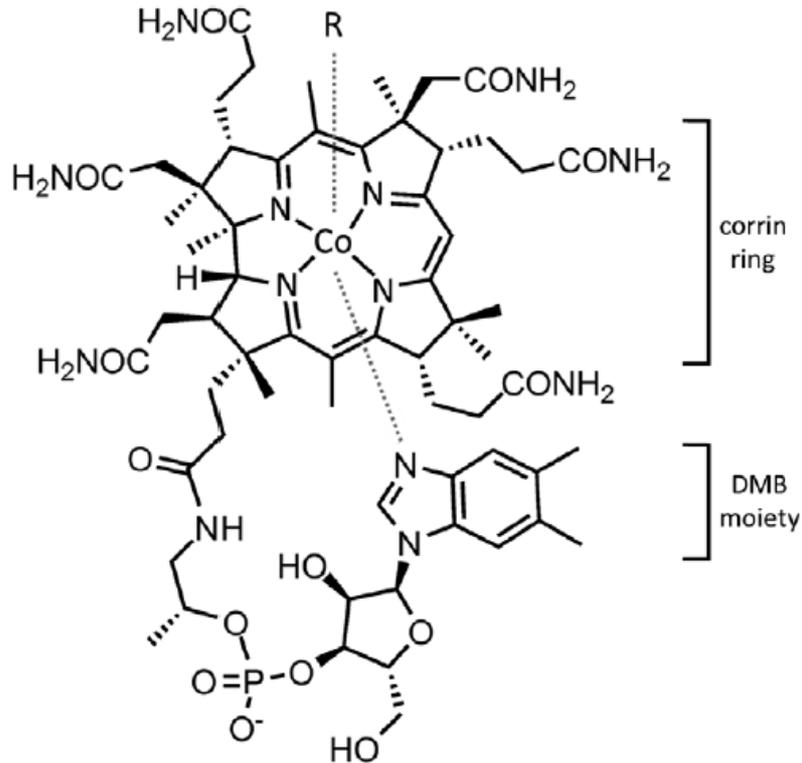


Figure 12: Structure chimique de la cobalamine (vitamine B12) (Froese et al., 2019).

b-Sources de cobalamine

La synthèse de cobalamine se fait en un peu plus de 25 étapes en conditions aérobiques ou anaérobiques. Cette synthèse est limitée aux Eubactéries et archées. Les autres organismes l'acquièrent dans l'alimentation.

La cobalamine provient de produits d'origine animale, principalement la viande, le poisson et le lait, ainsi que les produits laitiers fermentés.

L'estomac des ruminants contient divers microorganismes synthétisant la vitamine B12 (Denissen et al., 2019; Dror and Allen, 2018).

c-Absorption et biodisponibilité

La synthèse de la B12 (ruminants) a lieu au niveau de l'estomac. Son absorption nécessite plusieurs étapes, comprenant la synthèse d'acide chlorhydrique, des protéases et de facteurs intrinsèques (IF) (figure 13). La vitamine B12 est libérée à partir de protéines alimentaires par l'enzyme pepsine activée par l'acide chlorhydrique. Ensuite, elle se lie aux glycoprotéines haptocorrines secrétées avec la salive. Dans l'intestin, les protéases coupent la liaison B12-haptocorrines, permettant ainsi la formation du complexe B12-facteurs intrinsèques. Ce dernier, pénètre dans la surface apicale des cellules de l'iléon distal en se liant au récepteur spécifique, la cubiline, et traverse les cellules en étant incorporé dans les lysosomes cellulaires. Une fois dans la cellule, la B12 est libérée des IF. L'haptocorrine assure le transport de la B12 dans le foie, où elle est stockée. La B12 peut aussi se lier à la transcobalamine pour former un complexe holotranscobalamine qui est la seule fraction active de B12 qui peut être incorporée dans les cellules (Gille and Schmid, 2015).

La biodisponibilité de la vitamine B12 est inversement corrélée à la quantité ingérée. Plus elle est consommée, moins elle est absorbée. Ce phénomène est lié à la saturation des récepteurs du complexe vitamine B12-IF dans l'intestin grêle, qui devrait atteindre des quantités de 1,5-2µg par repas dans les conditions physiologiques.

Chez un individu en bonne santé ayant des fonctions intestinales normales, le taux de vitamine B12 absorbée est de 50% (Watanabe and Bito, 2018).

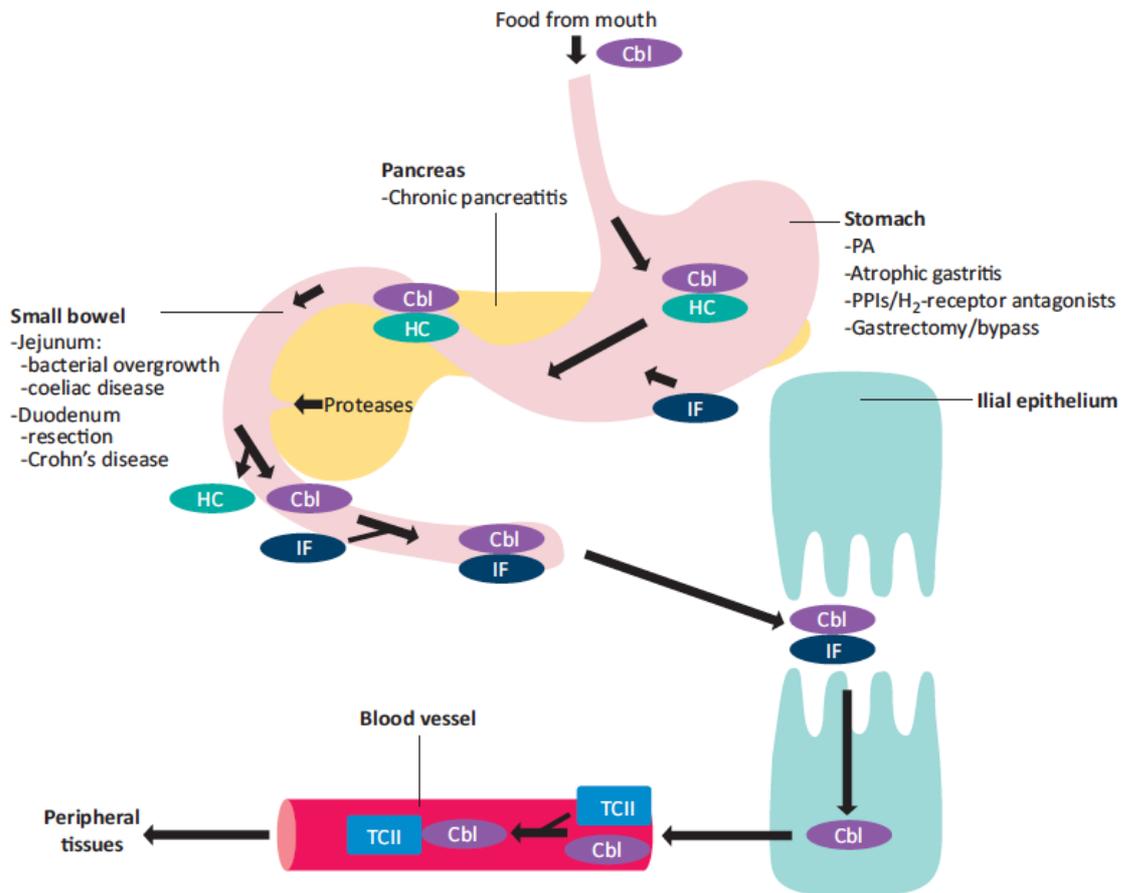


Figure 13: Schéma représentant l'absorption de la vitamine B12 (cobalamine)

HC : Haptocorrine, Cbl : cobalamine, IF : facteurs intrinsèques, TCII : Transcobalamin II, PA : Pernicious Anaemia, PPIs : Proton Pump Inhibitor (Shipton and Thachil, 2015).

3-Autres donneurs de méthyles

En plus des folates (B9) et de la cobalamine (B12), la **choline** et la **bétaine** interviennent dans le métabolisme des monocarbone. La choline joue un rôle important dans l'intégrité de la structure de la membrane cellulaire, dans la signalisation des fonctions cellulaires et dans la synthèse des neurotransmetteurs. Elle est disponible sous forme de choline libre, phosphocholine, glycérophosphocholine, sphingomyéline ou phosphatidylcholine. La choline est le précurseur de la bétaine et de l'acétylcholine (Youn et al., 2018).

De même que les folates et la cobalamine, la choline et la bétaine ne sont pas synthétisées par l'organisme, elles proviennent de l'alimentation. Les principales sources alimentaires sont les viandes rouges, les œufs, le poisson, les végétaux verts et les graines (Meyer and Shea, 2017)(Meyer and Shea, 2017).

Outre les donneurs de méthyles cités ci-dessus, les vitamines **B2** et **B6 (pyridoxine)** sont d'importants cofacteurs d'enzymes impliqués dans le métabolisme des monocarbone. La vitamine B2 peut interagir avec les folates pour moduler les concentrations d'homocystéine. La vitamine B6 est un cofacteur de la bétaine-homocystéine-méthyltransferase catalysant la reméthylation de l'homocystéine en méthionine dans le cycle des monocarbone. Ainsi une déficience en B6 peut entraîner une accumulation d'homocystéine (Li et al., 2016).

4-Cycle des monocarbone et homocystéine

Le métabolisme des monocarbone est un ensemble complexe de réactions chimiques qui sert à activer et à transférer les unités de carbone pour les processus de biosynthèse, incluant la synthèse de purine et thymidine, mais aussi la reméthylation de l'homocystéine en méthionine. Le cycle des monocarbone lie le cycle des folates à celui de la méthionine (figure 14).

Dans le cycle des folates, une unité de carbone de la sérine est transférée au tétrahydrofolate (THF) par la sérine hydroxyméthyl transférase (SHMTs) pour former le 5,10-méthylènetétrahydrofolate (CH₂-THF). Ensuite cette unité de carbone est transférée d'une position de THF à une autre dans le cycle des folates. Le cycle des folates est composé d'un

compartiment cytoplasmique et d'un autre mitochondrial. Dans le compartiment cytoplasmique, c'est la méthylènetétrahydrofolate synthétase 1 (MTHFD1) qui intervient, alors que dans le compartiment mitochondrial c'est plutôt la MTHFD2/2L et la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase 1-like (MTHFD1L). MTHFD2 utilise NAD⁺ tandis que MTHFD1 utilise NADP⁺ pour générer respectivement NADH et NADPH. Les échanges de molécules THF entre les compartiments cytoplasmique et mitochondrial sont limités. Les deux compartiments sont étroitement liés par le transport de la sérine, glycine et formate à travers la membrane mitochondriale. Le cycle des folates cytoplasmique est important pour la synthèse de la purine, alors que CH₂-THF est requis pour la synthèse de la pyrimidine. CH₂-THF est converti en CH₃-THF nécessaire pour le cycle de la méthionine (Lee et al., 2017).

Le 5-Methyl-THF joue le rôle de donneurs de méthyles pour la reméthylation de l'homocystéine catalysée par l'enzyme méthionine synthase dépendante de la B12. Le THF peut être converti en 10-formyl-THF et puis en 5,10-méthylène-THF avec l'action de la MTHFD1. Le 10-formyl-THF sert de donneur de groupes monocarbonés nécessaires à la biosynthèse de purines. Le THF peut être directement converti en 5,10-méthylène-THF avec l'action de SHMT. Le 5,10-méthylène-THF sert de cofacteur pour la conversion de dUMP en dTMP qui est catalysée par l'enzyme thymidylate synthase. Le DHF est converti en THF via la DHFR. Le cycle se termine avec l'acceptation d'une autre unité monocarbonate et la génération de 5,10-méthylène-THF par l'action de la SHMT. Les réactions catalysées par la méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) sont cruciales pour la régulation du 5-methyl-THF, qui est requis pour la synthèse de la méthionine (Ebara, 2017).

A partir de la méthionine et en présence d'adénosine triphosphate (ATP), il y a production de S-adenosyl méthionine (SAM), le donneur de méthyle universel, qui est ensuite convertie en S-adenosyl homocystéine (SAH) par l'enzyme méthyltransférase dans une réaction de transméthylation qui génère le groupement méthyle utilisé pour la méthylation de l'ADN, la synthèse des protéines, lipides, et des glucides, ainsi que d'autres réactions cellulaires. Ensuite la SAH est réversiblement clivée en homocystéine et adénosine par la SAH hydrolase. L'homocystéine est reméthylée pour former la méthionine soit par la méthionine synthase qui utilise la vitamine B12 comme cofacteur ou par la bétaine homocystéine méthyltransférase qui utilise la bétaine comme donneur de méthyle. L'homocystéine peut être catabolisée via la

cascade de transsulfuration (Ducker and Rabinowitz, 2017; Kalhan, 2016). Des études montrent qu'approximativement 50% d'homocystéine générée par l'organisme est reméthylée en méthionine et le reste est métabolisée via la voie de transsulfuration (Kalhan, 2016).

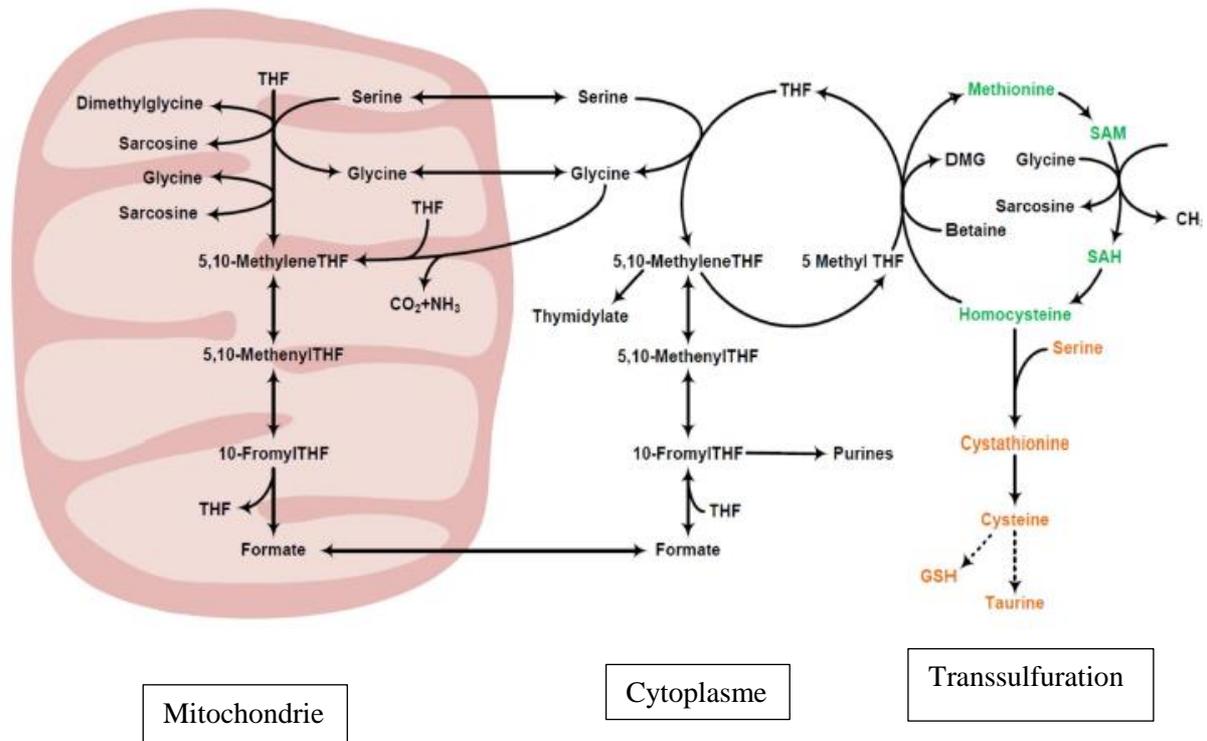


Figure 14: Le métabolisme des monocarbones.

Vert : méthylation de l'ADN, orange : voie de transsulfuration (Kalhan, 2016).

5-L'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé soufré (figure 15) non utilisé dans la synthèse des protéines et un produit intermédiaire du cycle de la méthionine. C'est un homologue de la cystéine (Oikonomidi et al., 2016).

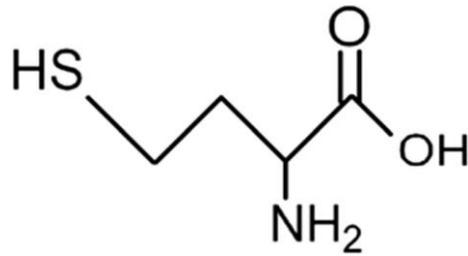


Figure 15: Structure de l'homocystéine (Oikonomidi et al., 2016).

Elle est produite via la déméthylation de la méthionine alimentaire, qui est abondante dans les protéines animales. Elle se trouve dans le plasma sous plusieurs formes différentes : environ 1% sous forme de thiol libre, 70-80 % liée aux protéines plasmatiques par le disulfure, principalement à l'albumine ; 20-30% se combinent avec elle-même pour former des dimères ou avec d'autres thiols.

Chez l'individu en bonne santé, le taux plasmatique d'homocystéine se situe entre 5 et 15 $\mu\text{mol/L}$. Au-delà de cette concentration, on parle d'une hyperhomocystéinémie qui est une augmentation anormale du taux d'homocystéine dans le plasma. Entre 16-30 $\mu\text{mol/L}$ d'homocystéine, il s'agit d'une hyperhomocystéinémie modérée, 31-100 $\mu\text{mol/L}$ correspondent à une hyperhomocystéinémie intermédiaire. Au-delà de 100 $\mu\text{mol/L}$ elle est classée comme hyperhomocystéinémie sévère.

Il existe deux types d'hyperhomocystéinémie, la forme rare mais sévère due aux mutations génétiques des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'homocystéine, et la forme la plus commune qui cause une hyperhomocystéinémie modérée, liée le plus souvent aux facteurs environnementaux et modes de vie.

L'hyperhomocystéinémie peut provenir de carences alimentaires en folates, vitamine B6, et vitamine B12, d'un dysfonctionnement rénal et thyroïdien, du cancer, d'un diabète, de médicaments et maladies interférant avec le métabolisme des donneurs de méthyles (les maladies cardiovasculaires).

La prévalence de l'hyperhomocystéinémie peut varier significativement en fonction de l'âge, de l'alimentation et du fond génétique. La vieillesse, le sexe masculin, le tabac, la

consommation de café, l'hypertension artérielle, le profil lipidique défavorable sont également des facteurs qui augmentent le taux d'homocystéine (Kałużna-Czaplińska et al., 2013).

5-1-Reméthylation de l'homocystéine

La méthionine est un acide aminé utilisée dans les réactions de méthylation, la synthèse de la cystéine et la génération de polyamine. Pour être utilisée dans les réactions cellulaires, la méthionine est convertie en SAM. La deméthylation de cette dernière génère SAH qui est hydrolysée en homocystéine et adénosine. La méthionine est régénérée à partir de l'homocystéine par le transfert de groupe méthyles de N5-Methyl-THF. SAM peut également catalyser la synthèse de polyamine quand elle est décarboxylée pour former S-adenosyl méthionine, appelée S-adenosyl méthionine décarboxylée (dcSAM). Dans cette réaction la dcSAM est convertie en 5'-methyl thioadenosine (MTA). L'accumulation de MTA inhibe l'enzyme arginine N-methyl transférase 5 (PRMT5) qui utilise SAM comme donneur de méthyles pour la synthèse de diméthylarginine (sDMA) à partir de l'arginine.

Dans le cycle de la méthionine, MTA est clivée en 5-methylthioribose-1-phosphate (MTR) et adénine par l'enzyme methylthioadénosine phosphorylase (MTAP). L'adénine peut être convertie en AMP (Adenosyl monophosphate), et ainsi l'analogue de l'adénosine, L-alanosine peut limiter la production d'AMP via la voie de la synthèse de la purine. MTR peut être convertie en méthionine, ainsi le cycle de la méthionine est achevé (figure16) (Luengo et al., 2017).

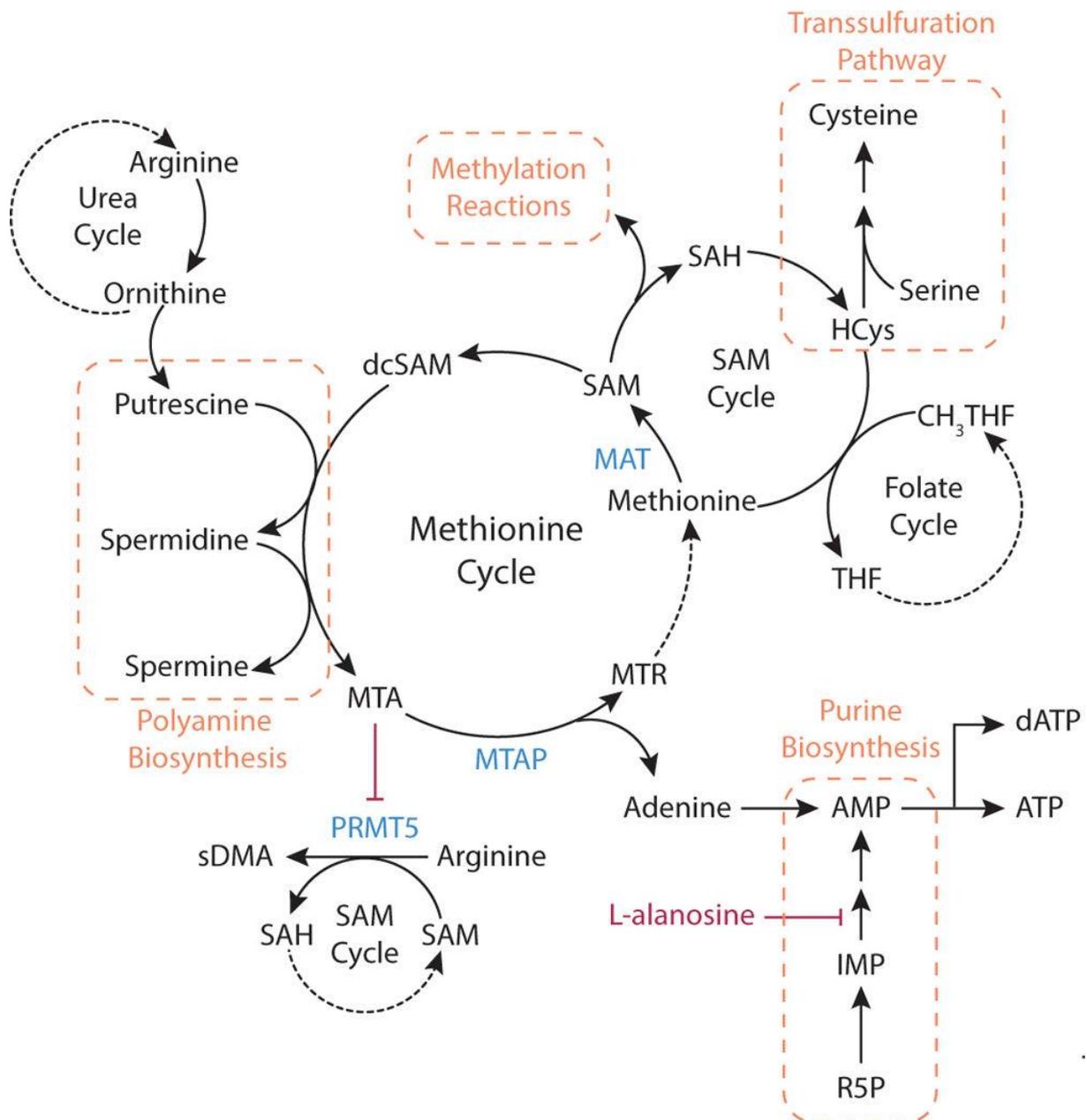


Figure 16: Cycle de la méthionine

Dc SAM : S- adénylméthionine décarboxylée, *MTR* : 5-méthylthioribose-1-phosphate, *MTA* : 5'-méthylthioadénosine, *PRMT5* : N-méthyltransférase 5, *MTAP* : méthylthioadénosine phosphorylase, *SAM* :S- adényl méthionine, *SAH* : S adényl homocysteine, *AMP* : Adényl monophosphate, *IMP* : Inosine monophosphate, *R5P* : ribose 5 phosphate (Luengo et al., 2017).

5-2-La voie de transsulfuration

La voie de transsulfuration (figure 17) joue un rôle important dans le métabolisme du sulfure et la régulation redox dans les cellules.

L'homocystéine est convertie en cystathionine par l'enzyme cystathionine β -synthase (CBS), qui est activée par la cystathionine γ -lyase (CSE) pour générer la cystéine (acide aminé nécessaire pour la synthèse du glutathion) et l' α -cétobutyrate (Hine and Mitchell, 2015).

Les enzymes CBS et CSE sont régulées à plusieurs niveaux. La CBS catalyse la première étape de transsulfuration en condensant la sérine avec l'homocystéine pour générer la cystathionine. Elle est présente en grande partie dans le cerveau mais aussi dans la périphérie (foie, rein). C'est une enzyme cytosolique activée par la SAM, qui utilise la vitamine B6 comme cofacteur.

La CSE est la seconde enzyme intervenant dans cette voie métabolique. Elle utilise la cystathionine générée par la CBS pour produire la cystéine. La CSE est prédominante dans la périphérie mais elle est aussi connue pour jouer un rôle neuroprotecteur au niveau du cerveau. Elle peut être activée par plusieurs facteurs allant du stress oxydant à la privation de nutriments.

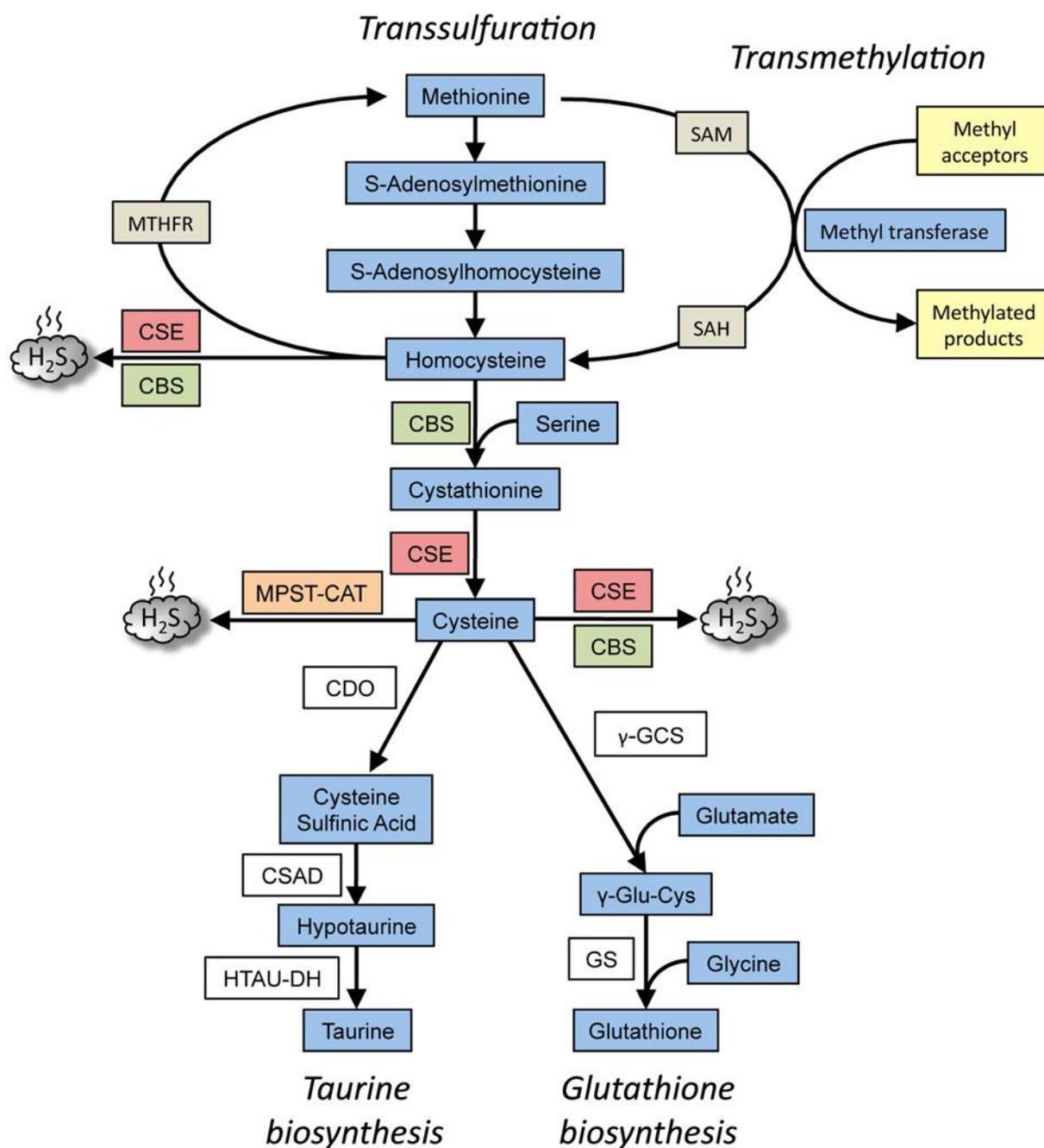


Figure 17: Voie de transsulfuration

SAM :S- adénosyl méthionine, *SAH* : S adenosyl homocysteine, *MTHFR* : Méthyl tétrahydrofolate réductase, *CSE* : cystathionine γ -lyase (CSE), *CBS* : cystathionine β -synthase, *CDO* : cystéine dioxygénase, *HTAU-DH* : hypotaurine dehydrogenase, γ *GCS* : γ -glutamyl-cysteine synthetase, *MPST-CAT* : HS₂ Mercaptopyruvate sulfurtransferase-cysteine amino acid transferase, *CSAD* : cysteine sulfinic acid decarboxylase (Sbodio et al., 2019).

III-Pathologies et carences en donneurs de méthyles

1-Carences en folates (vitamines B9)

La déficience en folates peut découler de multiples causes incluant le régime alimentaire, le chauffage pendant la cuisson, la malabsorption due aux maladies cœliaques ou au pontage gastrique. Certains médicaments tels que le méthotrexate ou le triméthoprimé peuvent entraver l'utilisation des folates, inhibent son absorption ou sa conversion en forme active (Khan and Jialal, 2018).

On parle de déficit quand la concentration plasmatique est inférieure à des valeurs comprises entre 7 et 10 nmol/L. Cette carence peut influencer la conversion de désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMT) qui est nécessaire pour la synthèse de l'ADN et sa réparation. L'association de la carence en folates et du polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme des folates peut affecter la méthylation de l'ADN (hypo- ou hyper-méthylation), des protéines et des lipides (Pieroth et al., 2018; Xie et al., 2017).

2-Carences en cobalamine (Vitamine B12)

Tout comme les folates, la vitamine B12 joue un rôle dans le métabolisme cellulaire. Une carence en cobalamine est causée par un régime alimentaire inadéquat, surtout chez les enfants et les femmes en âge de procréer. Elle peut être aussi due aux infections gastro-intestinales et interactions hôte-microbiote conduisant à sa malabsorption au niveau de l'intestin, particulièrement chez les personnes âgées.

D'autres facteurs peuvent causer une carence en vitamine B12 ; il s'agit de l'alcool, du tabac, de certaines maladies (malaria, HIV, tuberculose) et des médicaments comme les inhibiteurs de la pompe à protons ou les antagonistes de l'histamine H2.

Le principal facteur de risque de déficience en cobalamine est l'anémie pernicieuse causée par une absence de production de facteurs intrinsèques par les cellules pariétales gastriques, nécessaire à l'absorption intestinale de la B12. Il existe d'autres facteurs de risque, tels que la chirurgie bariatrique ou le retrait d'iléon terminal qui compromettent l'absorption de la B12 (Green et al., 2017).

Les critères de diagnostic d'une carence en B12 sont les suivants : une concentration <148 pmol/L dans le sérum en présence de symptômes et /ou d'indices hématologiques d'un déficit en B12 ou une cobalamine sérique <148 pmol/L avec une concentration élevée d'homocystéine ou d'acide méthylmalonique dans le sérum.

La déficience en B12 se caractérise par des effets hématologiques (faibles taux d'hémoglobine, neutropénie, thrombocytopénie) et neurologiques (neuropathies périphériques, incontinence urinaire) allant de troubles légers tels que la fatigue et la paresthésies à des problèmes beaucoup plus graves comme la dégénérescence de la moelle épinière (Shipton and Thachil, 2015).

3-Supplémentation en folates

La supplémentation en folates peut se faire sous forme d'acide folique, d'acide folinique ou de 5-MTHF. Actuellement, on pense qu'une supplémentation avec le 5-MTHF naturel peut présenter un avantage important par rapport à une supplémentation avec l'acide folique synthétique, bien que les deux semblent avoir une efficacité similaire. Ceci peut avoir un lien avec le fait que la consommation excessive d'acide folique peut masquer une carence en vitamine B12 non diagnostiquée, alors qu'il est peu probable que ce soit le cas avec le 5-MTHF biologique (Scaglione and Panzavolta, 2014).

Des études (Lamers et al., 2004) prouvent que la supplémentation en folate de l'ordre de 400µg/jour d'acide folique ou de 208-416 µg/jour de 5-MTHF réduit les risques d'anomalies du tube neural et contribue à la restauration de taux physiologiques d'homocystéine.

4-Exemples de pathologies liées aux carences en donneurs de méthyles

a-Anomalies du tube neural (NTDs)

La nutrition maternelle pendant la grossesse est reconnue comme étant essentielle pour le développement optimal du fœtus. Les folates jouent un rôle critique pendant la grossesse car ils sont impliqués dans la synthèse nucléotidique, la réparation de l'ADN, les réactions de méthylation et la synthèse des neurotransmetteurs. Ainsi, ils sont essentiels pendant les périodes de croissance rapide des tissus. Une supplémentation en folate en période préconceptionnelle puis en début de grossesse présente un effet bénéfique pour la prévention

des anomalies du tube neural (NTDs). La supplémentation conseillée est de 0,4mg/jour, mais elle peut être augmentée jusqu'à 4mg/jour pour les femmes présentant des antécédents de NTDs (Bailey and Hausman, 2018).

De plus, l'hyperhomocystéinémie, les polymorphismes génétiques liés au métabolisme des folates comprenant MHFR C677T, 844ins68, GCPII H475, MTR A2756G et MTRR A66G sont connus pour affecter les apports en folates et vitamine B12, conduisant ainsi à des complications gestationnelles dont les NTDs (Hiraoka and Kagawa, 2017).

Les NTDs, incluant le spina bifida, l'anencéphalie, l'encéphalocèle et l'hydrocéphalie, sont des anomalies congénitales majeures pouvant entraîner une interruption de la grossesse, une mortinaissance ou un handicap sévère. Les NTDs constituent le plus grand groupe d'anomalies du développement du système nerveux central caractérisé par une fermeture incomplète du tube neural embryonnaire et font partie des plus importantes causes congénitales de morbidité et de mortalité chez les nourrissons dans le monde (Caffrey et al., 2018).

b-Maladies cardiovasculaires

L'alimentation joue un rôle dans la survenue des maladies cardiovasculaires. Les mécanismes peuvent impliquer des processus épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN, les modifications de la chromatine et les microARN non codants (miRNA). Ces processus font que les gènes sont transcriptionnellement activés ou inhibés. Les facteurs alimentaires requis pour les réactions de méthylation permettent la régénération de la S-adenosyl. Il s'agit des folates, de la vitamine B12, de la vitamine B6, de la choline et des acides aminés comme la méthionine, la cystéine, la glycine et la sérine.

De plus, l'accumulation d'homocystéine dans le plasma, liée à une carence en donneurs de méthyles est également associée à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires (Xiao et al., 2015). Certaines études suggèrent que le taux plasmatique de S-Adénosyl-homocystéine (SAH) constitue un meilleur facteur que l'homocystéine pour prédire les risques cardiovasculaires (Kerins et al., 2001).

c-Diabète

La prévalence du diabète est en forte augmentation dans le monde entier. C'est un trouble métabolique multifactoriel, caractérisé par une hyperglycémie chronique accompagnée d'autres troubles métaboliques, tels que les troubles de production/d'action de l'insuline ou les deux. Le diabète est causé par plusieurs facteurs, notamment des altérations épigénétiques de l'expression des gènes, dues en partie à des perturbations du métabolisme des monocarbones et de la méthylation de l'ADN (Mursleen and Riaz, 2017).

Un déséquilibre dans la voie de méthylation dû à une carence en donneurs de méthyles pendant la période gestationnelle peut contribuer au développement du diabète à l'âge adulte (Smith et al., 2011).

d-Cancer

La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans la progression des cancers. Cette méthylation requière SAM comme donneurs de méthyles, provenant du cycle des monocarbones. A travers ce cycle, les groupes de monocarbones sont transférés pour maintenir la méthylation de l'ADN, la régulation de l'expression des gènes et fournir les métabolites nécessaires pour les réactions biologiques. Cependant, le métabolisme des monocarbones est un processus dynamique, dans lequel une diminution ou accumulation de l'un des facteurs affecte la méthylation de l'ADN et l'intégrité du génome, conduisant ainsi à des modifications épigénétiques, un déséquilibre des gènes suppresseurs de tumeurs et une transformation des cellules en cellules malignes (Yang et al., 2018).

Depuis les années 1970, plusieurs études révèlent que les cellules tumorales humaines sont caractérisées par l'incapacité de proliférer quand la méthionine est remplacée par son précurseur intermédiaire, l'homocystéine. C'est le phénomène de la méthionine dépendance, caractéristique de la majorité des cellules tumorales. Cette dépendance pourrait être une conséquence d'altérations chromosomiques (Halpern et al., 1974).

D'autres études ont démontré que l'activité déficiente de la méthionine synthase peut résulter de l'inactivation de l'enzyme elle-même ou d'une diminution de l'apport en cofacteurs (cobalamine et folates) qui sont nécessaires pour les fonctions de l'enzyme (Fiskerstrand et

al., 1994). Le faible taux de de méthylcobalamine semble être le paramètre le plus étroitement corrélé à la dépendance à la méthionine. Cette différence métabolique (méthionine dépendance) des cellules cancéreuses ouvre des perspectives intéressantes pour des stratégies nutritionnelles en thérapie anticancéreuse (Cellarier et al., 2003).

Objectifs de l'étude

La mise en place du système nerveux central est régulée par un programme neurogénique dont le déroulement est orchestré de manière chronologique bien précise par de nombreux processus épigénétiques. La fermeture du tube neural se fait à un stade précoce de la gestation et est suivie de la formation des vésicules cérébrales, leurs régionalisations ainsi que leur maturation qui se poursuit après la naissance. La période périnatale est le siège de la synaptogenèse et du remodelage des réseaux neuronaux. L'intégration des signaux périphériques pendant cette période est cruciale pour la mise en place fonctionnelle des circuits hypothalamiques régulant la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique.

Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré qu'une carence gestationnelle et périnatale en donneurs de méthyles entraîne chez le raton de 21 jours une désorganisation de la glande gastrique et une altération du système à Ghréline (Bossenmeyer-Pourie et al., 2010), une altération de la voie de signalisation du récepteur à la leptine qui est la voie stat 3 (Kerek et al., 2013) et une N-homocystéinylation de protéines du cytosquelette conduisant à leur agrégation ainsi qu'à leur perte de fonction (Akchiche et al., 2012; Bossenmeyer-Pourie et al., 2013). Ces troubles sont associées à des anomalies développementales, à un retard de croissance et à des déficits cognitifs définitifs chez la progéniture.

A l'heure actuelle, la supplémentation en folate est prescrite aux femmes enceintes en période périconceptionnelle puis au cours du premier trimestre de grossesse pour pallier les anomalies de fermeture du tube neural telles que le spina bifida. Aucune recommandation ne porte sur une supplémentation plus tardive, pendant le dernier trimestre de grossesse qui est une période déterminante pour la maturation cérébrale.

Notre travail se proposait de répondre à différentes questions :

- Le retour à une alimentation normale au sevrage (21 jours) permet-il une récupération de l'organisation gastrique, du système à Ghréline et de la signalisation métabolique périphérique ?
- Le retard de croissance définitif observé chez les ratons est-il en lien avec une programmation fœtale des réseaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique ?

- Quelle sont les conséquences d'une supplémentation périnatale en folate sur la l'organisation gastrique, les signaux périphériques, la maturation fonctionnelle des réseaux hypothalamique et le retard de croissance ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé deux modèles cellulaires hypothalamiques de rat et de souris choisis pour l'expression des neuropeptides intervenant dans l'intégration des signaux périphériques ainsi que dans le développement et la maturation de l'hypothalamus ; nous avons également mis en œuvre le modèle animal de carence gestationnelle bien décrit dans la littérature (Blaise et al., 2007). Dans ce modèle, les rates sont soumises à un régime carencé en vitamines B9/B12 un mois avant l'accouplement et jusqu'au sevrage des ratons à 21 jours. A l'âge embryonnaire E13, ces dernières ont été supplémentées en vitamines B9 sous forme d'acide folique, et ce jusqu'au sevrage des ratons.

Les résultats issus de ce travail seront présentés en 3 parties successives :

1. Altérations développementales dans un modèle de carence précoce en nutriments donneurs de méthyles chez le rat : influence d'une supplémentation maternelle tardive à l'acide folique.
2. Persistance d'une inflammation de la muqueuse gastrique chez le rat adulte et âgé après exposition fœtale et postnatale précoce à une carence en donneurs de méthyles – Étude du système à Ghreline.
3. Une déficience en donneurs de méthyles pendant la gestation et la période de lactation chez le rat affecte l'expression des neuropeptides et des récepteurs associés dans l'hypothalamus de la descendance.

II-Matériel et méthodes

1-Les modèles d'étude

1-1-Le modèle cellulaire

Lors de cette étude nous avons utilisé 2 lignées cellulaires : mHypoE46 (Souris) et rHypoE11 (Rat) pour des neurones hypothalamiques immortalisés à l'âge embryonnaire E15, E17, E18 pour la souris et E18 pour le rat à partir de cultures primaires, avec le rétrovirus SV40 T-Ag. Ces deux lignées ont été choisies pour l'expression des neuropeptides : NPY et AgRP, et des récepteurs à l'insuline, leptine, glucocorticoïdes et ghréline qui sont spécifiques du noyau arqué de l'hypothalamus et qui jouent un rôle dans l'intégration des signaux métaboliques périphériques mais aussi dans le développement et la maturation de l'hypothalamus.

1-1-1-Conditions de culture

Ces cellules sont cultivées dans le DMEM 1x (D5796, Sigma-Aldrich) avec 10% de sérum fœtal bovin (CVFSVF0001, lot : S52751-2262, Eurobio), 25mM de glucose (G8769, Sigma-Aldrich) et 1% de Pénicilline/Streptomycine (P4333, Sigma-Aldrich).

Ce milieu contient du : L-glucose (4,5g/L), L-glutamine (0,584g/L), Bicarbonate de sodium (3,7 g/L) sans pyruvate de sodium.

Les cellules sont décongelées dans un bain marie à 37°C, elles sont ensuite mises en culture dans des flasques (Corning Falcon, Dutscher) avec le milieu de culture cité précédemment. Après incubation à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (5%) pendant 4-6h ; le temps qu'elles adhèrent à la boîte, le milieu est changé pour retirer le diméthylsulfoxyde (DMSO, D8418, Molecular Biology, Sigma-Aldrich) contenu dans le milieu de congélation et qui pourrait les tuer.

Ce sont des cellules adhérentes poussant en monocouche. Elles peuvent être trypsinées quand elles atteignent un pourcentage de confluence compris entre 70 et 90 % avec un ratio 1/5.

La typsination se fait avec 1x phosphate buffered saline (PBS), puis avec 1x trypsin-EDTA (D3624, Sigma-Aldrich) pendant 5min à 37°C. Ces étapes sont suivies par des lavages/re-suspension dans le milieu de culture (fiche technique 1).

La congélation de ces dernières se fait lors des premiers passages, dans le milieu de culture additionné de 10% de diméthylsulfoxyde stérile (DMSO). La concentration des cellules dans

le milieu de congélation doit être de 10^5 cellules/mL. Les cryocapsules (NALGENE TM Cryo 1°C) sont placés à -80°C pendant une nuit puis dans l'azote liquide pour le long terme.

1-1-2-Conditions de la carence en B9

Afin d'étudier l'impact de la carence en vitamine B9 sur l'expression des gènes et des protéines, les cellules sont mises en culture dans un milieu dépourvu de vitamine B9 (Fiche technique 2).

Il s'agit du DMEM 1x D2429 tamponné, additionné de glucose, de SVF et de Pénicilline/Streptomycine. Après 24H de culture dans le milieu d'entretien, les cellules sont placées dans le milieu carencé. La carence est maintenue pendant 24h/48h, ensuite les cellules sont récupérées.

1-1-3-Récupération des échantillons

Pour l'extraction d'ARN/ADN, les cellules sont récupérées après trypsination sous forme de culot stocké à -80°C . Tandis que pour l'extraction des protéines, les cellules sont récupérées après grattage avec un râtelier directement dans la boîte maintenue au froid sur un lit de glace (voir partie Western Blot).

Concernant la technique d'immunomarquage, les cellules sont ensemencées directement sur lames en verre dans des plaques de 24 puits (353047, Dutscher) et sont fixées au PFA 4% au moment du marquage (voir fiche technique 12 et 13).

1-2-Le modèle animal

1-2-1-Conditions d'hébergement

Lors de cette étude nous avons utilisé un modèle de rat Wistar (RjHAN, Janvier Labs). Les animaux ont été hébergés suivant les directives internationales de bien-être animal. Ils ont été maintenus dans des conditions de laboratoire standards avec un cycle lumière/obscurité de 12h. Les animaux disposent d'eau et de nourriture à volonté (fiche technique 3).

Les expériences réalisées sur ce modèle ont été approuvées par le comité d'éthique de l'Université de Lorraine (APAFiS ##5509-2016053112249550).

1-2-2-Le régime alimentaire

Pendant l'acclimatation, tous les rats disposent d'un régime standard (A04, Safe) sous forme de croquettes.

Pour l'étude de l'impact de la carence en vitamines B9 et B12 au niveau central et périphérique, les femelles carencées suivent un régime pauvre en vitamines du groupe B (Low B vitamin, SDS Diet) un mois avant l'accouplement, durant la gestation et jusqu'au sevrage des rats. Ensuite tous les rats retournent au régime normal (Blaise et al., 2007).

Pour l'étude de l'impact de la carence et de la supplémentation en folate sur le système périphérique et central, les femelles sont soumises à ce même régime carencé, mais elles sont supplémentées en vitamine B9 (par voie orale) quotidiennement entre l'âge embryonnaire E13 et le sevrage des rats, 21 jours après la naissance (Geoffroy et al., 2017) .

1-2-3-La supplémentation en folates (vitamine B9)

La supplémentation en folate (figure 15) est réalisée avec l'acide folique synthétique (F8758, Sigma-Aldrich) mélangé à du lait concentré (Régilait[®]). Elle a été faite à une dose de 3mg/Kg/Jour, par voie per Os (fiche technique 4).

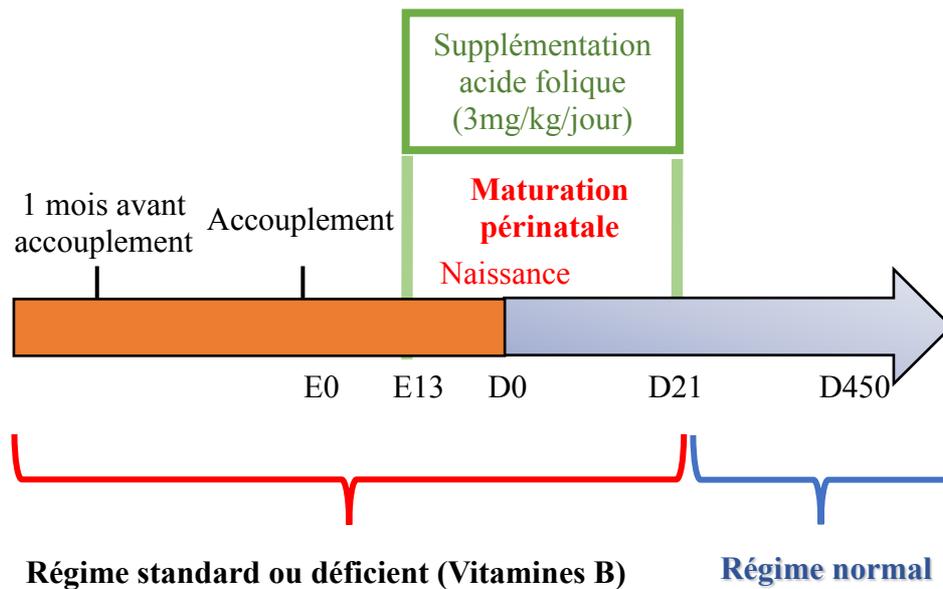


Figure 18: Schéma récapitulatif du protocole de carence et de supplémentation en vitamine B9.

1-2-4-Récupération des échantillons

A la fin du protocole, les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (B 506, FORENE, ABBVIE) et mis à mort par décapitation de l'animal à 21 jours pour le protocole de la carence/supplémentation et à 80 et 450 Jours pour l'étude de vieillissement.

Après la mort des animaux, les estomacs ainsi que les cerveaux ont été récupérés pour des analyses biochimiques. Concernant les cerveaux, la partie droite a été fixée dans une solution de PFA 4% (Immunomarquage) et la partie gauche a été microdissectée pour récupérer l'hypothalamus, l'hippocampe, le cervelet, le cortex, le striatum et le tronc cérébral et a été congelée dans l'azote liquide puis stockée à -80°C.

Les cerveaux fixés au PFA 4% pendant 24H, sont ensuite rincés au PBS 1x, 3 fois pendant 5min puis sont traités selon un gradient de sucrose 10%, 20% et 30%. Enfin ils sont congelés dans le méthylbutane pendant 1 minute à -25°C puis stockés à -80°C.

La récupération du sang pour les dosages plasmatiques a été faite dans des tubes héparinés (Venosafe® Plastic Tubes, Terumo Europe) après décapitation et exsanguination des rats. Le sang est ensuite centrifugé pendant 5 min à 3500 xg à 4°C (Avanti J-26 XP centrifuge, Beckman coulter) pour la récupération du plasma.

2-Étude de l'apoptose cellulaire

Lors de cette étude nous nous sommes intéressés aux cellules apoptotiques dans les estomacs de rats de 80 et 450 jours en conditions de carence (B9/B12). Le test a été réalisé en utilisant le kit Apoptag® Plus Fluorescein *in situ* (Chemicon International, Millipore) se basant sur le principe TUNEL (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling) qui marque les cellules apoptotiques par modification de l'ADN en ajoutant des nucléotides marqués par une fluorescéine à l'aide de la Desoxynucleotidyl-transferase (Fiche technique 5).

3-Étude de l'expression des gènes par Rétrotranscription (RT) et quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée sur les deux modèles d'étude : Lignées cellulaires et modèle animal. L'extraction d'ARN total sur les cellules a été faite avec le kit NucleoSpin® RNA Plus, Macherey-Nagel (fiche technique 6), tandis que sur les tissus (hypothalamus) elle a été faite au TRIzol (fiche technique 7).

Une fois l'ARN extrait, un test de contrôle qualité a été effectué pour vérifier son intégrité (fiche technique 8).

La rétro-transcription (RT PCR) est réalisé avec 300 ng d'ARN, en utilisant le kit PrimeScript RT Master Mix (TAKARA, Ozyme, RR036A) sur le thermocycler C 1000 Touch Thermal Cycler (BioRad). La PCR quantitative (qPCR) a été faite avec le kit SYBR qPCR Premix EX-Taq (TAKARA, Ozyme, RR420A) sur l'appareil StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, fiche technique 9). Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans la fiche technique 9.

4-Étude de l'expression des protéines par Western Blot

L'étude de l'expression des protéines comprend plusieurs étapes. D'abord l'extraction des protéines totales cellulaires et tissulaires est réalisée à l'aide du tampon RIPA, puis le dosage des protéines à l'aide du kit BCA Protein Assay Kit (Interchim) (Fiche technique 10) et enfin le Western Blot (fiche technique 11). Cette étude a été réalisée sur les lignées cellulaires et sur les tissus (Estomacs) des rats de J21, J80 et J450. Les anticorps ayant permis la détection des protéines d'intérêts sont listés dans le tableau 2 de la fiche technique 11.

5-Etude de l'expression/localisation des protéines ainsi que leurs interactions par immunofluorescence et Duolink

L'étude de l'expression et /ou la localisation des protéines est faite à la fois sur le modèle cellulaire et sur le modèle animal.

Concernant le modèle animal, les demi-cerveaux droits fixés au PFA 4%, ont servi pour la réalisation des coupes sagittales de 12 μ m d'épaisseur au cryostat (Microm HM 560, Thermo Scientific), qui sont ensuite utilisées pour l'immunohistochimie (fiche technique 12) et le Duolink® (fiche technique 13). Les coupes générées sont stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Le Duolink est une technique permettant la détection, la visualisation et la quantification des modifications et des interactions protéiques dans des échantillons de tissus et de cellules. La cible est détectée en utilisant un anticorps primaire, lui-même reconnu par la sonde PLA (Proximity Ligation Assay) qui est un anticorps secondaire couplé à des oligonucléotides. Ensuite la ligase va lier les deux sondes PLA et former un cercle si ces deux dernières se trouvent à proximité (40 nm). Enfin, la polymérase va amplifier le cercle et générer un produit fluorescent. Le signal est visualisé sous forme de spot fluorescent correspondant à une colocalisation des protéines.

6-Régulation de l'expression des gènes par méthylation

Durant cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés au gène « *ghréline* » dans l'estomac des mères et des rats de 21 jours issus de mères carencées ou non et supplémentées ou pas en folate durant le dernier tiers de la gestation.

Plusieurs approches ont été tentées afin d'étudier l'expression de ce gène en conditions de carence en donneurs de méthyles. Il s'agit de la technique de PCR quantitative classique, de l'analyse combinée de restriction bisulfite (COBRA) et de la technique de clonage après conversion bisulfite et séquençage des clones individuels.

Pour ce faire, l'ADN a été extrait avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) sur les tissus (estomacs) (fiche technique 14) et sur les cellules (lignée rHypoE11, rat) qui ont servi pour la validation des techniques (fiche technique 15). Ensuite les échantillons ont été bisulfités (fiche technique 16) avec le kit EZ DNA Methylation™ (Zymo Research).

Le promoteur du gène *ghréline* (numéro d'accèsion chez le rat dans GenBank : AY701847) possède 5 sites de méthylation possible (CG) dans la région promotrice (Wei et al., 2005). Concernant les techniques d'étude utilisées : PCR et COBRA, les amorces (tableau 3) utilisées permettent d'amplifier seulement les deux premiers sites CG.

6-1-Étude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes par PCR quantitative

Pour cette technique, un échantillon de foie a servi de témoin positif pour la méthylation. Il a donc été méthylé (fiche technique 16) avec le kit CpG Methylase (M.Sssl, E2030, Zymo Research) avant d'être bisulfité. Pour les échantillons d'intérêt, une bisulfitation (fiche technique 16) a été réalisée juste après extraction d'ADN. Elle convertit les cytosines non méthylées en résidus d'uracile en épargnant les cytosines méthylées. Cette étape entraîne la disparition de sites de reconnaissance de restriction contenant des cytosines et/ou l'apparition de nouveaux sites de restriction contenant de la thymine mais dépourvus de cytosines.

Ensuite le taux d'expression de ce gène dans les différentes conditions a été quantifié par qPCR, de la même manière que précédemment (fiche technique 9). Pour chaque site, nous avons dessiné un couple d'amorces reconnaissant les « cg » méthylés et un autre

reconnaissant les « cg » non méthylés. Ces dernières sont appelées : amorce site A et amorces site B méthylés ou pas et sont listées dans le tableau 3 de la fiche technique 18.

6-2-Étude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes par la technique COBRA

Cette technique permet l'analyse des modifications de locus spécifique de la méthylation de l'ADN. Elle se déroule en plusieurs étapes : premièrement, le traitement de l'ADN avec le sodium bisulfite qui convertit les cytosines non méthylées en résidus d'uracile en épargnant les cytosines méthylées. Cette étape entraîne la disparition de sites de reconnaissance de restriction contenant des cytosines et/ou l'apparition de nouveaux sites de restriction contenant de la thymine mais dépourvus de cytosines. Ensuite l'amplification PCR (fiche technique 17) permettant d'amplifier chacune des variantes de la séquence sans affecter les rapports relatifs entre elles, évitant ainsi d'introduire un biais dans la comparaison des différents échantillons. Enfin la digestion enzymatique (fiche technique 17) par les endonucléases qui reconnaissent les séquences d'ADN affectées par méthylation. La visualisation des produits de PCR clivés, se fait par électrophorèse sur gel d'agarose (voir fiche technique 8). Les amorces utilisées ici sont les amorces : sites A-B bisulfité ou pas (tableau 3).

7-Analyse statistique

L'analyse statistique a été faite avec le StatView 5 software for Windows (SAS Institute, Berkley). La comparaison des résultats a été faite par le test de variance (ANOVA) couplé à un test de Fisher.

Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

III-Résultats

Première partie :

Altérations développementales dans un modèle de carence précoce en nutriments donneurs de méthyles chez le rat : influence d'une supplémentation maternelle tardive à l'acide folique.

Developmental Impairments in Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid.

Andréa Geoffroy, **Lynda Saber-cherif**, Gregory Pourié, Déborah Helle, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié^{*,†} and Jean-Luc Daval^{*,†}.

Les régulations épigénétiques (méthylation de l'ADN, modification des histones) jouent un rôle important dans la programmation génomique au cours du développement, en régulant la prolifération cellulaire, la différenciation et l'élimination des cellules.

Les nutriments donneurs de méthyles (B9/B12) sont impliqués dans le cycle des monocarbones, essentiel pour les réactions de transméthylations via la production du S-adénosylméthionine, le donneur universel de groupements méthyles dans les réactions cellulaires. De plus, les folates et la vitamine B12 sont des régulateurs clé des concentrations en homocystéine. L'accumulation d'homocystéine peut entraîner des ruptures de l'ADN, un stress oxydant, un stress du réticulum endoplasmique, une homocystéinylation des protéines et l'apoptose.

Une carence en vitamines B9/B12 constitue un facteur de risque pour de nombreux troubles du développement, tels que les malformations cardiaques congénitales et les anomalies de fermeture du tube neural. Cela a conduit à des politiques de santé recommandant une supplémentation périconceptionnelle en folate, jusqu'à la fin du premier trimestre de grossesse.

Nous avons précédemment montré dans un modèle de carence gestationnelle en vitamines B9/B12 chez le rat, que le déficit en donneurs de méthyles s'accompagnait d'anomalies du développement, d'un déficit pondéral et de troubles cognitifs irréversibles (Blaise et al., 2007 ; Kerek et al., 2013 ; Geoffroy et al., 2017).

Le développement cérébral se poursuit pendant les périodes périnatale et postnatale, surtout en termes de maturation, de synaptogenèse et d'élaboration des circuits neuronaux complexes. Des altérations de l'environnement prénatal peuvent ainsi avoir une influence significative sur le développement ultérieur et la maturation fonctionnelle du système nerveux central.

L'objectif de cette étude était d'évaluer si une supplémentation maternelle tardive en acide folique s'étendant du dernier tiers de gestation jusqu'au sevrage des rats, pouvait être

bénéfique et améliorer les effets délétères d'une carence précoces en donneurs de méthyles observés à l'âge de 21 jours.

Les résultats obtenus ont montré qu'une carence en donneurs de méthyles au cours de la période embryonnaire donne lieu à des retards de croissance qui se manifestent par une baisse significative de la taille, du poids corporel et de la longueur du fémur des rats de 21 jours. Il a également été observé des anomalies de fermeture du tube neural de type spina bifida. Au niveau cérébral, la carence en donneurs de méthyles était associée à une diminution de la taille et du poids du cerveau. Dans l'hippocampe, il a été mis en évidence une diminution de l'épaisseur des couches cellulaires du CA1, CA3, du gyrus denté, mais aussi de la zone subventriculaire, aboutissant à une atrophie cérébrale.

Ces phénomènes étaient associés à une altération de l'expression de microARNs (Let-7, miR-34a, miR-23a) intervenant dans la différenciation, la division et l'apoptose cellulaire lors du développement embryonnaire.

L'analyse du développement neurocomportemental à travers les tests de « Righting reflex », « Negative geotaxis » et du labyrinthe aquatique a montré que les rats déficients étaient moins performants que les animaux témoins.

La supplémentation maternelle tardive en acide folique n'empêche pas l'apparition d'anomalies développementales précoces liées aux défauts de fermeture du tube neural ; en revanche, elle en améliore le phénotype global des animaux déficients en agissant sur les phénomènes d'ossification qui sont plus tardifs et il a été observé un canal vertébral mieux formé chez les rats dont la mère a reçu une supplémentation en folate. De plus, cette supplémentation a réduit le retard de croissance, le déficit pondéral, mais aussi les défauts d'apprentissage des rats déficients. De manière globale, cette récupération était beaucoup plus prononcée au niveau du cerveau, avec une restauration significative des paramètres étudiés : poids et taille du cerveau, épaisseur des couches cellulaires des zones CA1, CA3, gyrus denté de l'hippocampe et de la zone subventriculaire. Selon nos résultats, elle ferait notamment intervenir une régulation de microARNs impliqués dans le développement, tels que miR-34a et miR-23a.

Cette étude serait en faveur de la poursuite d'une supplémentation en folate au-delà du premier trimestre de gestation chez la femme, afin de prévenir tout effet délétère d'une carence en donneurs de méthyles sur la maturation et la plasticité cérébrale. Article présenté en annexe, page 156.

Deuxième partie :

**Persistance d'une inflammation de la muqueuse
gastrique chez le rat adulte et âgé après exposition
fœtale et postnatale précoce à une carence en donneurs
de méthyles**

—

Étude du système à Ghréline.

Les résultats présentés en première partie montrent qu'une carence gestationnelle en vitamines B12 et B9 induit un retard de croissance et un déficit pondéral définitif chez le raton MDD. Les travaux antérieurs publiés par le laboratoire montrent chez ces ratons une inflammation et une altération de l'organisation de la muqueuse gastrique responsable d'une diminution de la concentration plasmatique en Ghréline :

- *Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat.* Bossenmeyer-Pourié C, Blaise S, Pourié G, Tomasetto C, Audonnet S, Ortiou S, Koziel V, Rio MC, Daval JL, Guéant JL, Beck B. Am J Pathol. 2010 Jan;176(1):270-7.
- *Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through N-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation.* Bossenmeyer-Pourié C, Pourié G, Koziel V, Helle D, Jeannesson E, Guéant JL, Beck B. FASEB J. 2013 Jun ; 27(6) : 2185-97

Cette inflammation gastrique et l'altération du système endocrine à Ghréline pourrait participer au retard de croissance et au déficit pondéral irréversibles du raton MDD. La Ghréline étant une hormone orexigène également capable de stimuler la libération de l'hormone de croissance (GH) via sa liaison au récepteur GHS-R1a (growth hormone secretagogue receptor type 1a) (Kojima et al., 1999).

Suite à ces travaux nous nous sommes posé la question du devenir de la muqueuse gastrique et du système endocrine à Ghréline lorsque le raton MDD retourne à une alimentation normale au moment du sevrage. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet font actuellement l'objet de l'écriture d'un article présenté ci-dessous.

[1-Persistence of the gastric mucosa inflammation in adult and old rats after fetal and early post-natal exposure to methyl donor deficiency](#)

Saber-cherif L., Pourié G., Daval J.L., Helle D., Alberto J.M., Guéant J.L., Beck B*., Bossenmeyer-Pourié C. *

I-Introduction

Les besoins en vitamines B9 et B12 augmentent pendant la grossesse et l'allaitement et durant cette période, la carence en donneurs de méthyles peut affecter gravement le développement fœtal, être responsable d'un avortement précoce, d'une prééclampsie, d'anomalies du tube neural et de retard de croissance intra-utérin (Mattson and Shea, 2003; Obeid and Herrmann, 2011). De telles carences induisent une augmentation de l'homocystéine plasmatique, ainsi que son accumulation toxique dans divers tissus (Paul and Selhub, 2017).

Nos travaux antérieurs, ont montré qu'une carence en vitamines B9/B12 durant la gestation ainsi que l'allaitement, induisait un déficit pondéral de 50% associé à une perte de coordination locomotrice et une altération des capacités d'apprentissage et de mémorisation. Ces derniers effets étaient liés à des altérations cérébrales, en particulier de l'hippocampe et du cervelet, et sont comparables aux altérations cognitives observées chez les sujets âgés présentant une diminution du taux de folates et de vitamine B12 (Blaise et al., 2007).

Le retard de croissance est probablement lié à une communication défectueuse entre le cerveau et les informations métaboliques périphériques. L'estomac, un acteur majeur de cette communication, est particulièrement sensible à la carence en donneurs de méthyles. Ainsi, la carence en B12 est associée à différents types de gastrites et d'atrophie (Sipponen et al., 2003). La gastrite associée à l'anémie pernicieuse est due à une malabsorption de la vitamine B12 et est caractérisée par une hypochlorhydrie, d'importantes modifications des cellules oxyntiques gastriques et des modifications hormonales telles qu'une gastrinémie élevée (Magnusson et al., 1985; Testino et al., 1993). Nos travaux ont montré qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles (B12/B9 : MDD) est associée à une malformation de la muqueuse gastrique caractérisée par une perte de la polarité cellulaire, une migration cellulaire anarchique, une différenciation anormale des progéniteurs, une apoptose accrue et des signes d'érosion de la muqueuse (Bossenmeyer-Pourrié et al., 2010). Le remodelage de l'organisation cellulaire gastrique affecte les cellules zymogènes et endocrines (Bossenmeyer-Pourrié et al., 2010), affectant ainsi la sécrétion du facteur intrinsèque, requis pour l'absorption de la vitamine B12 (Nicolas and Guéant, 1995), et de la Ghréline, une hormone orexigène jouant également un rôle significatif dans la croissance en stimulant la libération de l'hormone de croissance (Kojima and Kangawa, 2005). Chez les rats déficients (MDD), les cellules à Ghréline sont anormalement situées dans la partie supérieure (Pit) de la glande oxyntique au lieu d'être localisées à la base. De ce fait, la Ghréline est libérée dans la lumière gastrique au lieu d'être sécrétée dans le sang et la concentration plasmatique en Ghréline est

diminuée chez les rats à 21 jours. Cette sécrétion anormale de la Ghréline pourrait participer au retard de croissance observé chez les rats (Bossenmeyer-Pourié et al., 2013).

La poursuite du régime MDD après le sevrage entraîne une mortalité importante chez le raton (70%) tandis qu'un retour à une alimentation normale s'accompagne majoritairement de la survie de l'individu (98%). Est-ce que cette survie de l'individu s'accompagnait d'une restauration de la morphologie fonctionnelle de l'estomac ?

Afin de répondre à cette question nous avons étudié les effets d'un retour à une alimentation normale sur des rats MDD de 21 jours nourris avec un régime normal pendant 60 jours et 430 jours, les rats seront donc âgés de 80 jours et de 450 jours lors de leur mise à mort.

Plusieurs paramètres ont été mesurés, telle que le poids et la taille de l'individu, ses paramètres biochimiques plasmatiques, les marqueurs de l'inflammation, de l'apoptose et du stress oxydant parallèlement à des études histologiques et morphologiques de l'estomac.

II Résultats

1-Les rats MDD présentent un déficit pondéral définitif associé à une augmentation de l'homocystéinémie

Le poids et les mesures des concentrations plasmatiques de vitamines B9, B12 et d'homocystéine des rats à 80 et à 450 jours ont été effectués. Les résultats du tableau 1 montrent une diminution significative du poids corporel des rats MDD à 80 jours ainsi qu'à 450 jours comparés aux contrôles. Les taux de vitamines B9 et B12 restent légèrement diminués chez le MDD mais de manière non significative. Tandis que le taux d'homocystéine est significativement plus élevé chez les rats carencés à 80 jours et à 450 jours par rapport à leurs contrôles.

Tableau 1: Poids corporel, taux plasmatique de vitamines du groupe B et concentration d'homocystéine (moyenne+SEM) chez des rats témoins âgés de 80 et 450 jours et chez des rats Wistar déficients en donneurs de méthyles (MDD)

*** : p<0.001 entre les groupes, ** : p<0.01 entre les groupes

	Controls	MDD
Adult D80		
Body weight (g)	266.4 ± 20.2	184.2 ± 7.1***
Vitamin B9 (nM)	135.6 ± 7.8	125.7 ± 8
Vitamin B12 (nM)	721.2 ± 41.1	688.1.5 ± 55.7
Homocysteine (µM)	4.3 ± 0.3	6.8 ± 1.3**
Adult D450		
Body weight (g)	498.6 ± 26.1	412.6 ± 26.2***
Vitamin B9 (nM)	105.4 ± 10.0	122.8 ± 11.9
Vitamin B12 (nM)	578.2 ± 19.8	602.2 ± 35.1
Homocysteine (µM)	4.5 ± 0.2	5.4 ± 0.2***

2- Une MDD gestationnelle est responsable d'altérations irréversibles de l'estomac

Malgré un retour à une alimentation normale et une normalisation des teneurs plasmatiques en vitamines B9 et B12, les rats MDD présentent une homocystéinémie plus élevée et un déficit pondéral, même à 450 jours. Nous avons alors étudié l'impact que cette homocystéinémie plus élevée pouvait avoir sur l'organisation de la muqueuse gastrique.

Les résultats de la figure 19A, ont montré qu'à 80 jours, la taille de l'estomac est réduite de manière significative dans sa globalité chez l'individu carencé. Les différentes parties :

Fundus, Body et Antre sont affectées de manière équivalente. Les mêmes résultats sont observés à 450 jours (figure 19B) et ces altérations sont visibles sur la figure 19C.

Ces résultats montrent que la carence en donneurs de méthyles durant la période gestationnelle induit des altérations irréversibles de l'estomac.

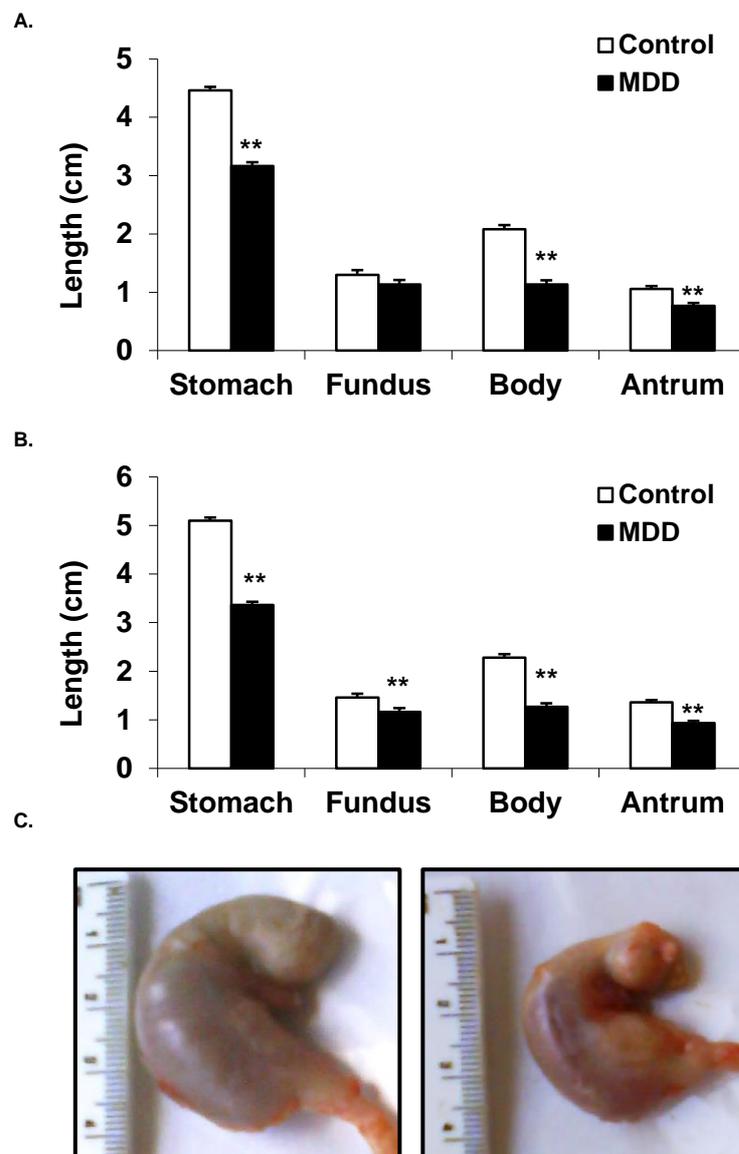


Figure 19: Analyse morphologique de l'estomac, ainsi que de ses différentes parties : Fundus, Body et l'Antre des rats exposés à un régime carencé (MDD) pendant la période gestationnelle.

A : Longueur de l'estomac et des différentes parties à 80 jours, B : longueur de l'estomac ainsi que des différentes parties à 450 jours, C : photographies de l'estomac : à gauche le contrôle à 450 jours, à droite le MDD à 450 jours.

3-L'accumulation tissulaire d'homocystéine s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose dans la muqueuse gastrique

Sur la figure 20A on peut noter une accumulation importante d'homocystéine dans la glande gastrique du rat MDD à 80 jours et à 450 jours. La détection des cellules apoptotiques par le test Apoptag montre une augmentation significative du nombre de cellules positives à 80 jours et à 450 jours (figures 20B, 20C) chez les rats MDD par rapport aux rats contrôles. Cependant cette différence diminue à 450 jours, ce qui suggère qu'avec le temps une certaine restauration, bien que partielle, se met en place. La figure 20D confirme ces résultats, les caspases 3 et 9 sont plus activées chez les rats MDD, mais cette activation est moins importante à 450 jours, qu'à 80 jours en particulier pour la caspase 9.

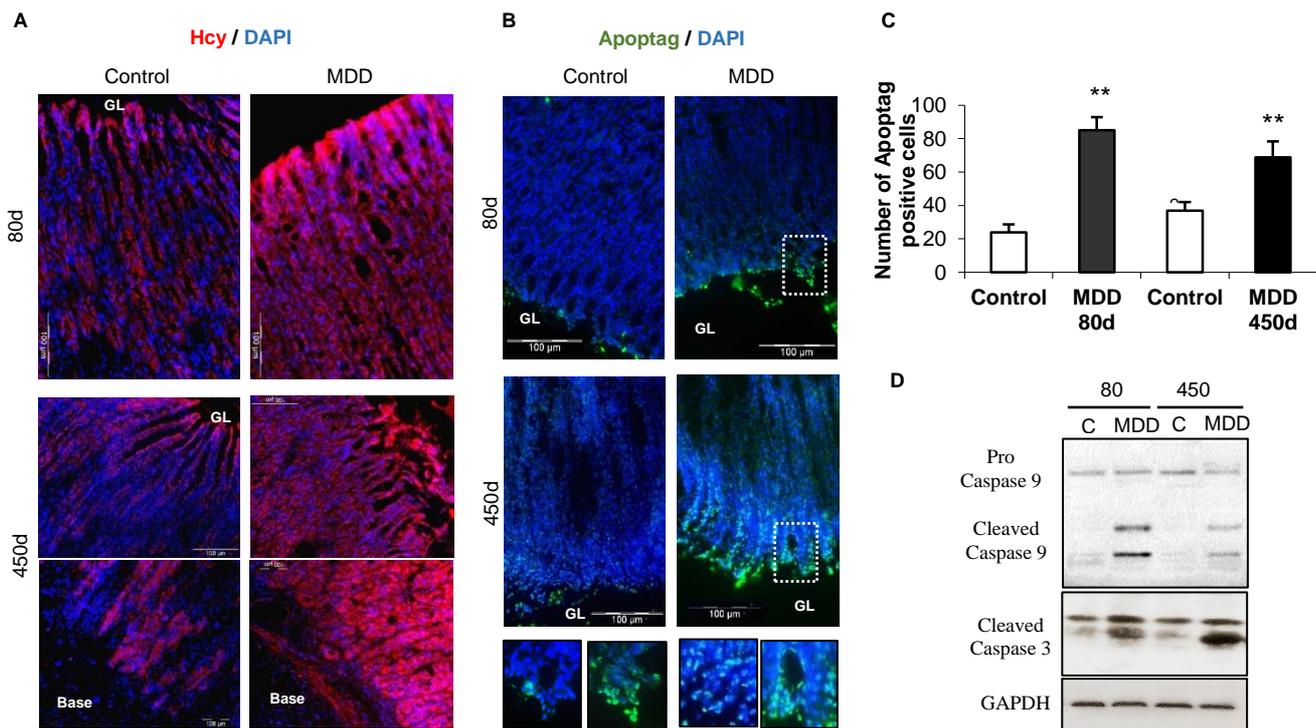


Figure 20: Marquage de l'homocystéine et de l'apoptose au niveau des cellules de la muqueuse gastrique.

MDD : rats nourris avec le régime déficient en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement.

A : Immunomarquage de l'homocystéine dans la glande gastrique, B : détection de l'apoptose par le test Apoptag, les cellules positives sont vertes et les encadrés en pointillés des parties supérieures des glandes sont agrandis en bas de la figure. C : Comptage du nombre de cellules positives au test Apoptag. D : Étude par western blot de l'activation des Caspase 3 et 9. Orientation de la muqueuse gastrique : Base et lumière gastrique (GL).

4-La MDD engendre une accumulation et une perte de fonctions des formes N-homocystéinylées de l'actine et de la E-cadhérine.

Nos travaux antérieurs ont mis en évidence une N-homocystéinylation de l'actine et de la E-cadhérine chez les embryons et les rats MDD de 21 jours (Bossenmeyer-Pourie et al., 2013). Les rats MDD ayant toujours une homocystéinémie plus élevée à 450 jours, nous avons analysé ce processus par immunoprécipitation (Figure 21A et 22A) et Duolink (Figure 21B et 22B) après un retour à une alimentation normale. Les résultats obtenus montrent une

accumulation irréversible des formes homocystéinylées d'actine et d'E-Cadhérine associée à une diminution de leur expression respective (Figure 21C et 22C) et à une perte d'interaction fonctionnelle avec leurs partenaires, la vinculine pour l'actine et la β -catenin pour la E-cadherine. (Figure 21D et 22D). Cependant à 450 jours cette perte d'interaction fonctionnelle, bien que significative est moins marquée qu'à 21 ou 80 jours, en accord avec nos résultats précédents qui suggèrent une récupération partielle de l'organisation de la muqueuse gastrique.

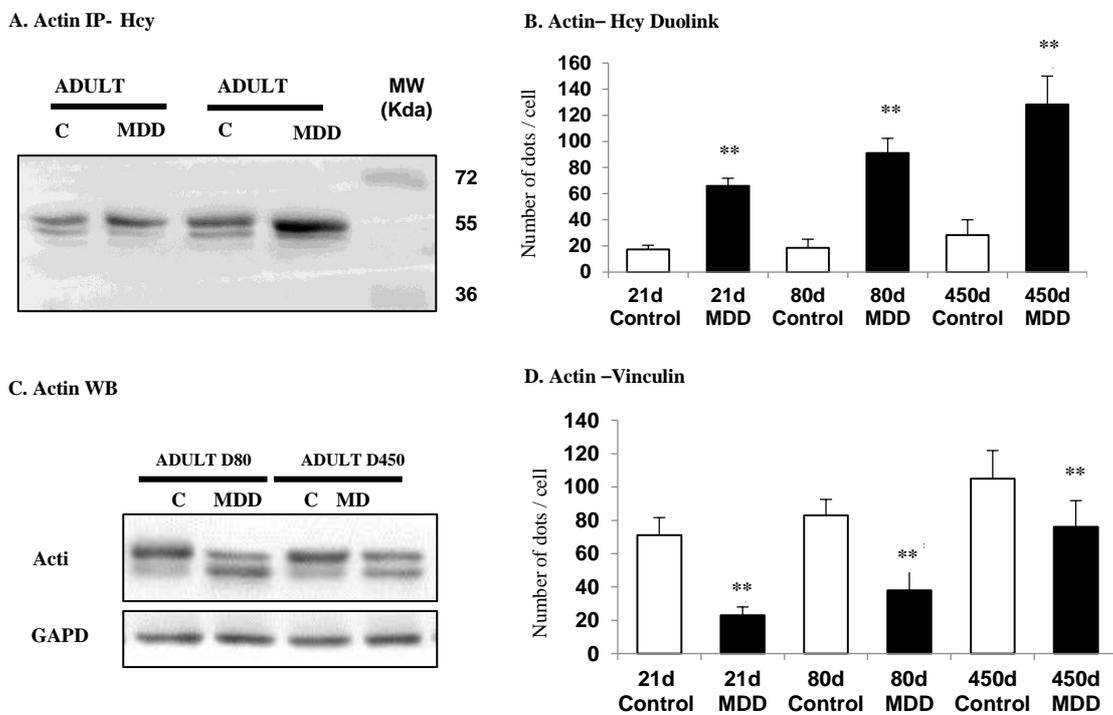


Figure 21: Interactions des protéines du cytosquelette dans la glande gastrique des rats âgés de 21 jours, 80 jours et 450 jours.

A: Immunoprécipitation Actine-Hcy, B: Duolink Actine-Hcy, C: Western Blot Actine, D: Duolink Actin-Vinculin.

C : rats contrôles, MDD : rats nourris avec le régime déficient en donneurs de méthyles pendant la gestation et l'allaitement. ** $p \leq 0.01$.

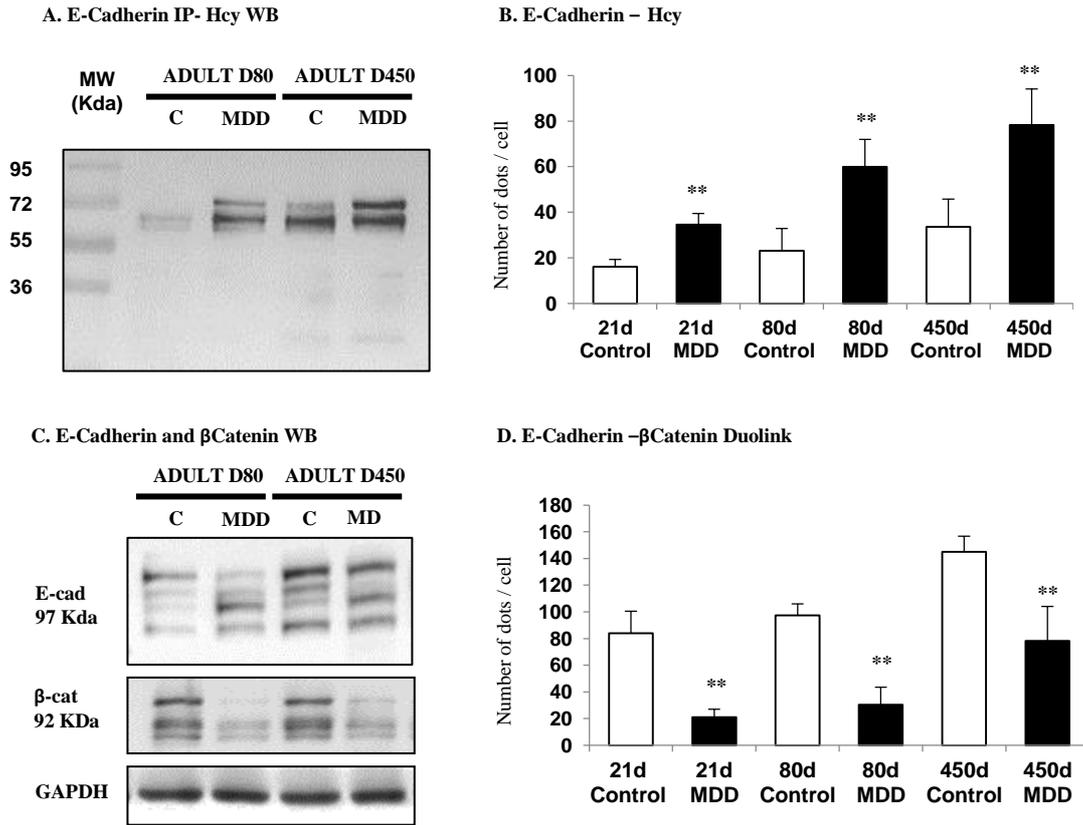


Figure 22: Interaction de la E-cadherine et de la β -catenin dans la glande gastrique des rats contrôles et déficients (MDD) à différents âges : 21jours, 80 jours et 450 jours.

A: Immunoprécipitation E-cadherin-Hcy, B: Duolink E-cadherin-Hcy, C: Western Blot E-cadherine et β -Catenin, D: Duolink E-cadherine- β -Catenin. ** $p \leq 0.01$

5. La MDD induit une inflammation chronique de la muqueuse gastrique en lien avec une activation maintenue de la voie NFκB.

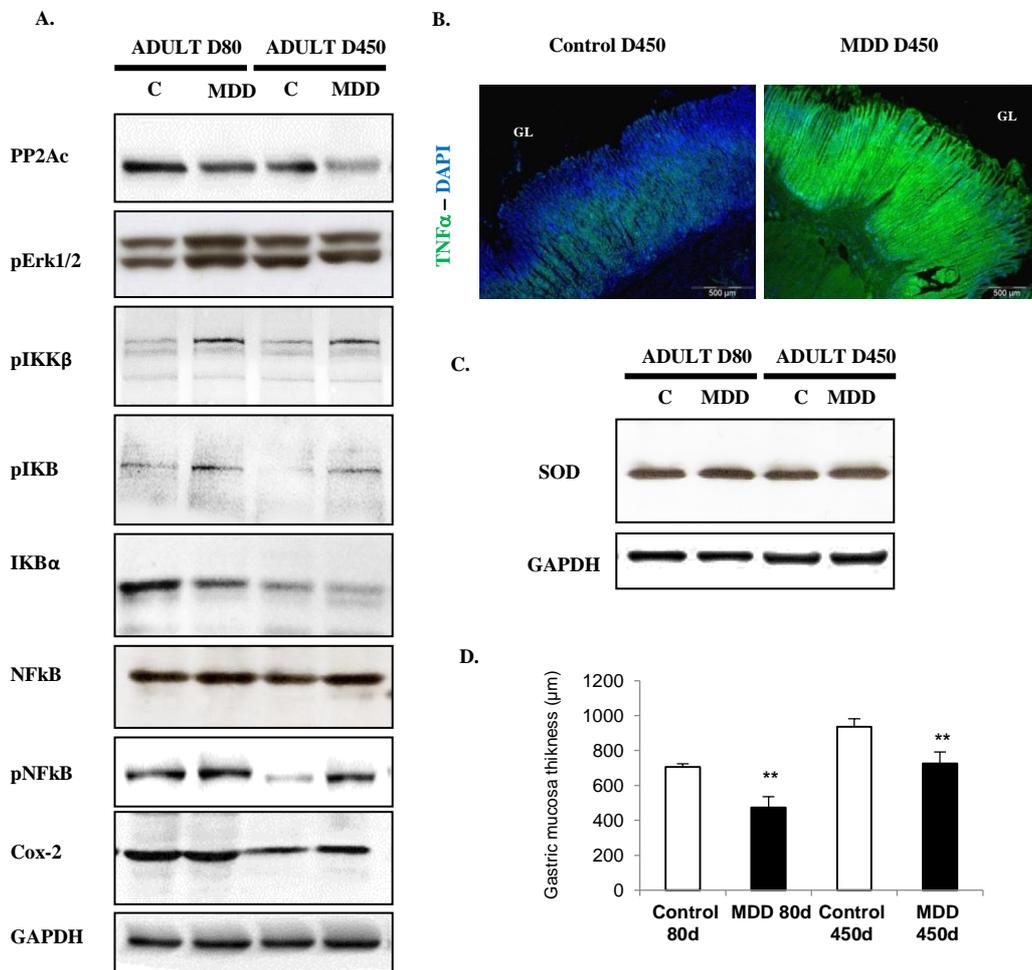


Figure 23: Analyse de l'expression de marqueurs de l'inflammation, du stress oxydant et de la voie NFκB dans la muqueuse gastrique des rats carencés (MDD) à 80 jours et à 450 jours par rapport aux contrôles (C).

A : WB voie NFκB, B : Immunohistochimie TNFα, C : WB SOD, D : mesure de l'épaisseur de la muqueuse gastrique, GL : Lumière gastrique.

La N-homocystéinylation des protéines engendre des résidus homocystamides pro-oxydants et toxiques pour la cellule (Sibrian-Vazquez M, 2010) et une inflammation de la muqueuse gastrique des embryons et rat MDD de 21 jours (Bossenmeyer-Pourié et al., 2013).

Nos résultats des figures 19 à 22 montre une accumulation d'homocystéine, de protéines N-homocystéinylées et une augmentation de l'apoptose associés à des anomalies définitives de l'estomac. Nous avons alors analysé le rôle joué par le stress oxydant et l'inflammation dans ces dommages irréversibles de l'estomac.

Le Western Blot (figure 23A) montre l'expression des acteurs de la voie NFκB. Chez les rats MDD à 80 jours ainsi qu'à 450 jours on note une diminution de l'expression de PP2Ac (Protein Phosphatase 2A) par rapport aux témoins, cette diminution de l'expression est plus marquée chez le MDD à 450 jours. On note également une augmentation de l'expression des formes phosphorylées des kinases Erk1 et 2 (MAPK) ce qui conduit à la stimulation de la phosphorylation de IKK β (Inhibitor of κ B Kinase β), à la dégradation de I κ B α (Inhibitor of κ B α) et à la libération de NFκB chez les rats MDD (80 jours et 450 jours). Cette libération de NFκB permet son activation par phosphorylation sur les résidus Sérine par les Kinases Erk1/2. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de pNFκB chez les sujets carencés surtout à 450 jours. La translocation nucléaire de NFκB actif (phosphorylé) induit l'expression de gènes cible, tel que COX-2 dont le niveau augmente chez le MDD notamment à 450 jours.

Pris dans leur ensemble ces résultats montrent que la voie NFκB, qui était stimulée au cours de la carence chez les embryons MDD et les rats de 21 jours, reste active malgré un retour à une alimentation normale. Nous avons pu relier cette activité à une importante accumulation de l'expression de TNF α (figure 23B) et de la SOD (figure 23 C) au niveau de la muqueuse gastrique des rats MDD à 450 jours. Cette expression de marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant pourrait expliquer l'augmentation de la mort cellulaire, en particulier dans la partie supérieure de la muqueuse (figure 20B) et la diminution de l'épaisseur de la muqueuse gastrique représentée dans la figure 23D. Cette différence dans l'épaisseur de la muqueuse entre les rats témoins et carencés est plus prononcée à 80 jours qu'à 450 jours, ce qui confirme une récupération partielle de l'épithélium.

6-La MDD perturbe de manière irréversible l'organisation cellulaire de la glande gastrique

Nos travaux antérieurs ont montré que l'homocystéinylation des protéines du cytosquelette et l'inflammation engendrées par la MDD perturbaient la programmation fœtale de l'organisation cellulaire au sein de la glande gastrique (Bossenmeyer-pourié et al., 2010 et 2013). L'estomac présente une muqueuse à renouvellement cellulaire constant, suite au passage à une alimentation normale au sevrage des rats MDD, on pouvait s'attendre à retrouver une organisation cellulaire normale dans cette muqueuse. Nous avons analysé l'organisation cellulaire de la glande gastrique en utilisant les lectines UEA1 et GSII spécifiques du mucus produit respectivement par les cellules de surfaces (Mucous Pit cells) ou de la base de la glande (Mucous Neck cells). Nous avons également étudié la localisation des cellules pariétales par le marquage de la pompe à proton (Parietal cells), des cellules exocrines produisant le facteur intrinsèque (FI cells) et des cellules endocrines qui sécrètent la Ghrelina (Ghrelin cells). Les résultats sont présentés sur les figures 24 et 25.

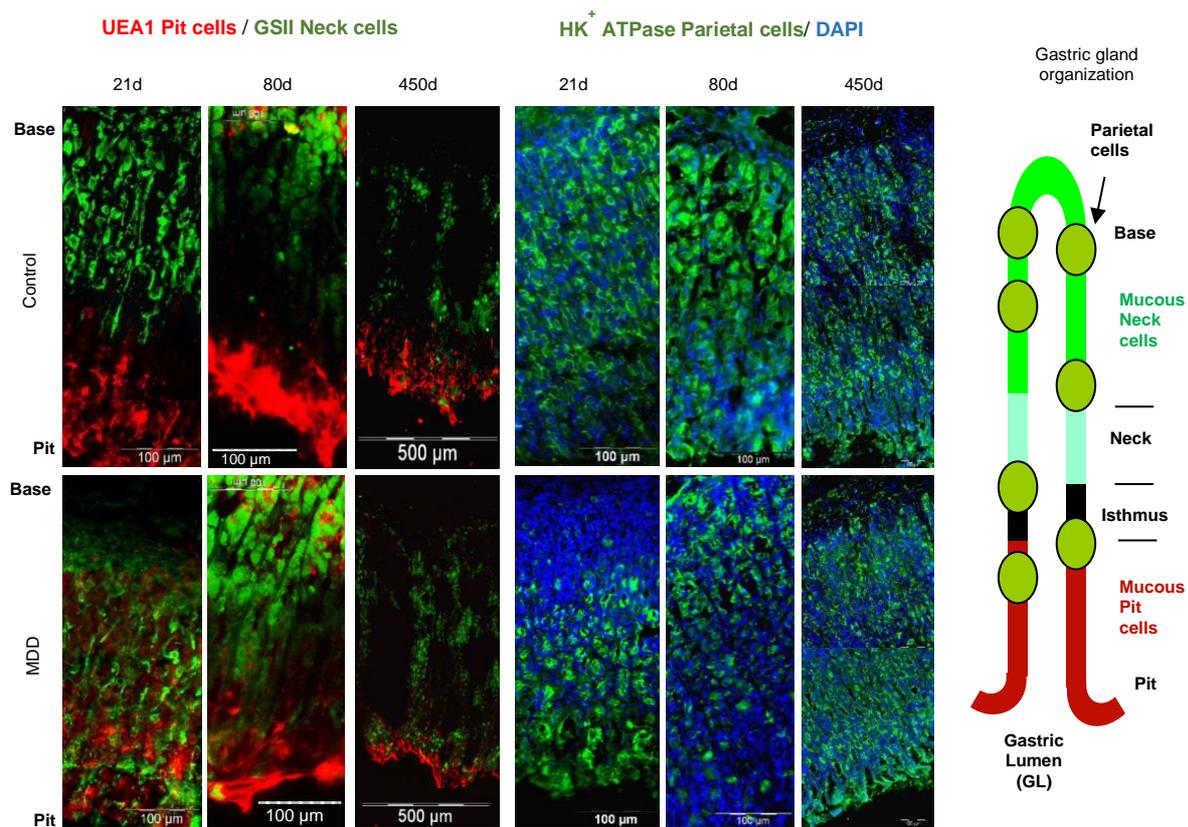


Figure 24: Immunohistochimie des mucous pit cells et Neck cells et des cellules pariétales ($HK^+ ATPase$) au niveau de la glande gastrique à 21 jours, 80 jours et 450 jours chez les rats carencés (MDD) et contrôles (C).

Concernant la localisation des Pit cells / Neck cells (figure 24), à partir de 21 jours chez le rat contrôle les deux types cellulaires sont bien séparés avec une localisation des Neck cells au niveau de la base et des Pit cells au niveau de la partie supérieure de la glande gastrique. Chez le rat MDD à 21 jours ces deux types cellulaires sont mélangés de manière anarchique sur toute la hauteur de la glande. A partir de 80 jours on note une certaine amélioration, la séparation des deux types cellulaires commence à se faire avec une présence encore marquée des pit cells (en rouge) à la base. A 450 jours, la localisation de ces deux populations cellulaires semble identique chez les rats contrôles et MDD cependant on note une réduction importante de la population des cellules à mucus de surface (Pit cells en rouge).

Les cellules pariétales sont localisées dans les deux tiers inférieurs de la glande chez le rat contrôle à 21 jours, tandis que chez le rat MDD, on note une localisation plus prononcée au

niveau dans la partie supérieure. A partir de 80 jours cette localisation commence à se normaliser et on ne note plus de différence à 450 jours (Figure 24).

Les cellules exocrines sécrétant le facteur intrinsèque (FI) et les cellules endocrines produisant la Ghréline présentent des anomalies de localisation en haut des glandes gastriques chez le raton MDD de 21 jours (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010). Ces anomalies sont encore visibles à 80 jours (Figure 25B). A 450 jours nous n'observons plus de différences de localisation pour les cellules à FI par contre quelques cellules endocrines à Ghréline sont encore localisées de manière anormale dans la partie haute des glandes gastriques des rats MDD.

Ces résultats suggèrent que si une grande partie de l'organisation cellulaire de la glande gastrique est restaurée après un retour à une alimentation normale à 21 jours, il persiste toutefois des anomalies affectant la partie supérieure de la glande et se manifestant par une réduction du nombre de cellules à mucus de surface et la présence de cellules endocrine de la base.

7-Un retour à une alimentation normale permet une normalisation progressive des teneurs plasmatiques en Ghréline

Les anomalies de localisation des cellules à Ghréline dans la partie supérieure de la glande aboutissent à sa sécrétion dans la lumière gastrique au lieu d'être libérée dans le sang. Cela se manifeste par une diminution significative des teneurs plasmatiques en Ghréline chez le raton MDD de 21 jours (Figure 25A). Cette diminution persiste à 80 jours malgré l'arrêt de la carence au sevrage et en accord avec l'anomalie de localisation des cellules à Ghréline toujours visible à ce stade (Figure 25B). A 450 jours il persiste quelques anomalies de localisation des cellules endocrines à Ghréline dans la partie supérieure des glandes, cependant la majorité ces cellules sont localisées à la base et les taux plasmatiques ne montrent plus de différences avec les témoins.

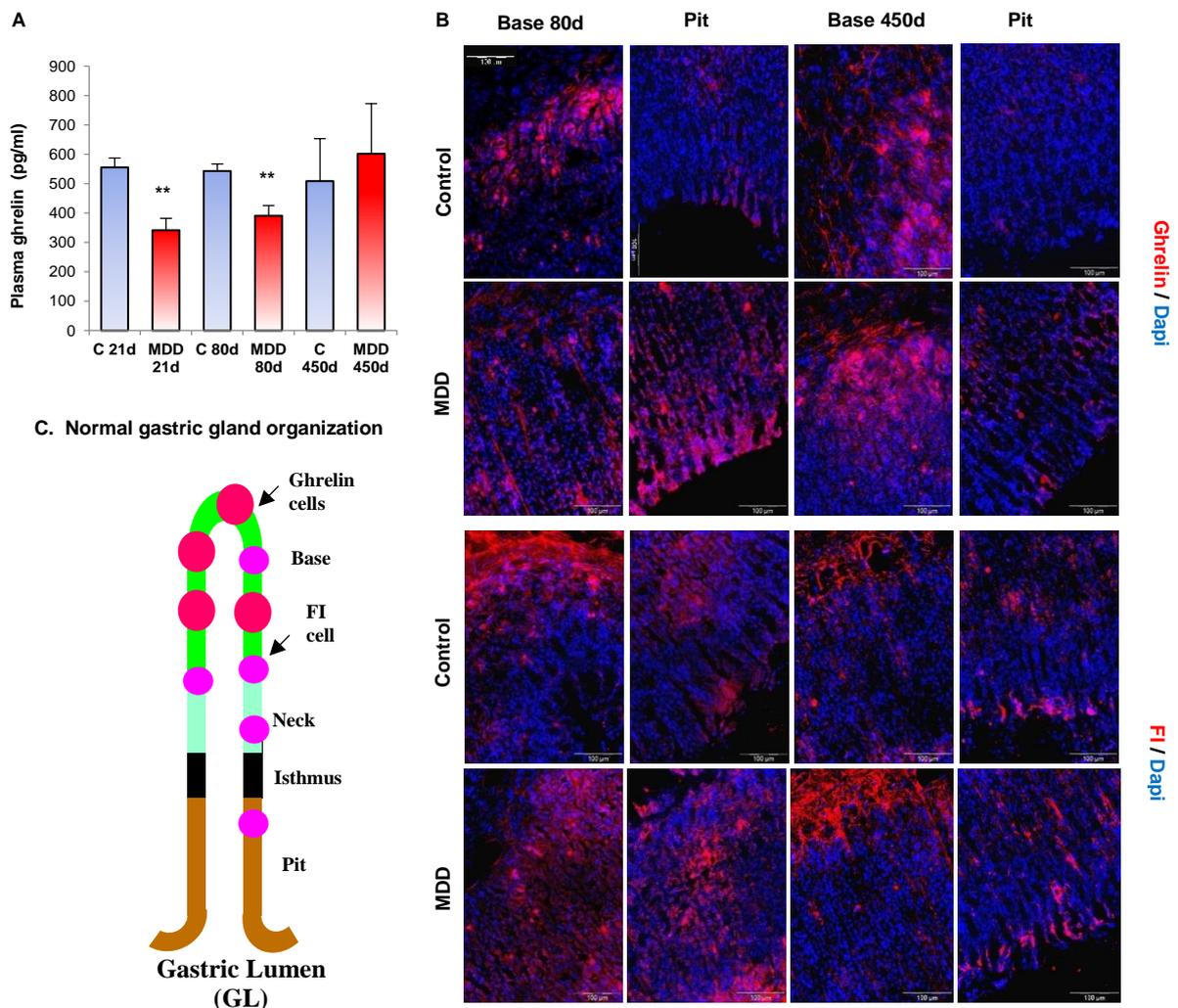


Figure 25: Analyse du système exocrine à FI et endocrine à ghréline dans la glande gastrique.

Teneur plasmatique en Ghréline (A), Marquage immunohistochimique des cellules exocrines à FI (facteur intrinsèque) et endocrines à Ghréline dans la glande gastrique chez les rats témoins et MDD à 80 et 450 jours (B), Schéma de l'organisation normale de la glande gastrique (C).

III. Discussion

Les carences en donneurs de méthyles sont fréquentes pendant la grossesse en raison des besoins accrus. Ces carences induisent une accumulation toxique d'homocystéine dans les tissus (Bossenmeyer-Pourié et al., 2013). L'estomac est l'un des premiers organes touchés par cette carence du fait de sa sensibilité particulière. L'anémie pernicieuse due à une malabsorption de la vitamine B12 induit d'importantes modifications des cellules oxyntiques gastriques et hormonales (Magnusson et al., 1985; Testino et al., 1993). La carence en B9/B12 est associée à une malformation de la muqueuse gastrique caractérisée par une perte de la polarité cellulaire, une migration cellulaire anarchique, une différenciation anormale des progéniteurs et enfin une apoptose et des signes d'érosion de la couche superficielle (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010). Cette étude avait pour objectif d'évaluer les effets d'un retour à une alimentation normale sur la muqueuse gastrique au sevrage des rats, nés de mères carencées en donneurs de méthyles.

Pris dans leur globalité, les résultats de cette étude montrent qu'une MDD précoce engendre des anomalies irréversibles. Les concentrations plasmatiques d'homocystéine restent significativement élevées et sont associées à une diminution significative du poids corporel des rats, se traduisant par un retard de croissance même après 430 jours d'alimentation normale. L'estomac est nettement touché par la carence en donneurs de méthyles. On a noté une diminution significative et définitive de sa taille ainsi que de l'épaisseur de la muqueuse gastrique. Ces changements anatomiques irréversibles, suggèrent que la période gestationnelle et périnatale est une période critique des effets délétères de la MDD.

Parmi ces effets délétères, nous avons montré que l'intégrité de la muqueuse gastrique était affectée par une perturbation de la balance entre l'apoptose et la prolifération cellulaire. Or une mort cellulaire excessive est associée aux phénomènes d'ulcérations gastriques et d'érosion responsable de gastrites atrophiques et d'ulcères peptiques (Moss et al., 1996).

Les travaux antérieurs du laboratoire (Bossenmeyer-Pourié et al., 2013) ont montré que la cytotoxicité de l'accumulation tissulaire d'homocystéine est fortement liée à une interaction avec les protéines structurelles. Ces résultats ont été confirmés dans notre modèle animal où nous observons une persistance de la N-homocystéinylation de l'actine et de l'E-cadherine qui perturbe leurs interactions avec les protéines partenaires (Actine-Vinculine, E-Cadherine- β Catenin). Tous ces changements contribuent à la désorganisation de la muqueuse gastrique en altérant la motilité cellulaire et les interactions cellulaires. L'accumulation au cours du

temps des homocystamides tissulaires formés pourrait être responsable du stress oxydant que nous observons (Perna et al., 2003 ; Sibrian-Vasquez et al., 2010). Le stress oxydant stimule la production de facteurs inflammatoires, comme Cox-2 , des cytokines (TNF α) et des interleukines (Bai et al., 2007; Cheung et al., 2008), via l'activation de la voie NF κ B. Il a été montré que l'expression de Cox-2 est induite par les cytokines durant l'inflammation et /ou l'ulcération gastrique (Smith et al., 2011; Takahashi et al., 1998). L'inflammation est un signal alarmant de l'agression tissulaire. Dans notre modèle animal nous avons constaté une persistance de l'activation de la voie NF κ B associée à une surexpression de Cox-2, et une accumulation tissulaire du TNF qui pourrait conduire à la mort cellulaire par apoptose que nous observons (Bergmann et al., 1994). Ces résultats montrent que malgré un retour à une alimentation normale, il y a chez le rat MDD une persistance du statut inflammatoire de la muqueuse gastrique responsable de son érosion.

La glande oxyntique de la muqueuse gastrique où sont localisées les cellules à Ghréline (Cellules X/A), montre une organisation cellulaire bien précise (Karam et al., 2003). Normalement, les cellules entéroendocrines localisées à la base se renouvellent rapidement, entrent dans un mécanisme de mort cellulaire et migrent vers le haut de la glande gastrique (partie « Pit ») pour être extrudées dans la lumière gastrique (Hall et al., 1994).

Dans notre modèle de rat, ce phénomène est bien illustré. A 21 jours les cellules sécrétant la Ghréline sont localisées dans la partie « Neck », où se trouvent les cellules souches, à la base avec quelques rares cellules dispersées au sommet chez le rat contrôle. Chez les rats MDD, l'activation des processus apoptotiques et la perturbation des interactions cellulaires accélèrent la migration vers la partie « Pit » et les cellules à Ghréline mourantes s'accumulent près de la lumière. Ce phénomène est également valable pour les mucus Neck cells/Pit cells et les cellules sécrétant le facteur intrinsèque (FI) (Bossenmeyer-Pourié et al., 2013).

Les cellules endocrines à Ghréline et les cellules exocrines à FI ont des schémas sécrétoires opposés, la Ghréline est sécrétée dans le sang tandis que le FI est libéré dans la lumière gastrique (Karam et al., 2003). Ainsi, la localisation anormale de certaines cellules à FI dans la région du « Pit » n'aurait pas de conséquences néfastes chez le rat MDD (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010).

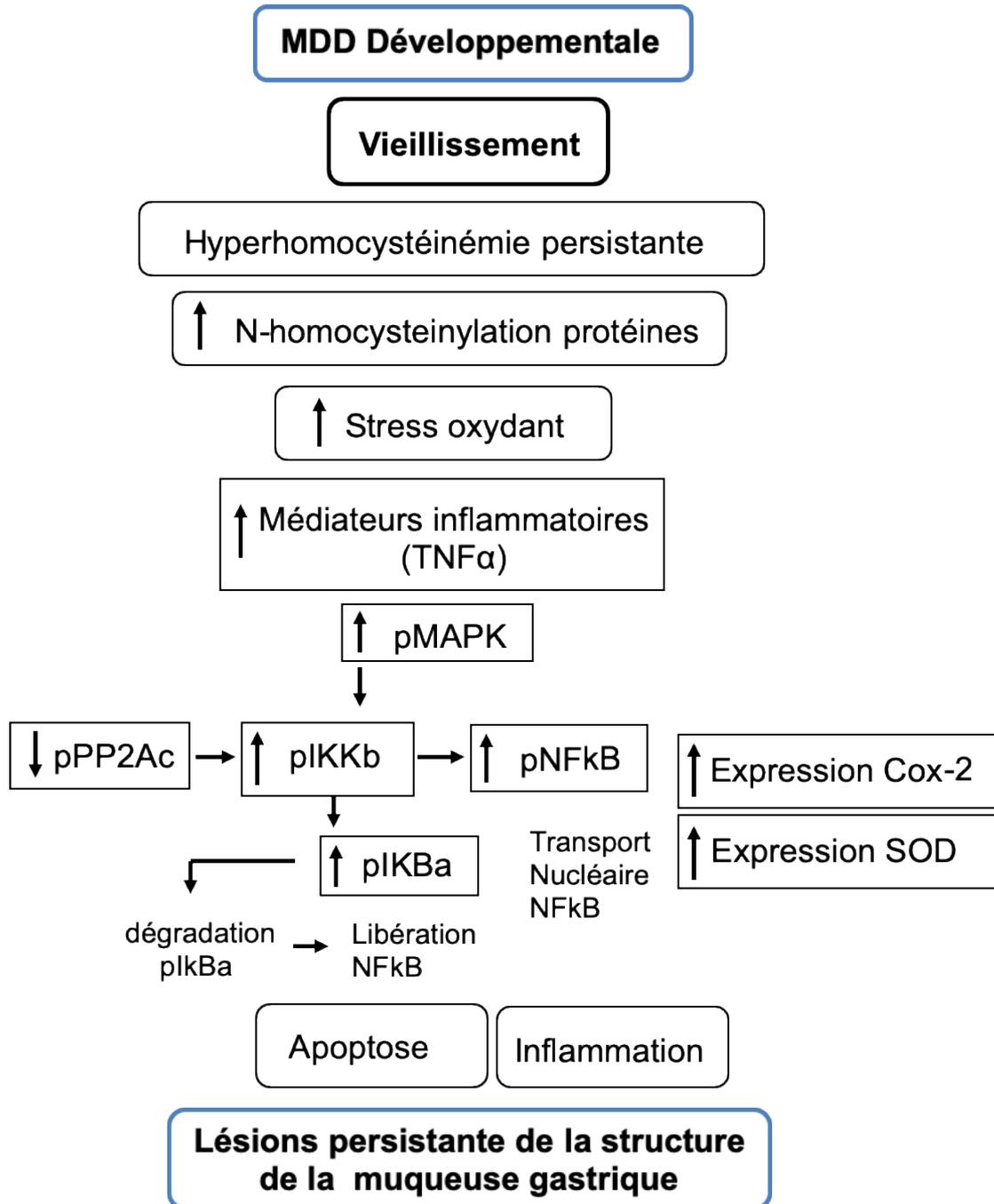
Chez les rats carencés l'accumulation des cellules à Ghréline dans la région « Pit », conduit à sa libération dans la lumière gastrique où elle est dégradée et donc ne passe pas dans le sang (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010). Ceci aura pour conséquence la réduction d'un tiers du taux plasmatique de la Ghréline chez le raton MDD de 21 jours. Cette diminution pourrait avoir un

lien direct avec le phénomène apoptotique, car l'injection intrapéritonéale de la Ghréline ou directement dans les ventricules cérébraux, supprime l'apoptose intestinale (Park et al., 2008). La Ghréline joue également un rôle dans la croissance des rats via son action sur l'hormone de croissance (Kojima and Kangawa, 2005). La diminution de la Ghréline plasmatique, pourrait ainsi participer au retard de croissance observé chez les rats MDD.

Le retour à une alimentation normale au sevrage des ratons était bénéfique, il a permis une restauration des taux plasmatiques de vitamines B9/ B12 et une amélioration progressive de l'organisation cellulaire de la glande gastrique qui n'était pas encore fonctionnelle à 80 jours. A 450 jours cette récupération n'est pas totale, la densité des cellules à Ghréline reste augmentée dans la région « pit » des rats MDD et la population des mucus pit cells est grandement réduite. Ceci est probablement la conséquence du maintien du statut inflammatoire de la muqueuse et d'une apoptose accrue dans cette partie de la glande aboutissant à son érosion. Cependant on note que le nombre de cellules endocrines à Ghréline à la base de la glande s'accompagne de taux plasmatiques normaux chez le rat MDD à 450 jours suggérant que la restauration de la muqueuse bien que partielle permet une reprise fonctionnelle du système à Ghréline.

Pour conclure nous avons montré que le retour à une alimentation normale au sevrage des ratons MDD a permis une restauration partielle de l'organisation gastrique et une récupération fonctionnelle du système endocrine à Ghréline. Cependant l'estomac présente des anomalies irréversibles liées à une inflammation chronique et une érosion de la muqueuse gastrique. Ainsi une MDD précoce pourrait prédisposer à certaines maladies, comme les gastrites (Sipponen et al., 2003), les maladies coéliquies (Kastrup et al., 1986; Yao et al., 1992) et même les cancers gastriques.

Schéma récapitulatif



2-Conséquences d'une supplémentation périnatale en folate sur la MDD gestationnelle-Étude du système à Ghréline

Nos travaux récents, détaillés dans la partie 1, ont montré qu'une supplémentation périnatale en folate pouvait atténuer les effets délétères irréversibles de la MDD gestationnelle, en particulier en augmentant le statut pondéral des ratons MDD. Nous avons alors voulu évaluer si cet effet bénéfique était lié à une amélioration de la mise en place fonctionnelle du système à Ghréline chez le raton MDD de 21 jours. Pour se faire, plusieurs paramètres ont été étudiés, tel que l'expression du gène codant pour la Ghréline et l'organisation cellulaire au niveau de la glande gastrique des ratons de 21 jours.

2-1-Analyse de l'expression du gène codant pour la Ghréline dans l'estomac des ratons de 21 jours en conditions de carence et de supplémentation en B9

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de la carence et de la supplémentation en folate sur l'expression de ce gène, dans l'estomac des différents groupes de rats : NC, NC B9, MDD et MDD B9. Le protocole de carence et de supplémentation est identique à celui détaillé dans la première partie.

Les résultats obtenus (figure 26) montrent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la Ghréline dans l'estomac des ratons MDD, ces résultats avaient déjà été montré précédemment (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010). Chez le raton MDD de 21 jours le taux plasmatique en Ghréline est diminué. Ces résultats montrent donc une discordance entre la carence en donneurs de méthyles (B9/B12) qui entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de la Ghréline dans la muqueuse gastrique des ratons de 21 jours mais une diminution de sa concentration plasmatique. Ceci étant certainement lié à l'anomalie de localisation des cellules endocrines à Ghréline en haut de la grande gastrique, comme discuté précédemment.

La supplémentation périnatale en folate, permet de diminuer significativement l'expression de ce gène chez les témoins (NC B9) et chez les individus carencés (MDD B9). Ces résultats suggèrent un effet direct des donneurs de méthyles sur l'expression du gène de la Ghréline.

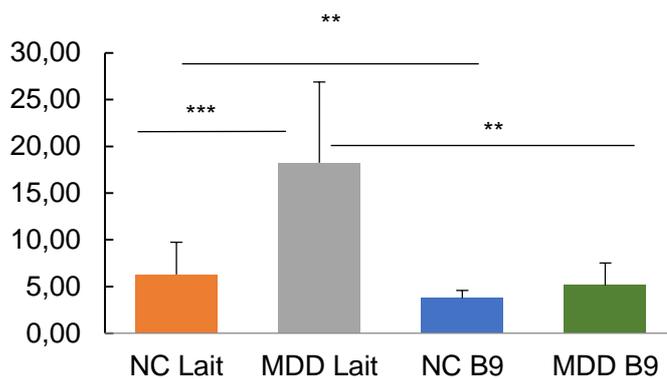


Figure 26: Expression de l'ARNm de la ghréline dans l'estomac par rapport aux gènes de référence : RPS29 et pol II chez le raton de 21 jours.

NC : Individus non carencés en donneurs de méthyles, NC B9 : Non Carencés supplémentés en B9, MDD : Individus carencés en donneurs de méthyles, MDD B9 : individus carencés en donneurs de méthyles et supplémentés en B9. 3 animaux par groupe, Minimum 2 expériences individuelles. ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$

2-2-Conséquences d'une supplémentation périnatale en B9 sur la localisation des cellules endocrines X/A à Ghréline dans la glande gastrique des ratons de 21 jours

La figure 27A montre que les cellules à Ghréline sont essentiellement localisées au niveau de la base de la glande gastrique (flèches) chez le raton contrôle (NC) et supplémenté en folate (NC B9). Cette supplémentation semble également entraîner une diminution du nombre de cellules sécrétrices et/ou une diminution de l'expression de la Ghréline comme nous l'avons observé (figure 27B).

Après une carence en donneurs de méthyles (figure 27C), comme nous l'attendions nous avons retrouvé une localisation anormale des cellules à Ghréline en haut de la glande. La supplémentation en B9 (figure 27D) semble permettre une meilleure organisation de la muqueuse gastrique avec un grand nombre de cellules endocrines à Ghréline localisées à la base, mais certaines cellules restent situées à mi-hauteur (flèches). Cependant cette relocalisation des cellules chez les MDD supplémentés en B9 permet une récupération du taux plasmatique qui est équivalent à celui du contrôle supplémenté en B9 (Partie 3, figure 3 de l'article)

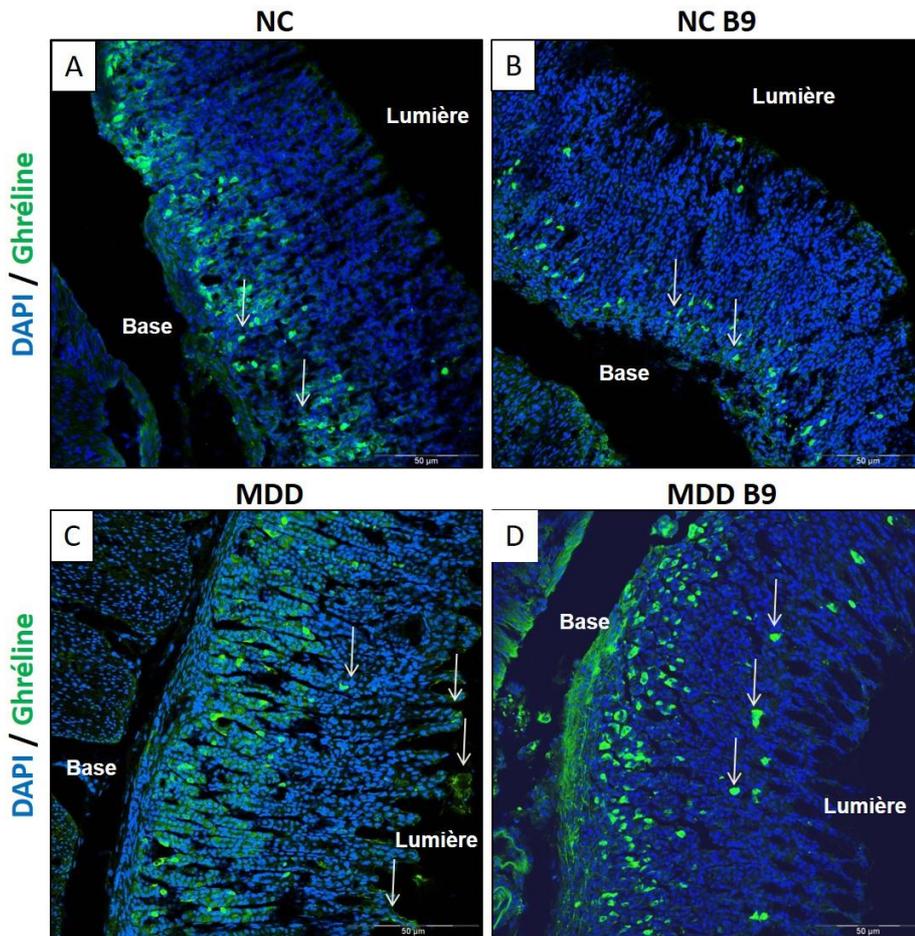


Figure 27: Expression de la ghréline au niveau des glandes gastriques des rats de 21 jours.

La Ghréline est marquée en verts et les noyaux en bleu (DAPI). A) Individus non carencés en donneurs de méthyles. B) Individus non carencés et supplémentés en B9. C) Individus carencés en donneurs de méthyles. D) Individus carencés et supplémentés en B9.

2-3- Eude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression du gène de la Ghréline

Les cellules d'un organisme sont génétiquement homogènes mais structurellement et fonctionnellement hétérogènes, en raison de l'expression différentielle de gènes. La majorité de ces différences survient lors du développement et est conservée au cours de la mitose. Les modifications stables de ce genre sont dites épigénétiques car elles sont héréditaires et n'entraînent pas de mutations de l'ADN. Au cours de ces dernières années, les recherches se sont focalisées sur deux types de modifications épigénétiques : la méthylation de l'ADN et la modification des histones (Jaenisch and Bird, 2003). La méthylation de l'ADN est une modification survenant principalement au niveau des cytosines de la séquence dinucléotidique CpG. Elle est un élément clé intervenant dans la régulation de l'expression des gènes (Urnov and Wolffe, 2001).

Étant donné nos résultats concernant l'expression de l'ARNm de la Ghréline en conditions de carence en donneurs de méthyles ou de supplémentation en folates, nous nous sommes posé la question de la régulation de son expression par méthylation de sa région promotrice. Il existe très peu de littérature dans ce domaine, moins de 3 articles et aucun site de méthylation identifié (Coppédé et al., 2018).

2-3-1-Analyse de la méthylation par le dosage quantitatif des cytosines méthylées du promoteur du gène de la ghréline

L'étude de Wei et collaborateurs en 2005 a caractérisé la région promotrice du gène codant pour la Ghréline et a montré la présence de 5 points « cg » dans cette région, dont 2 dans la région favorisant la transcription. Nous avons nommé ces sites : sites A et B (figure 28) et nous avons analysé la possible méthylation du site A dans nos différentes conditions de carences en donneurs de méthyles, décrites dans le matériel et méthodes (page 73).

A B

Acctccactgggttgttctttaaacagtgaggggaaagagtacttagttctcaa ggaatgcaatactgccacacaa
actacacagcctcagaga cgaggctgc cggatgtgaacaaacacaaggcttc ctatataaggagcagccagtcag
 caggca ccacatcccaggcattccagg taagcactctctgctgtctgtttatgtatgtgtatgtatgcat
gaacatgtgtgct cgaaggggtctaaattattcagcaactgtccccccccccatttactttctctgggtgtcagt
 gagctcactaaacaaagacaacagtgtaggtcagcctcattggctccaacatcaggctcctgagggctcaggata
 accaacad cgaatggacagccctccagcacatcaggctctgct cgacagcttagaaaaggcagtttagccttt
 ggctctcccacccttgtaagatggtgacaagaaagccttgcttcatccagcagtcctatccttacttctgaagct
 tgctggattccaacctgagcaaattctaaggcatacatcatggagacaagtaagctagcagaagtcctctctcc
cCCAGATCATCTGTCTCACCACCAAGGCC ATGGTGTCTTCAG CGACTATCTGCAGTTTGTACTCTCAGCATG
CTCTGGATGGACATGGCCATGGCAGGTTCC GCTTCCTGAGCCCAGAGCACCAGAAAGCCCAG

- : Site de méthylation possible
- : ATG
- : Site de modification n-octanoyle
- : Site favorisant la transcription (-580 à -506)
- : Site inhibant la transcription (-454 à -387)
- XXX : Exon 1
- xxx : Exon 1 de transcrit long

Figure 28: Caractérisation et régulation du promoteur du gène "ghréline" chez le rat et l'humain (Wei et al., 2005).

Nous avons commencé par analyser le taux de méthylation du site « A » chez les mères et les ratons de 21 jours du protocole MDD par la technique de PCR quantitative, après traitement avec le bisulfite qui induit une destruction spécifique des sites « cg » méthylables non méthylés, alors que les sites « cg » méthylés ne sont pas transformés (protégés) (technique décrite dans matériel et méthodes, page 76).

Nous avons mis en évidence une diminution du taux de méthylation du gène de la Ghréline chez les mères carencées, ainsi que chez leurs ratons à 21 jours (figure 29) par rapport à leurs contrôles respectifs. Nos résultats prouvent que le gène de la Ghréline peut être régulé par méthylation et que la carence en donneurs de méthyles impacte directement son expression.

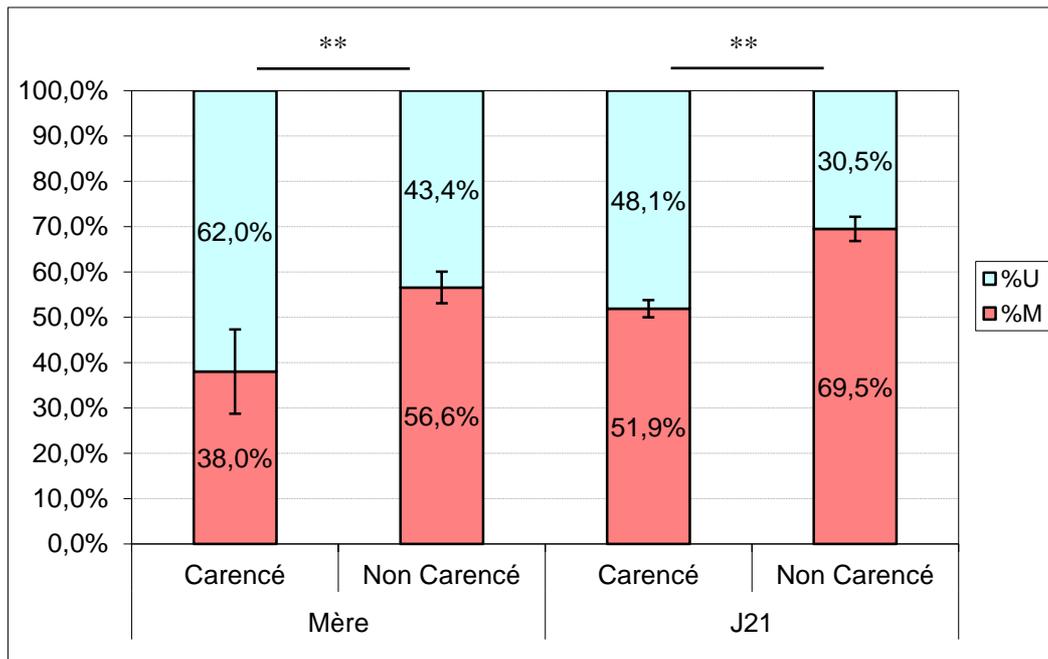


Figure 29: Taux de méthylation du site "A" de la région promotrice du gène de la ghréline dans la partie "body" de l'estomac des mères (N=3) et des rats de 21 jours (N=3).

U : non méthylé, M : méthylé. ** $p \leq 0.01$

2-3-2-Étude du rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression du gène de la Ghréline par la technique d'analyse combinée de restriction bisulfite (Technique COBRA)

Suite à nos résultats concluants quant à l'effet de la MDD sur la méthylation de la région promotrice du gène de la Ghréline, nous avons voulu étudier l'impact de la supplémentation en folate sur la régulation de l'expression de ce gène.

Pour ce faire, nous avons choisi une technique nous permettant d'étudier à la fois les sites : A et B, c'est la technique COBRA ; décrite dans le matériel et méthodes, utilisant l'enzyme DrDI qui reconnaît les sites : 5' GACNNNN[^]NNGTC 3' et qui génère une coupure seulement si ces deux sites sont méthylés en même temps.

Lors de cette étude nous nous sommes uniquement intéressés aux échantillons d'estomacs de rats de 21 jours. Pour étudier l'impact de la supplémentation en folate sur cette régulation, nous avons intégré des groupes supplémentés en vitamine B9 (NC B9 et MDD B9). Pour chaque groupe nous avons inclus un témoin négatif (non digéré pour Nd). L'échantillon de foie sert de témoin positif méthylé.

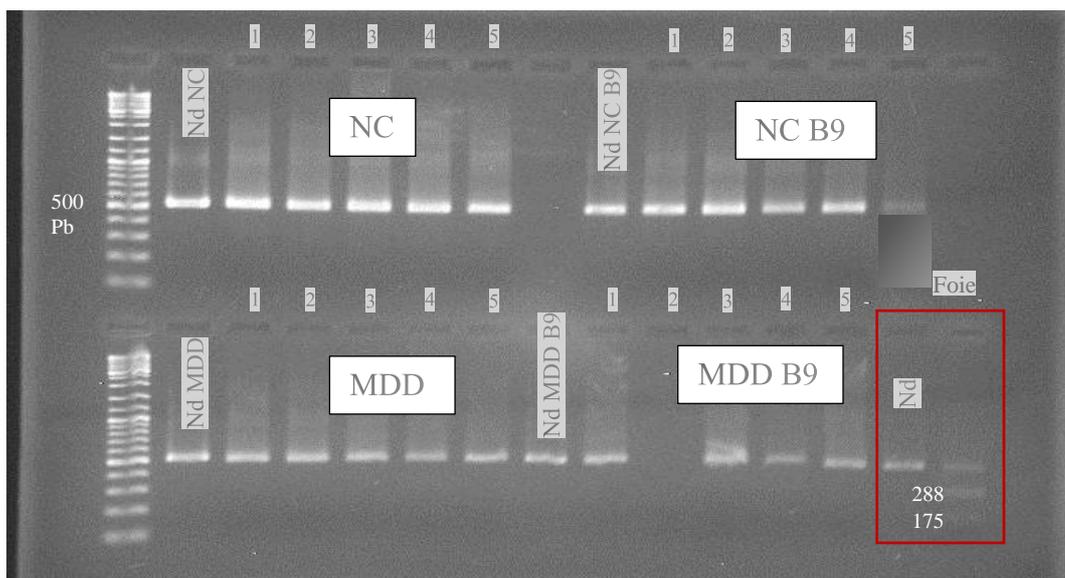


Figure 30: Digestion des échantillons d'estomacs (partie Body) des rats de 21 jours avec l'enzyme DrDI.

Le foie sert de témoin positif. N=5. NC : Individus non carencés en donneurs de méthyles, NC B9 : Non Carencés supplémentés en B9, MDD : Individus carencés en donneurs de méthyles, MDD B9 : individus carencés en donneurs de méthyles et supplémentés en B9, Nd : non digéré.

Les résultats de la figure 30 montrent une absence de digestion des échantillons d'estomacs et une digestion de l'échantillon de foie, ce qui suggère que les sites A et B sont méthylables en même temps (échantillon foie) mais que ce n'est pas le cas dans l'estomac.

Les résultats préliminaires obtenus avec le site « A » dans l'estomac, ont montré que ce dernier est méthylé de manière différentielle (Contrôles versus MDD), ce qui suggère que dans l'estomac, seul le site « A » interviendrait dans la régulation de l'expression de ce gène. Cependant ces résultats sont préliminaires, il va falloir les confirmer en utilisant une autre technique permettant d'étudier le site « B » indépendamment du site « A ».

Troisième partie :

**Une déficience en donneurs de méthyles pendant la
gestation et la période de lactation chez le rat affecte
l'expression des neuropeptides et des récepteurs associés
dans l'hypothalamus de la descendance**

1-Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus

Lynda Saber Cherif, Grégory Pourié, Andréa Geoffroy, Amélia Julien, Déborah Helle, Aurélie Robert, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié *, Jean-Luc Daval*

Les vitamines B9 et B12 sont les principaux donneurs de méthyles intervenant dans le cycle des monocarbones. Ce cycle joue un rôle crucial dans les réactions de transméthylation et dans la régulation de la concentration d'homocystéine qui, présente en excès, est toxique pour les cellules. L'hyperhomocystéinémie est à l'origine de ruptures de l'ADN, d'un stress oxydant, d'un stress du réticulum endoplasmique, de l'homocystéinylation de protéines et de l'apoptose (Mattson and Shea, 2003 ; Ghemrawi et al., 2013 ; Akchiche et al., 2012). Ces deux vitamines sont importantes pour le développement et leur insuffisance constitue un facteur de risque pour la survenue d'anomalies développementales, telles que les anomalies du tube neural (Kirke et al., 1993).

Des études antérieures du laboratoire ont montré que les carences en folate et en vitamine B12 sont associées à des retards de croissance, à des troubles cognitifs et à des anomalies développementales irréversibles chez les rats (Blaise et al., 2007; Bossenmeyer-Pourié et al., 2013). Dans notre modèle expérimental chez le rat, le déficit en vitamines B9/B12 pendant la gestation et l'allaitement est également associé à des anomalies de formation de la muqueuse gastrique avec une diminution de la taille de l'estomac, de son épaisseur, ainsi qu'une désorganisation du système à ghréline (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010). La ghréline est une hormone gastro-intestinale jouant un rôle important dans la croissance via son rôle de facteur de libération de l'hormone de croissance et de peptide stimulant l'appétit par son action au niveau de l'hypothalamus.

L'hypothalamus intervient dans plusieurs fonctions physiologiques, notamment la régulation de la prise alimentaire par la production de neuropeptides au niveau du noyau arqué. L'intégration des signaux périphériques (ghréline, leptine, insuline, PYY...) est importante pour cette régulation. Les neurones du noyau arqué produisent deux types de neuropeptides : les neuropeptides oréxigènes ; Neuropeptide Y (NPY) et l'Agouti-related protein (AgRP) stimulant la prise alimentaire et les neuropeptides anoréxigènes ; Pro-opiomelanocortine (POMC) et la « Cocain and amphetamine regulated transcript » (CART) l'inhibant. La leptine

et l'insuline agissent via leur récepteur, respectivement, Ob-Rb et le récepteur à l'insuline pour inhiber les neurones orexigènes et à l'inverse stimuler les neurones anorexigènes (Korner and Leibel, 2003).

Compte tenu de nos résultats antérieurs et du concept selon lequel un environnement périnatal défavorable peut avoir des conséquences sur le développement de plusieurs tissus, ainsi que sur la physiologie et la santé sur le long terme, nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition à une carence en donneurs de méthyles pendant la période fœtale et en début de vie, peut modifier de manière irréversible le développement et le fonctionnement de l'hypothalamus, entraînant un dysfonctionnement de l'équilibre énergétique et un retard de croissance définitif. Aussi, nous avons étudié l'expression des neuropeptides et de certains récepteurs dans notre modèle de carence chez le rat et dans deux lignées cellulaires de neurones embryonnaires hypothalamiques : mHypoE46 (souris) et rHypoE11 (rat) en conditions de carence en vitamine B9. La lignée souris exprime les neuropeptides NPY et AgRP et est caractéristique des neurones à NPY/AgRP du noyau arqué de l'hypothalamus. La lignée rat, quant à elle, exprime la ghréline et semble être caractéristique des cellules produisant la ghréline et régulant l'activité des neurones à NPY/AgRP (figure 31).

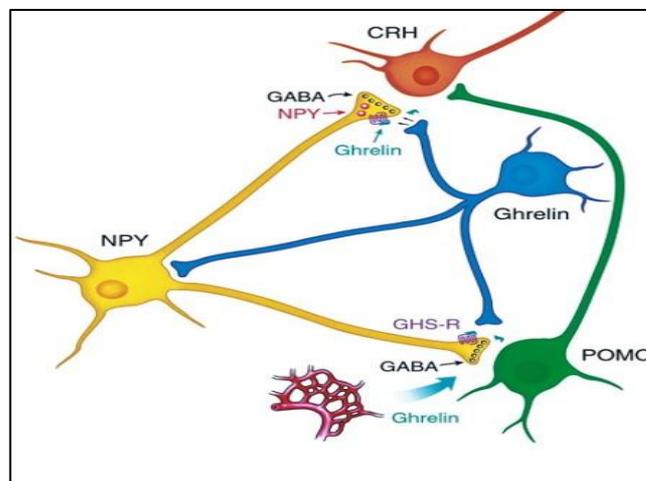


Figure 31: Schéma des interactions entre les neurones à Ghréline et les autres types cellulaires du noyau arqué (Cowley et al., 1999).

De plus, nous avons évalué les effets d'une supplémentation en folate sur l'amélioration du retard de croissance chez les rats carencés et son impact sur l'expression des neuropeptides.

Les résultats obtenus ont montré qu'une carence en vitamines B9/B12 durant la gestation et l'allaitement induit un retard de croissance et altère l'expression des neuropeptides et des récepteurs intervenant dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique, suggérant une altération du développement des réseaux hypothalamiques. La supplémentation périnatale et postnatale en acide folique (âge embryonnaire E13-sevrage des rats à 21 jours) aide à restaurer les taux d'expression d'ARNm et apparaît comme une stratégie potentielle pour remédier aux anomalies dues à la carence.

Le développement de l'hypothalamus débute au cours de la période prénatale et se poursuit après la naissance. Cette fenêtre de développement est très sensible aux modifications de l'environnement, qui peuvent nuire au développement harmonieux et fonctionnel de l'hypothalamus. Nos études récentes (Geoffroy et al., 2017, 2019) ont montré qu'une supplémentation en folate adaptée, de la 3^{ème} semaine de gestation jusqu'au sevrage des rats, atténue les anomalies développementales associées à la carence en donneurs de méthyles chez les rats. Cette période correspond à un pic de maturation cérébrale associée à de nombreux changements neuronaux adaptatifs, tels que la synaptogenèse, le raffinement et la plasticité des circuits. Nous avons montré que la supplémentation en acide folique a tendance à améliorer la signalisation métabolique périphérique, ainsi que l'expression des neuropeptides et récepteurs au niveau central, conduisant à l'amélioration du retard de croissance, du déficit pondéral et de l'atrophie cérébrale. Ceci suggère qu'une telle supplémentation périnatale peut avoir un impact positif sur la plasticité développementale et la programmation épigénétique des circuits hypothalamiques. Article présenté en annexe, page 171.

2-Impact d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles sur l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes

La cobalamine (vitamine B12) est un cofacteur vitaminique essentiel aux réactions métaboliques cytosoliques et mitochondriales. La déficience en cobalamine est une cause fréquente d'anémie mégaloblastique. Elle est également à l'origine de divers troubles neurologiques, tels que la démence et la déficience cognitive qui affectent la mémoire et l'apprentissage et produisent l'anxiété (Kalita et al., 2013).

L'étiologie de l'anémie mégaloblastique est bien connue, tandis que la cause des anomalies neurologiques dues à un déficit en cobalamine n'est toujours pas claire (Lai et al., 2013).

Pour comprendre l'étiologie des anomalies neurologiques associées à la déficience en cobalamine, des études (Arora et al., 2017) ont utilisé un modèle de souris mutantes dont le gène (*CD320*) du récepteur de la transcobalamine (*TCb1R*) est invalidé.

Le *TCb1R/CD320* est nécessaire pour l'absorption cérébrale de la cobalamine et les souris *TCb1R/CD320 knockout (KO)* sont ainsi affectées d'une carence en cobalamine au niveau du système nerveux central (Quadros et al., 2009; Lai et al., 2013).

Les travaux de Pourié *et al* (article en soumission), sur ce modèle de souris (*CD320 KO*) au sein du laboratoire, ont montré qu'une carence en vitamine B12 induit une diminution de l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans l'hippocampe des souris KO par comparaison aux souris témoins. Ces travaux ont également montré une diminution de la dimérisation et de la localisation nucléaire de GR dans les neurones de l'hippocampe des souris KO.

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes produites par la glande surrénale. Outre leurs effets anti-inflammatoires, ils interviennent également dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique, en se liant à leur récepteur présent dans les cellules de différents noyaux de l'hypothalamus en particulier le noyau arqué. Ceci déclenche une cascade d'évènements donnant lieu à la translocation nucléaire de GR, à son activation et à l'expression ou la répression de ses gènes cibles (Gali Ramamoorthy et al., 2015).

Les glucocorticoïdes sont considérés comme des facteurs modulateurs du comportement alimentaires, cependant ils jouent le plus souvent le rôle de facteurs orexigènes agissant sur le système nerveux central et stimulant la prise alimentaire. Ils agissent principalement sur les neurones à NPY/AgRP du noyau arqué en stimulant l'expression des neuropeptides au niveau

de l'hypothalamus et en inhibant la libération de la CRH qui, à l'inverse, est anorexigène et inhibe la production de NPY/AgRP (Ans et al., 2018).

Compte tenu du rôle des glucocorticoïdes dans la régulation de l'appétit et des travaux de Pourié et collaborateurs, nous avons étudié l'impact de la carence en vitamines B9/B12 dans notre modèle expérimental, ainsi que de la supplémentation en acide folique sur l'expression de ce récepteur au niveau de l'hypothalamus.

2-1-Impact de la carence en vitamines B9/B12 sur l'expression transcriptionnelle du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus

Dans notre modèle animal, la carence en donneurs de méthyles diminue significativement l'expression transcriptionnelle du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus de rat à 21 jours (figure 32).

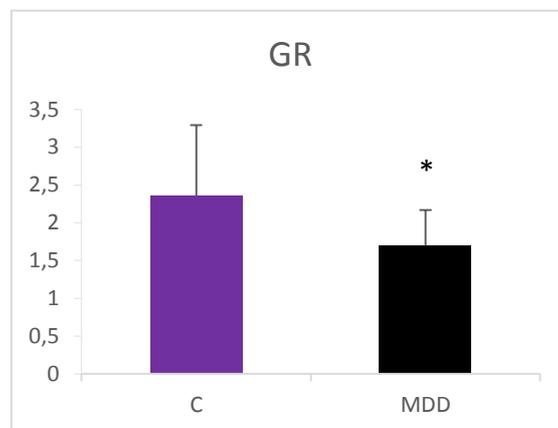


Figure 32: Expression de l'ARNm du récepteur aux glucocorticoïdes dans l'hypothalamus de rats de 21 jours, par rapport à 2 gènes de référence (RPS29 et GAPDH) et à un calibrateur externe, en conditions de carence en B9/B12.

Témoins non carencés (C), animaux carencés (MDD), $n = 6$, $*p < 0,05$ Anova-Fisher.

2-2-Impact de la carence gestationnelle sur l'expression protéique du récepteur aux glucocorticoïdes dans le modèle animal et dans la lignée cellulaire mHypoE46 (souris)

Nous avons ensuite étudié l'expression protéique de ce récepteur par immunohistochimie dans le modèle animal puis par Western Blot dans la lignée cellulaire mHypoE46 de souris.

2-2-1- Impact de la carence en B9/B12 sur l'expression protéique de GR chez le rat

Cette étude a été réalisée dans les noyaux arqué (ARC) et ventromédian (VMH) de l'hypothalamus. Les résultats obtenus dans le noyau ventromédian (figure 33b) ont montré que la carence semble diminuer légèrement l'expression de GR chez le rat carencé par comparaison au témoin, avec une localisation davantage cytoplasmique. Contrairement au noyau VMH, l'expression de GR dans le noyau ARC ne semble pas être affectée cependant sa localisation est également plus cytosolique chez le raton MDD (figure 33a).

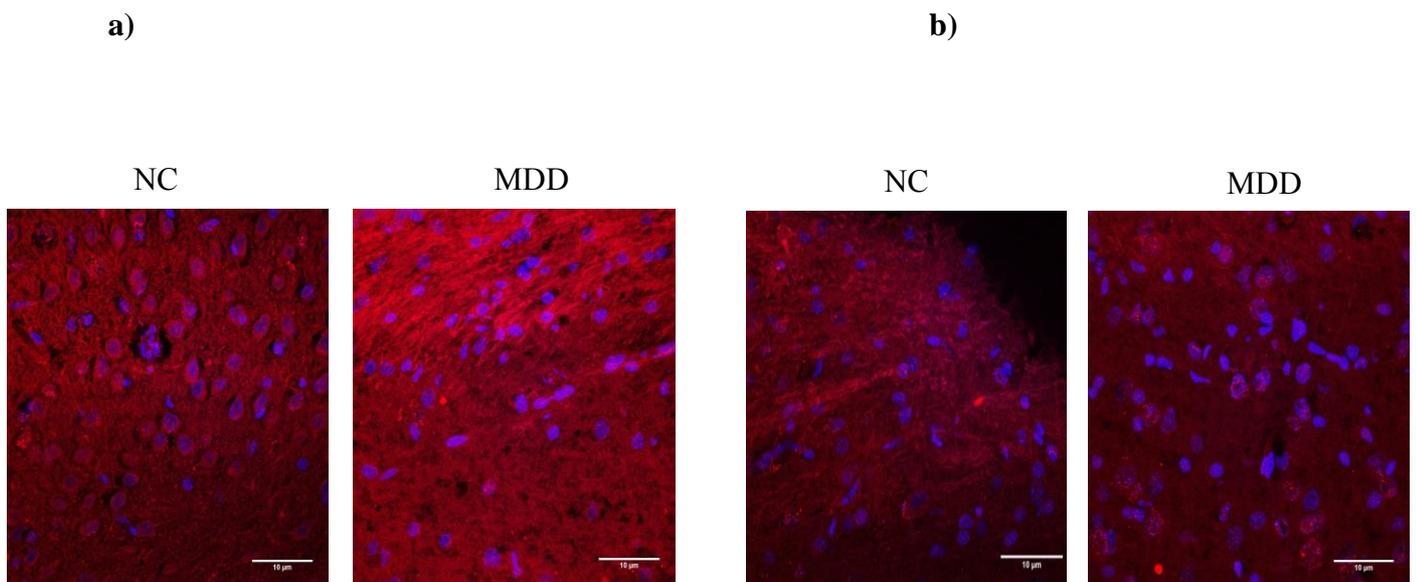


Figure 33: Expression/localisation de la protéine GR dans l'hypothalamus de rats de 21 jours en conditions de carence en vitamines B9/B12.

$n = 3$. a : noyau arqué, b : noyau ventromédian.

2-2-2- Impact de la carence en B9 sur l'expression protéique de GR dans la lignée cellulaire mHypoE46 (souris) par Western Blot

Nous avons voulu confirmer les résultats observés en immunohistochimie par Western Blot. Les figures 34a et 34b montrent une diminution significative de l'expression de la protéine GR dans la lignée cellulaire de souris après 24h de carence en folate, ce qui confirme les résultats de l'immunohistochimie (noyau VMH), mais aussi ceux de la RT-qPCR dans le modèle de rat.

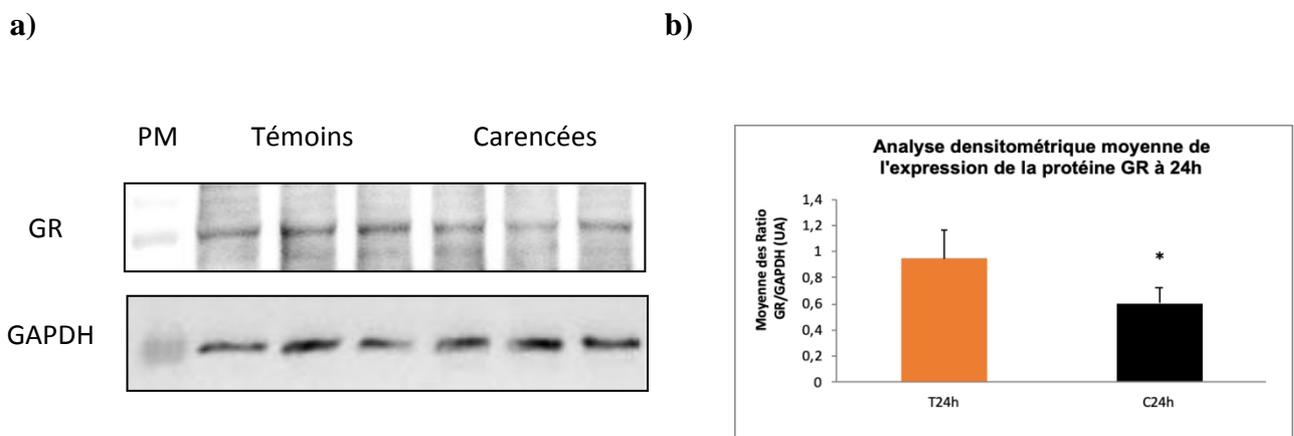


Figure 34: Expression de la protéine GR dans la lignée mHypoE46 de souris, après 24h de carence en folate.

La protéine GAPDH sert ici de protéine de référence. Les échantillons sont en triplicats.

a: Western blot

b : Analyse densitométrique de l'expression de la protéine GR à 24h de carence en folates.

* $p < 0,05$

2-3-Étude de la N-homocystéinylation du récepteur aux glucocorticoïdes

Il a été montré au laboratoire que l'homocystéine qui s'accumule en situation de carence en B9/B12 peut se fixer de manière irréversible à certaines protéines et entraîner leur perte de fonction et leur agrégation ; ce mécanisme se produit sur les résidus Lysine et constitue la N-homocystéinylation (Akchiche *et al.*, 2012).

Nous avons montré par spectrométrie de masse que le récepteur aux glucocorticoïdes peut être N-homocysteinylé dans le domaine de liaison au ligand, *Ligand Binding Domain* (LBD) à la position K699. Il a également été montré une phosphorylation à la position T686 dans ce même domaine (figure 35). Il est à noter que cette séquence est conservée à 100% chez l'homme (alignement LBD 669-681, protein accession P04150, 777 aa).

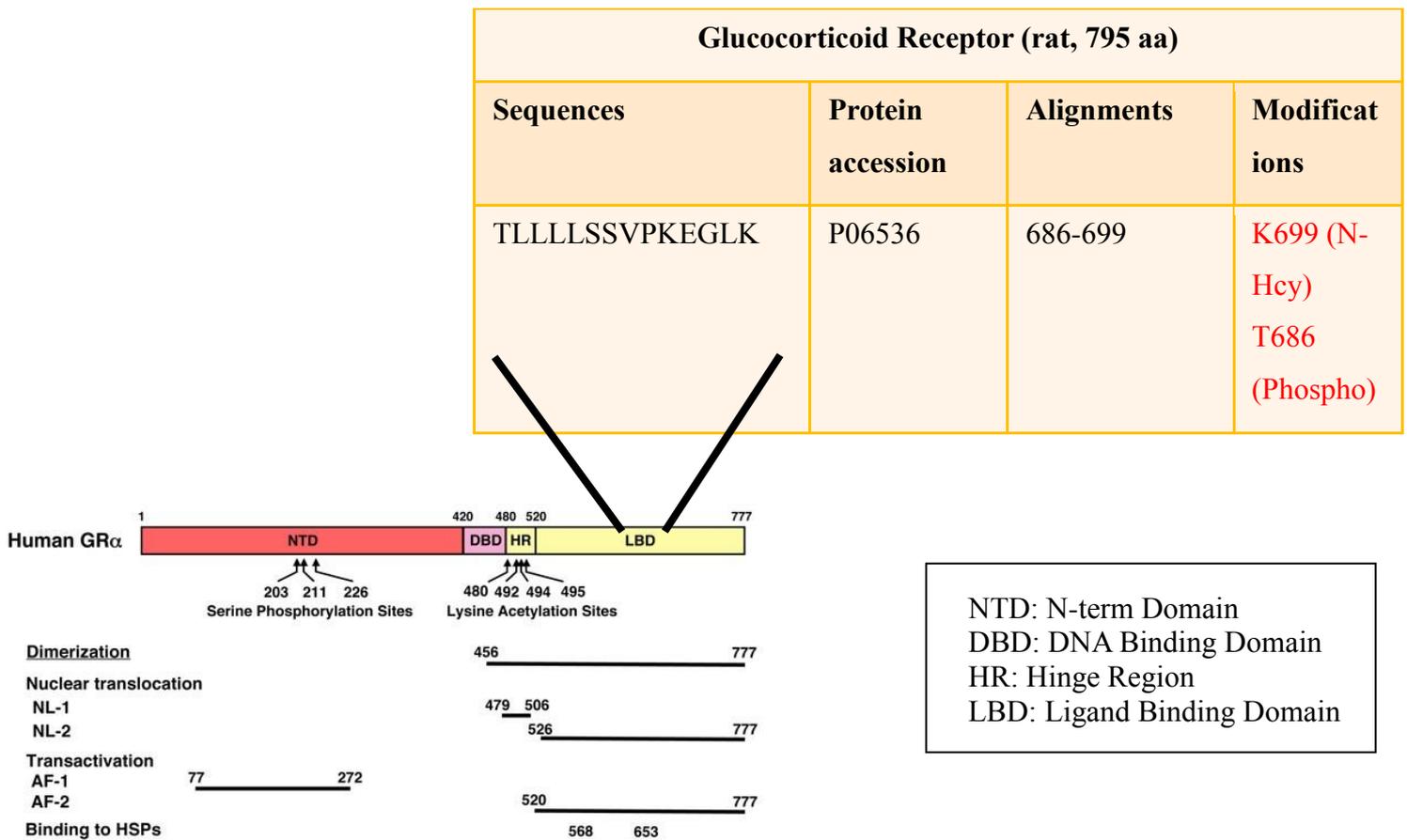


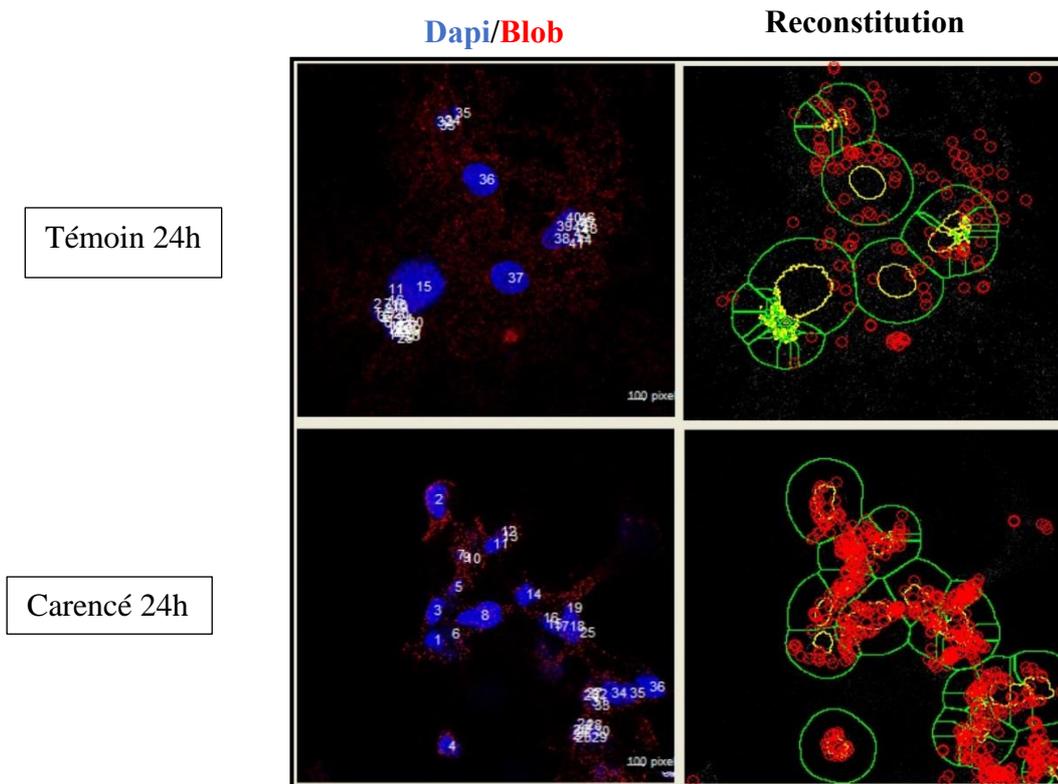
Figure 35: N-homocystéinylation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (spectrométrie de masse, rat).

Nous avons ensuite quantifié par la technique de Duolink-PLA l'interaction entre GR et homocystéine en situation de carence en folates dans la lignée mHypoE46 (Souris).

Chaque spot rouge appelé Blob représente une interaction entre le récepteur aux glucocorticoïdes et l'homocystéine. Ces Blobs sont quantifiés par le logiciel Blobfinder (freeware obtenu auprès de l'université d'Uppsala en Suède) et représentés en nombre moyen par cellule. Ils sont sélectionnés sur les critères suivants : taille 3X3 pixel, intensité 90.

Les résultats obtenus (figures 36a et 36b) ont montré que la N-homocystéinylation du récepteur GR augmente de manière significative en conditions de carence (24h et 48h).

a)



b)

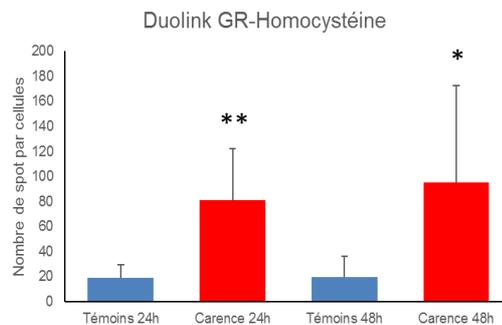


Figure 36: Illustration des résultats obtenus par Duolink et de l'interaction entre GR et l'homocystéine dans la lignée de souris (mHypoE46).

Observation au microscope confocal et analyse des résultats par blobfinder/Matlab (Freeware-Université d'Upsala). Grossissement : X60. Coloration DAPI (bleu) pour les noyaux, blob rouge pour le Duolink (critères de sélection des spots : 3x3 et intensité 90)

a : reconstitution Blobfinder

b : Histogrammes de l'analyse. Les résultats sont exprimés en nombre de spots par cellule. n=4, **p<0.01, *p<0.05

2-4-Conséquences d'une supplémentation en folate sur l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans le modèle animal

Selon Czeizel (2011), la supplémentation en multivitamines ou en acide folique est bénéfique et joue un rôle important dans la prévention des anomalies du tube neural et d'une partie des malformations cardiovasculaires qui sont les anomalies congénitales les plus courantes. De plus, dans l'article 3, nous avons montré que la supplémentation en acide folique pendant la période périnatale a tendance à restaurer la signalisation métabolique périphérique et l'expression des neuropeptides et récepteurs au niveau central. Pour ces raisons, nous avons étudié l'impact de la supplémentation en acide folique sur l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes.

2-4-1-Conséquences de la supplémentation en folate sur l'expression du gène du récepteur aux glucocorticoïdes

Comparée au sujet carencé, l'expression de l'ARNm de GR après supplémentation en acide folique, semble être améliorée dans l'hypothalamus de rats de 21 jours (figure 37).

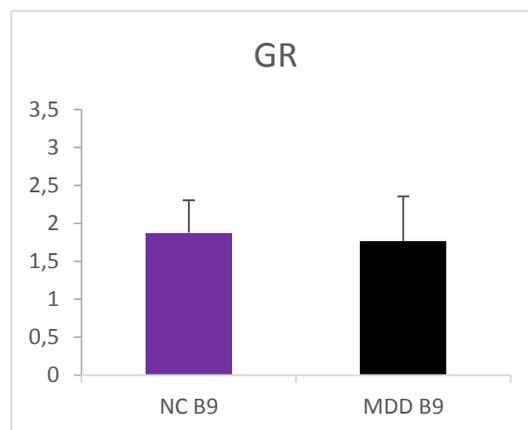


Figure 37: Expression de l'ARNm de GR par rapport à 2 gènes de référence (RPS29 et GAPDH) et à un calibrateur externe en conditions de supplémentation en B9.

Témoin non carencé supplémentation en B9 (couleur), carencé supplémentation en B9 (noir), n = 6.

2-4-2-Conséquences de la supplémentation en folate sur l'expression/localisation de la protéine GR par immunohistochimie

Après l'étude de l'expression de l'ARNm en conditions de supplémentation, nous avons évalué l'expression protéique par immunohistochimie dans les mêmes conditions. Les résultats montrent une localisation plus nucléaire du récepteur aux glucocorticoïdes chez le témoin supplémenté (NC B9) dans les noyaux ARC et VMH de l'hypothalamus. Concernant l'animal carencé supplémenté (MDD B9), les résultats ne sont pas concluants.

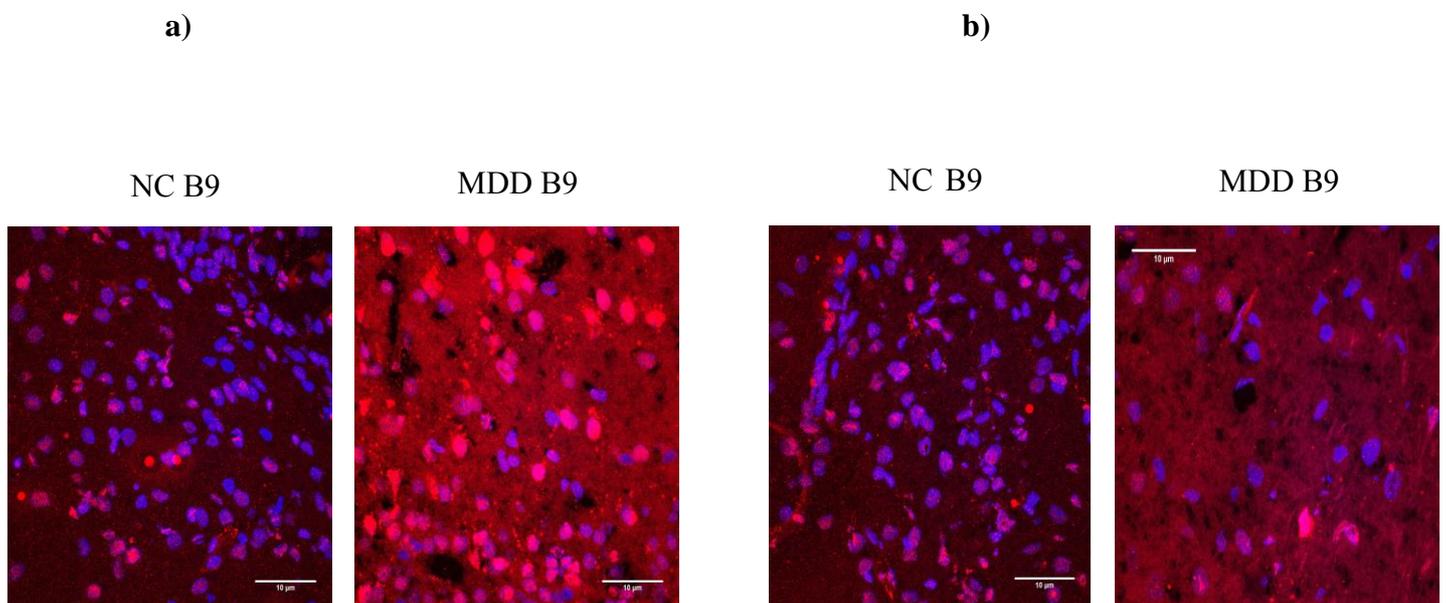


Figure 38: Expression/localisation de la protéine GR dans l'hypothalamus des rats de 21 jours en conditions de supplémentation en acide folique.

NC-B9 : non carencé supplémenté en B9, MDD-B9 : déficient en vitamines B9/B12 et supplémenté. n=3

a : Le noyau arqué, b : Le noyau ventromédian.

Pris dans leur globalité, les résultats de cette étude montrent qu'une carence en donneurs de méthyles entraîne une diminution de l'expression du gène et de la protéine du récepteur aux glucocorticoïdes dans le modèle de rat.

Ces résultats ont été retrouvés dans la lignée cellulaire de souris (mHypo-E46) en conditions de carence en vitamine B9 où nous avons montré une diminution de l'expression protéique par Western Blot mais aussi une N-homocystéinylation de la protéine GR. Ainsi l'expression de GR est affectée au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel. La N-homocystéinylation du récepteur GR dans son site de liaison pourrait aboutir à une perte de fonction et à l'agrégation du récepteur.

In vivo et in vitro, il est admis que l'homocystéine est toxique quand elle s'accumule. Dans le neurone, elle induit des dysfonctionnements synaptiques ainsi que la mort neuronale par apoptose due à des dommages de l'ADN (Mattson and Shea, 2003). 50% de l'homocystéine sont censés être reconvertis en méthionine par reméthylation via la méthionine synthase (B12 dépendante), dépendante de l'activité de la 5'-MTHF (5-méthyltetrahydrofolate du cycle des folate). Dans le cas contraire, on observe une hyperhomocysteinémie qui est très souvent retrouvée dans des maladies neurodégénératives comme Alzheimer, certaines démences et même dans la schizophrénie (Dietrich-Muszalska et al., 2012). Il est intéressant d'étudier les conséquences d'une hyperhomocysteinémie au niveau des neurones de l'hypothalamus. En effet, l'hypothalamus constitue le cerveau neuro-végétatif ; il régule toutes les fonctions neuroendocrines via le système nerveux végétatif et l'axe hypothalamo-hypophysaire et constitue aussi une composante du système limbique. Ainsi, l'hypothalamus régule également l'horloge biologique et de nombreux comportements, comme le comportement alimentaire, l'homéostasie énergétique et la réponse au stress. Les glucocorticoïdes sont sécrétés par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe corticotrope de manière rythmique tous les matins, leur sécrétion peut également être déclenchée par une réponse adaptative au stress. Les récepteurs GR de l'hypothalamus sont parmi les premiers acteurs de la programmation fœtale pouvant induire une altération de la balance énergétique et la prédisposition aux désordres métaboliques. Ils sont impliqués dans le contrôle de la balance énergétique en régulant l'expression des neuropeptides comme la POMC, le NPY et l'AgRP. La liaison des glucocorticoïdes aux récepteurs GR provoque leur dimérisation, leur activation/translocation nucléaire et leur intervention comme facteur de transcription par liaison aux *Glucocorticoid response elements* (GREs) comme ceux présents dans les régions promotrices du gène codant pour l'AgRP. (Lee et al., 2013). Nous avons observé dans notre modèle de rat déficient en

B9/B12 et dans les cellules hypothalamiques carencées en B9 une diminution de l'expression de GR et une N-homocystéinylation dans le site de liaison au ligand de GR.

De plus, la carence en donneurs de méthyles semble aboutir à une localisation cytoplasmique de GR tandis qu'une supplémentation en B9 favoriserait la localisation nucléaire de GR. La vitamine B9 et plus précisément les processus de méthylation pourraient ainsi intervenir sur la régulation de la translocation de GR dans le noyau, tel que cela a déjà été décrit dans notre modèle pour le récepteur aux œstrogènes (Pourié et al., 2015).

IV-Discussion Générale

La mise en place anatomique et fonctionnelle du système nerveux central se déroule de manière séquentielle et nécessite l'expression d'un programme neurogénique finement régulé de manière spatio-temporelle. La fermeture du tube neural à un stade précoce de la gestation est suivie de la mise en place des vésicules cérébrales et de leur régionalisation (Liu and Niswander, 2005). Une fois la régionalisation cérébrale et la mise en place des circuits neuronaux achevées, le cerveau est sujet à un profond remaniement structural pour assurer un bon fonctionnement des circuits neuronaux. La période périnatale est le siège de la synaptogenèse, fortement stimulée par les afférences sensibles, en période postnatale (Holt and Mikati, 2011). La plasticité synaptique permet la mise en place et la régulation d'un grand nombre de synapses qui subiront un processus de sélection. Selon le niveau de stimulation, certaines synapses sont renforcées tandis que d'autres sont éliminées, pour, à terme, conserver les circuits les plus efficaces (Johnston et al., 2001). Ce processus est indispensable au bon fonctionnement cérébral. L'intégration des signaux périphériques (Ghréline, Leptine, Insuline, PYY...) est essentielle pour la mise en place harmonieuse et fonctionnelle de l'hypothalamus qui est le siège de la régulation de la prise alimentaire (Korner and Leibel, 2003). Ainsi, si au cours de la période périnatale l'intégration de ces signaux ne s'effectue pas correctement sur les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, la production des neuropeptides est perturbée, respectivement la pro-opiomélanocortine (POMC) qui par clivage produit un peptide aux effets anorexigènes, l' α -MSH, et les neuropeptides Y et AgRP aux effets oréxigènes. Ce défaut de signalisation affectera de manière définitive les projections neuronales du noyau arqué aux différentes aires fonctionnelles hypothalamiques possédant des récepteurs pour ces neuropeptides (Y1R, MC 4R...), comme cela a été observé dans les souris déficientes en Leptine (Lep^{ob}/Lep^{ob}) (Bouret et al., 2004).

Afin d'étudier les conséquences sur le cerveau d'un déficit en vitamines B donneurs de méthyles (MDD), le laboratoire a développé un modèle de rat né de mère carencée en B12 et folate pendant la gestation et la période d'allaitement. Ce modèle est associé à un retard de croissance intra-utérin qui perdure après la naissance. A l'âge de 21 jours (sevrage), il a été observé une accumulation d'homocystéine dans des structures cérébrales telles que l'hippocampe, la zone subventriculaire (SVZ) et l'hypothalamus. Les structures cérébrales sont altérées et présentent une atrophie définitive de différentes couches cellulaires, comme la zone subventriculaire, le gyrus denté ou la corne d'Ammon 1 (CA1) (Blaise et al., 2007; Kerek et al., 2013). Le rétablissement d'une alimentation normale au sevrage, s'il régularisait

les altérations du métabolisme de l'homocystéine, demeurerait associé à un retard de croissance et à des déficits persistants (Blaise et al., 2007).

Par ailleurs, nos travaux ont également montré que la carence en donneurs de méthyles s'accompagnait d'une altération de la mise en place de la muqueuse gastrique aboutissant à une déficience en Ghréline (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010), et d'une perte de la fonctionnalité de la voie Stat 3 via une surexpression de miR-124a qui pourrait conduire à des défauts de signalisation du récepteur de la leptine présent en grande quantité dans l'hypothalamus (Kerek et al., 2013). Récemment, nous avons mis en évidence que la carence en donneurs de méthyles s'accompagnait de la fixation de l'homocystéine sur certaines protéines, en particulier des protéines du cytosquelette et associées au transport vésiculaire synaptique. Cette N-homocystéinylation post-traductionnelle des protéines est irréversible ; elle aboutit à une perte de fonctionnalité et à une agrégation des protéines qui s'accumulent au cours du temps (Akchiche et al., 2012; Bossenmeyer-Pourié et al., 2013).

A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences d'une carence précoce en donneurs de méthyles sur le développement de l'hypothalamus qui joue un rôle déterminant dans le contrôle de la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique.

Au cours de cette étude, nous avons évalué l'impact de la carence en donneurs de méthyles sur la signalisation métabolique périphérique (Ghréline, Leptine, Insuline...) et la mise en place des réseaux hypothalamiques, ainsi que les conséquences d'une supplémentation tardive en folate sur la plasticité hypothalamique et le système à Ghréline de l'estomac.

Un environnement nutritionnel inadéquat, tel qu'une carence en vitamines B donneurs de méthyles, en période précoce, altère les mécanismes épigénétiques/épigénomiques du programme neurogénique et peut modifier l'expression de gènes dont le promoteur est régulé par méthylation. C'est le cas par exemple du promoteur des gènes codant pour le NPY et la Pro-opiomélanocortine (POMC) (Plagemann et al., 2009). Cependant, cela n'était pas encore décrit pour le promoteur du gène codant pour la Ghréline. Un défaut d'intégration des signaux métaboliques périphériques ainsi qu'une altération des mécanismes épigénétiques pourraient être responsables d'anomalies dans l'ontogenèse spatio-temporelle de l'hypothalamus, dans la différenciation neuronale et la mise en place fonctionnelle des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire.

La supplémentation en acide folique est usuellement prescrite aux femmes jusqu'à la fin du premier trimestre de grossesse. Cependant, aucune étude ou recommandation ne porte sur une supplémentation plus tardive, en période périnatale, qui correspond pourtant à une phase

cruciale de la maturation cérébrale en termes de réarrangement synaptique et de mise en place des réseaux neuronaux (Nash, 2002). En effet, des données de la littérature sont en faveur d'un rôle délétère de certains facteurs environnementaux, parmi lesquels une insuffisance en folate, au cours des dernières étapes de la grossesse (Craciunescu et al., 2010; Raznahan et al., 2012). Nous avons évalué les effets d'une supplémentation périnatale, soit du dernier tiers de la gestation, qui correspond à la troisième semaine chez le rat, jusqu'au sevrage des ratons à 21 jours postnatals.

Les résultats de notre travail ont montré qu'une carence gestationnelle en donneurs de méthyles entraîne une diminution des taux plasmatiques des vitamines B9 et B12 et une accumulation d'homocystéine plasmatique et tissulaire, notamment au niveau cérébral et de la glande gastrique. L'accumulation d'homocystéine est associée à des anomalies développementales de type spina bifida et à un retard de croissance chez les ratons à 21 jours. Le poids corporel des ratons est diminué de 55% et la longueur du fémur de 21%.

L'accumulation d'homocystéine est toxique pour les cellules. D'une part, elle entraîne l'agrégation des protéines ainsi que la perte de leur fonction (Akchiche et al., 2012), ce qui conduit à l'activation du stress oxydant, de l'apoptose cellulaire et de l'inflammation, pouvant participer au retard de croissance (Bossenmeyer-Pourié et al., 2010, 2013). Dans notre modèle d'étude, tous ces signes ont été observés au niveau de la muqueuse gastrique, y compris à 450 jours après un retour à une alimentation normale. Il a été mis en évidence une N-homocystéinylation des protéines du cytosquelette, comme l'actine et la E-cadhérine, qui était associée à une diminution de l'interaction avec leurs protéines partenaires. Nous avons également observé une persistance de l'activation de la voie NFκB en lien avec l'expression de marqueurs inflammatoires et une augmentation de l'expression de la superoxyde dismutase (SOD) signe de la présence d'un stress oxydant. L'ensemble de ces mécanismes aboutit à une mort cellulaire accrue par apoptose et une diminution de l'épaisseur de la muqueuse gastrique chez le rat de 450 jours. Cette érosion inflammatoire définitive de la muqueuse gastrique, malgré un retour à une alimentation normale au sevrage, se manifeste par une réduction importante des cellules à mucus, les « *mucous pit cells* » qui sécrètent en haut de la glande gastrique les différentes mucines constituant le mucus chargé de protéger la muqueuse (Karam et al., 2003).

Les cellules endocrines à Ghréline étaient délocalisées en haut de la glande chez les rats MDD à 21 jours avec pour conséquence une réduction du taux plasmatique de Ghréline. Cependant, à 450 jours, les cellules étaient à nouveau majoritairement localisées à la base des glandes et

le taux plasmatique de Ghréline était normalisé. Ces résultats suggèrent qu'un retour à une alimentation normale permet de restaurer partiellement l'organisation de la muqueuse gastrique, en particulier au niveau de sa fonction endocrine ; cependant, la persistance des phénomènes inflammatoires aboutit à une érosion constante de la partie haute de la muqueuse et à des dommages irréversibles de l'estomac.

La Ghréline est connue pour agir sur l'hormone de croissance et sur les neurones à NPY/AgRP dans l'hypothalamus (Monteiro and Batterham, 2017). La diminution de son taux plasmatique à 21 jours pourrait participer au retard de croissance observé chez le raton MDD. L'appétit est un phénomène bien régulé impliquant l'interaction de diverses hormones et neurotransmetteurs pour un contrôle efficace. Cette régulation implique deux mécanismes principaux : les régulateurs du système nerveux central et les régulateurs périphériques (Ans et al., 2018). Un dérèglement de ces mécanisme au cours de la mise en place des réseaux hypothalamiques entraîne une perturbation de la production de neuropeptides dans le noyau arqué et des anomalies dans ses projections vers les autres noyaux hypothalamiques intervenant dans la régulation de la prise alimentaire (Korner and Leibel, 2003).

Au niveau cérébral, la carence en donneurs de méthyles affecte le poids et la taille du cerveau qui sont significativement diminués (respectivement de 29% et de 12%), avec une atteinte importante des structures intracérébrales comme l'hippocampe et l'hypothalamus. Au niveau moléculaire nos travaux antérieurs ont montré que la MDD à l'âge embryonnaire (E20), s'accompagnait d'une augmentation de l'expression de let-7a, miR-34 et miR 124 dans l'hippocampe (Geoffroy et al., 2017; Kerek et al., 2013).

Les microARNs sont d'importants régulateurs de l'expression des gènes agissant au niveau post-transcriptionnel. L'étude de Petri et al., (2014) a montré que certains microARNs sont indispensables pour le développement du cerveau, tel que miR124 qui intervient dans la différenciation des neurones et la plasticité synaptique (Vo et al., 2010). Il a également été démontré que certains microARNs sont abondamment exprimés au niveau de l'hypothalamus, comme miR-7, Let-7 et miR-9 (Meister et al., 2013). Let-7 inhibe le gène *Mash1* intervenant dans la neurogenèse, induisant ainsi la diminution de la neurogenèse in vitro (Cimadamore et al., 2013). De plus, la suppression de Dicer, une enzyme intervenant dans la maturation des précurseurs des microARNs dans les cellules exprimant la POMC, entraîne l'échec de développement des neurones sécrétant la POMC et à son tour provoque l'obésité et perturbe le métabolisme du glucose (Scheeberger et al., 2012).

A l'âge de 21 jours, nous avons montré que la carence en folate et vitamine B12 induisait des modifications de l'expression des miR différentes de celles relevées chez l'embryon. En effet, nous avons observé une baisse significative de l'expression des microARNs miR-34a et miR-23a impliqués dans la division, la différenciation et l'apoptose cellulaire, tandis que l'expression de let7a n'était plus modifiée. Cette séquence de modification de l'expression des miR nous a permis d'émettre l'hypothèse que la MDD induisait une différenciation prématurée des structures ne permettant pas une prolifération suffisante pour un développement harmonieux (Goefroy et al., 2017 ; Goefroy et al., 2019).

Dans notre modèle de rat MDD, ces anomalies épigénétiques sont associées à un défaut d'intégration des signaux métaboliques périphériques puisque les taux plasmatiques de Ghreline et de leptine sont diminués tandis que ceux du PYY sont augmentés, ce qui aboutit à une perturbation de l'expression des neuropeptides hypothalamiques et des récepteurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Nous avons ainsi observé que la carence en donneurs de méthyles aboutissait à la stimulation conjointe et désorganisée de l'expression de neuropeptides orexigènes (NPY/Ghrelin) et anorexigènes (POMC) au niveau de l'hypothalamus, ce qui consolide notre hypothèse d'un défaut de régulation centrale de la prise alimentaire.

Outre les principales projections des neurones hypophysaires et autonomes dans le cerveau moyen et postérieur, l'une des caractéristiques les plus importantes de l'hypothalamus est que ses fibres efférentes atteignent les noyaux internes, en particulier l'ARC. Les noyaux produisant le NPY et la POMC se projettent ensuite dans le VMH, le LH et le PVN pour réguler la prise alimentaire et la dépense énergétique. Le nombre de ces fibres efférentes dans l'ARC influence directement le métabolisme, par exemple il a été montré une diminution des neurones de l'ARC en réponse à un régime maternel riche en graisses, provoquant l'obésité et des troubles du métabolisme du glucose chez la progéniture (Vogt et al., 2014). Ceci suggère que les gènes intervenant dans le développement de l'hypothalamus, jouent également un rôle dans son fonctionnement (Gao and Sun, 2016) ; ainsi une altération de l'expression des neuropeptides hypothalamiques peut perturber, pendant la période critique que constitue la période périnatale, la mise en place des projections neuronales vers les autres noyaux de l'hypothalamus intervenant dans la régulation de la prise alimentaire et aboutir *in fine* à un retard de croissance. L'analyse des projections neuronales de l'hypothalamus des rats MDD n'a pas été faite au cours de cette étude mais sera effectuée par la suite au laboratoire et permettra de compléter ces résultats.

Les glucocorticoïdes font partie des signaux périphériques pouvant intervenir dans la régulation de la prise alimentaire. Le plus souvent ils agissent comme des facteurs orexigènes. Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont abondants au niveau des différents noyaux de l'hypothalamus et sont indispensables pour la régulation de la balance énergétique. Les glucocorticoïdes stimulent l'expression du neuropeptide Y, tandis qu'ils inhibent la synthèse et la libération de la POMC (Liu et al., 2014). Les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) de l'hypothalamus sont parmi les premiers acteurs de la programmation fœtale pouvant induire une altération de la balance énergétique et la prédisposition des portées aux désordres métaboliques. Dans un modèle de sous-nutrition chez le mouton, il a été montré que la sous-alimentation de la mère résulte en une diminution de la méthylation des promoteurs des récepteurs GR, une altération de la modification des histones et une augmentation de l'expression de l'ARNm de GR dans la région hypothalamique gérant la balance énergétique des fœtus (Stevens et al., 2010).

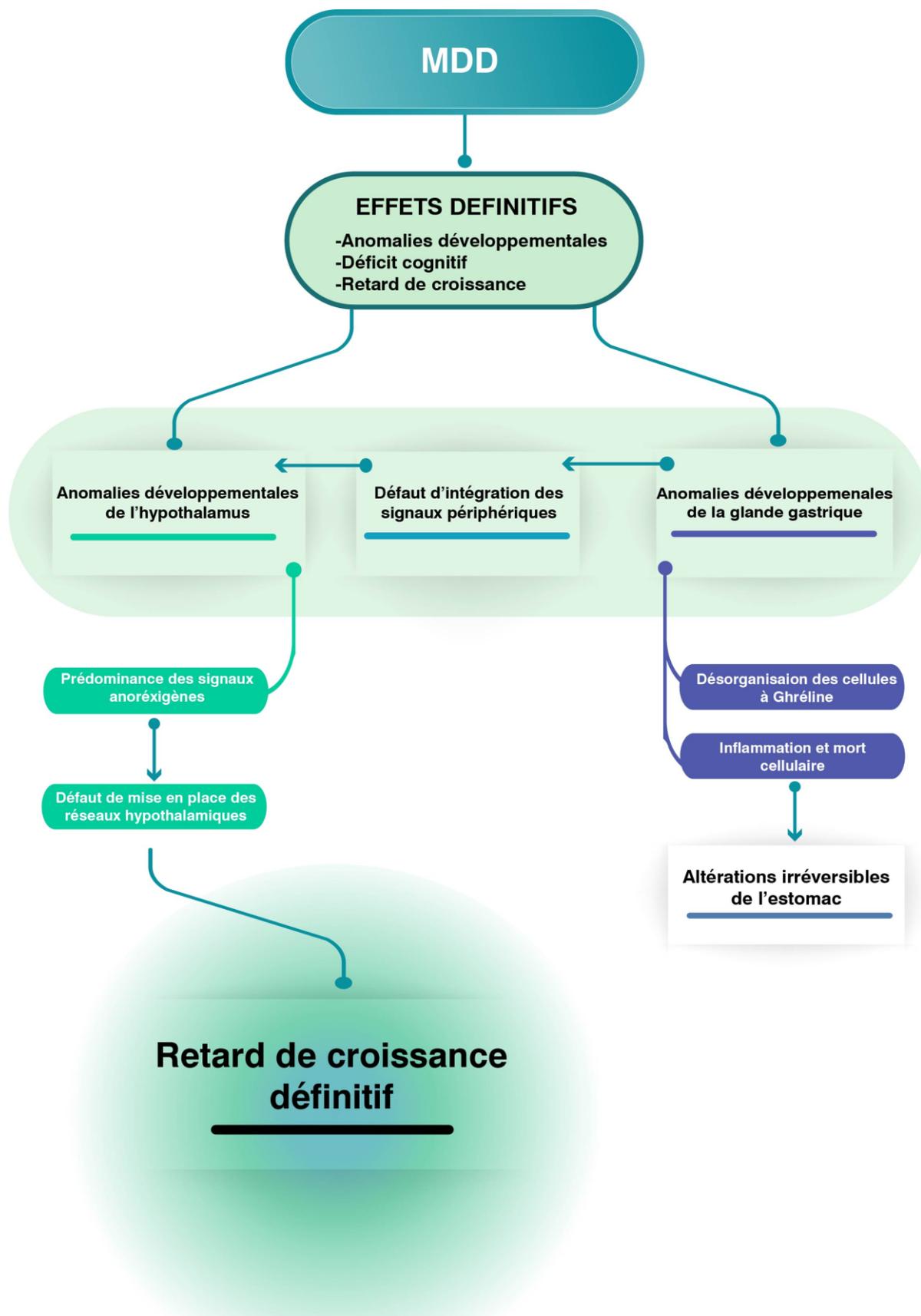
Nos analyses sur les tissus hypothalamiques des rats de 21 jours, ont montré que l'expression de l'ARNm du récepteur aux glucocorticoïdes est affectée en conditions de carence en donneurs de méthyles. Elles ont également montré une diminution de l'expression protéique de GR, ainsi que sa N-homocystéinylation au niveau du site de liaison du ligand qui entraîne son agrégation et sa localisation cytoplasmique. Ces résultats sont en faveur d'une perte de fonctionnalité de la voie corticotrope centrale qui participerait à la perturbation de l'expression des neuropeptides hypothalamiques aboutissant au retard de croissance.

Dans la littérature, il a été décrit que la supplémentation en folate est bénéfique au cours du développement embryonnaire, en particulier au cours du premier trimestre. Des études de supplémentation en multivitamines contenant l'acide folique ou avec l'acide folique seul, ont montré une prévention des anomalies de fermeture du tube neural (Czeizel, 2011). La principale source de supplémentation en acide folique avant la conception est la consommation de légumes verts et la supplémentation par voie orale car il s'agit de la principale source de transfert transplacentaire de folate/acide folique à l'embryon, d'où la nécessité de conseiller aux femmes de suivre un régime alimentaire sain, comme le recommande le guide alimentaire canadien (Wilson et al., 2015).

Nos travaux ont montré que la supplémentation en folate à partir de la troisième semaine de gestation jusqu'au sevrage chez le rat était bénéfique et pouvait améliorer voire restaurer certains des effets délétères de la carence en donneurs de méthyles. Nous avons ainsi obtenu une réduction significative du retard de croissance et du retard d'ossification permettant une

amélioration des signes d'altération du tube neural, en lien avec la restauration de l'expression des microARNs affectée. La supplémentation en folate a également permis la restauration du système endocrine gastrique à Ghréline ainsi que la restauration partielle de l'expression des neuropeptides et récepteurs hypothalamiques. Ainsi, cette supplémentation périnatale en folate influence de manière bénéfique la plasticité développementale et la programmation épigénomique des réseaux hypothalamiques.

Les recommandations actuelles mettent l'accent sur le fait que le risque de récurrence pour un fœtus atteint d'une anomalie de fermeture du tube neural est partagé par les antécédents reproductifs de la mère et du père mais seule la mère est supplémentée en acide folique avant la conception et pendant le premier trimestre de grossesse (Canada, 2009). Il serait donc important d'évaluer également les effets d'une supplémentation paternelle en acide folique dans la prévention de ces anomalies congénitales et une étude est actuellement en cours au laboratoire pour évaluer les conséquences d'une déficience paternelle en donneurs de méthyles sur la descendance. En effet, des études ont montré qu'il existe des régions de l'épigénome du sperme sensible à l'environnement, qui répondent au régime alimentaire et qui intègrent les modifications dans la carte épigénomique transférée à la descendance, ce qui peut induire des anomalies développementales ou même des troubles du métabolisme sur le long terme chez la progéniture (Lambrot et al., 2013). Ceci consolide la nécessité d'évaluation des effets de la carence et de la supplémentation en folate paternelle sur le développement embryonnaire.



V-Conclusion et perspectives

Pris dans leur globalité, les résultats de nos études montrent qu'une carence en donneurs de méthyles induit des anomalies développementales, un retard de croissance et des troubles cognitifs irréversibles. Ces troubles persistants sont associés au niveau périphérique à une réaction inflammatoire, un stress oxydant et une apoptose cellulaire responsable d'une désorganisation de la glande gastrique et d'une altération des signaux métaboliques périphériques. Au niveau cérébral, ces troubles sont associés à des anomalies morphologiques du cerveau en lien avec des perturbations épigénétiques et une altération d'expression des microARNs engendrant un dérèglement de l'expression coordonnée des neuropeptides hypothalamiques centraux. Le défaut d'intégration des signaux métaboliques et l'expression discordante des neuropeptides centraux pourraient ainsi être responsables d'un désordre fonctionnel dans la mise en place des réseaux hypothalamiques régulateurs de l'homéostasie énergétique et contribuer au retard de croissance définitif observé chez la progéniture, suggérant une programmation fœtale et périnatale de ces réseaux.

Une supplémentation tardive en folate (âge embryonnaire E13-sevrage des rats) au cours de cette fenêtre de mise en place et de maturation des réseaux hypothalamiques semble être bénéfique et réduire les effets de la carence en donneurs de méthyles tant au niveau périphérique que central. Ces résultats posent la question de la pertinence d'un changement dans la politique de supplémentation en folate chez la femme enceinte, mais également chez le nouveau-né présentant un retard de croissance.

Afin de compléter ce travail, il serait intéressant d'analyser d'un point de vue anatomique et fonctionnel les projections axonales du noyau arqué vers les autres noyaux hypothalamiques et extra-hypothalamiques intervenant dans la régulation de la prise alimentaire et d'étudier les effets d'une supplémentation en folate maintenue après le sevrage des rats à 21 jours.

Nos travaux portant sur les relations entre les perturbations périphériques et centrales ont également donné naissance à un projet au sein de l'équipe qui a pour objectif d'élucider l'impact de la carence en micronutriments donneurs de méthyles (vitamines B9 et B12) sur le dialogue intestin-cerveau et la composition du microbiote intestinal très sensible à l'alimentation et jouant un rôle dans les maladies d'ordre neurologiques, telles que la dépression, l'anxiété et l'autisme. Ce projet sera mené à l'interface de l'équipe du Pr. Carine Pourié et celle du Pr. Laurent Perrin-Biroulet par le Dr Tunay Kokten recruté cette année sur un poste d'enseignant-chercheur. Il se décline en plusieurs parties ; premièrement, l'analyse de l'impact de la carence en donneurs de méthyles sur la mise en place du microbiote

intestinal et sur le dialogue intestin-cerveau. Deuxièmement, l'étude du rôle de cette perturbation du dialogue intestin-cerveau dans la mise en place des réseaux hypothalamiques régulant l'homéostasie énergétique. Troisièmement, vérifier si l'altération de la communication intestin-cerveau issue de la programmation fœtale par la carence en donneurs de méthyles, est un facteur de prédisposition au développement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

VI-Références bibliographiques

Aggrey, S.E., González-Cerón, F., Rekaya, R., and Mercier, Y. (2018). Gene expression differences in the methionine remethylation and transsulphuration pathways under methionine restriction and recovery with D, L-methionine or D,L-HMTBA in meat-type chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 102, e468–e475.

Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Kerek, R., Martin, N., Pourié, G., Koziel, V., Helle, D., Alberto, J.-M., Ortiou, S., Camadro, J.-M., et al. (2012). Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J.* 26, 3980–3992.

al, G.M., et Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. - PubMed - NCBI.

Ans, A.H., Anjum, I., Satija, V., Inayat, A., Asghar, Z., Akram, I., and Shrestha, B. (2018). Neurohormonal Regulation of Appetite and its Relationship with Stress: A Mini Literature Review. *Cureus* 10, e3032.

Arora, K., Sequeira, J.M., Hernández, A.I., Alarcon, J.M., and Quadros, E.V. (2017). Behavioral alterations are associated with vitamin B12 deficiency in the transcobalamin receptor/CD320 KO mouse. *PLoS One* 12.

Bagri, A., Cheng, H.-J., Yaron, A., Pleasure, S.J., and Tessier-Lavigne, M. (2003). Stereotyped Pruning of Long Hippocampal Axon Branches Triggered by Retraction Inducers of the Semaphorin Family. *Cell* 113, 285–299.

Bai, Y.-P., Liu, Y.-H., Chen, J., Song, T., You, Y., Tang, Z.-Y., Li, Y.-J., and Zhang, G.-G. (2007). Rosiglitazone attenuates NF- κ B-dependent ICAM-1 and TNF- α production caused by homocysteine via inhibiting ERK1/2/p38MAPK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 20–26.

Bailey, L.B., and Hausman, D.B. (2018). Folate status in women of reproductive age as basis of neural tube defect risk assessment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1414, 82–95.

Bauer, P.V., Hamr, S.C., and Duca, F.A. (2016). Regulation of energy balance by a gut-brain axis and involvement of the gut microbiota. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 737–755.

Bazhan, N., and Zelena, D. (2013). Food-intake regulation during stress by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res. Bull.* 95, 46–53.

Bellinger, L.L., and Bernardis, L.L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol. Behav.* 76, 431–442.

Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 22, 9048–9052.

Bergmann, S., Shatrov, V., Ratter, F., Schiemann, S., Schulze-Osthoff, K., and Lehmann, V. (1994). Adenosine and homocysteine together enhance TNF-mediated cytotoxicity but do not alter activation of nuclear factor-kappa B in L929 cells. *The Journal of Immunology* 153, 1736–1743.

- Bian, S., Xu, T., and Sun, T. (2013). Tuning the cell fate of neurons and glia by microRNAs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 928–934.
- Bilichak, A., and Kovalchuk, I. (2017). The Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) Assay for the Analysis of Locus-Specific Changes in Methylation Patterns. *Methods Mol. Biol.* 1456, 63–71.
- Blaise, S.A., Nédélec, E., Schroeder, H., Alberto, J.-M., Bossenmeyer-Pourrié, 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.
- Bloom, S. (2007). Hormonal regulation of appetite. *Obes Rev* 8 *Suppl* 1, 63–65.
- Bose, K.S., and Sarma, R.H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1173–1179.
- Bossenmeyer-Pourrié, C., Blaise, S., Pourrié, G., Tomasetto, C., Audonnet, S., Ortiou, S., Koziel, V., Rio, M.-C., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., 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, 270–277.
- Bossenmeyer-Pourrié, C., Pourrié, G., Koziel, V., Helle, D., Jeannesson, E., Guéant, J.-L., and Beck, B. (2013). Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through N-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation. *FASEB J.* 27, 2185–2197.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108–110.
- Boyd, J.D., and Hamilton, W.J. (1960). The giant cells of the pregnant human uterus. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 67, 208–218.
- Burbridge, S., Stewart, I., and Placzek, M. (2016). Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. In *Comprehensive Physiology*, R. Terjung, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 623–643.
- Caffrey, A., McNulty, H., Irwin, R.E., Walsh, C.P., and Pentieva, K. (2018). Maternal folate nutrition and offspring health: evidence and current controversies. *Proc Nutr Soc* 1–13.
- Canada, H. (2009). Prenatal Nutrition Guidelines for Health Professionals - Background on Canada's Food Guide.
- Cellarier, E., Durando, X., Vasson, M.P., Farges, M.C., Demiden, A., Maurizis, J.C., Madelmont, J.C., and Chollet, P. (2003). Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* 29, 489–499.
- Chen, H., Xing, J., Hu, X., Chen, L., Lv, H., Xu, C., Hong, D., and Wu, X. (2017). Inhibition of heat shock protein 90 rescues glucocorticoid-induced bone loss through enhancing bone formation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 171, 236–246.

- Cheung, G.T.Y., Siow, Y.L., and O, K. (2008). Homocysteine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells via NF- κ B activation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *86*, 88–96.
- Cimadamore, F., Amador-Arjona, A., Chen, C., Huang, C.-T., and Terskikh, A.V. (2013). SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, E3017-3026.
- Copp, A.J., and Greene, N.D.E. (2013). Neural tube defects--disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* *2*, 213–227.
- Coppedè, F., Stoccoro, A., Lazzarotti, A., Spisni, R., and Migliore, L. (2018). Investigation of GHSR and GHRL methylation in colorectal cancer. *Epigenomics* *10*, 1525–1539.
- Coppin, G. (2016). The anterior medial temporal lobes: Their role in food intake and body weight regulation. *Physiol. Behav.* *167*, 60–70.
- Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F., and Cone, R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* *24*, 155–163.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., et al. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649–661.
- Craciunescu, C.N., Johnson, A.R., and Zeisel, S.H. (2010). Dietary choline reverses some, but not all, effects of folate deficiency on neurogenesis and apoptosis in fetal mouse brain. *J. Nutr.* *140*, 1162–1166.
- Czeizel, A.E. (2011). Periconceptional folic acid-containing multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and cardiovascular malformations. *Ann. Nutr. Metab.* *59*, 38–40.
- Denissen, K.F.M., Heil, S.G., Eussen, S.J.P.M., Heeskens, J.P.J., Thijs, C., Mommers, M., Smits, L.J.M., van Dongen, M.C.J.M., and Dagnelie, P.C. (2019). Intakes of Vitamin B-12 from Dairy Food, Meat, and Fish and Shellfish Are Independently and Positively Associated with Vitamin B-12 Biomarker Status in Pregnant Dutch Women. *J. Nutr.* *149*, 131–138.
- DeSesso, J.M., Scialli, A.R., and Holson, J.F. (1999). Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. *Am. J. Med. Genet.* *87*, 143–162.
- Dietrich-Muszalska, A., Malinowska, J., Olas, B., Głowacki, R., Bald, E., Wachowicz, B., and Rabe-Jabłońska, J. (2012). The Oxidative Stress May be Induced by the Elevated Homocysteine in Schizophrenic Patients. *Neurochem Res* *37*, 1057–1062.
- Douira-Khomsy, W., Bellagha, I., and Adamsbaum, C. (2009). Pathologie malformative de la ligne mediane chez l'enfant. *Journal de Radiologie* *90*, 1213.

- Dror, D.K., and Allen, L.H. (2018). Vitamin B-12 in Human Milk: A Systematic Review. *Adv Nutr* 9, 358S-366S.
- Ducker, G.S., and Rabinowitz, J.D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 25, 27–42.
- Ebara, S. (2017). Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies* 57, 138–141.
- Eibach, S., Moes, G., Hou, Y.J., Zovickian, J., and Pang, D. (2017). Unjoined primary and secondary neural tubes: junctional neural tube defect, a new form of spinal dysraphism caused by disturbance of junctional neurulation. *Childs Nerv Syst* 33, 1633–1647.
- Ellacott, K.L.J., Halatchev, I.G., and Cone, R.D. (2006). Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology* 147, 3190–3195.
- Fernandes, M.F., Sharma, S., Hryhorczuk, C., Auguste, S., and Fulton, S. (2013). Nutritional controls of food reward. *Can J Diabetes* 37, 260–268.
- Finer, S., Saravanan, P., Hitman, G., and Yajnik, C. (2014). The role of the one-carbon cycle in the developmental origins of Type 2 diabetes and obesity. *Diabet. Med.* 31, 263–272.
- Fiskerstrand, T., Christensen, B., Tysnes, O.B., Ueland, P.M., and Refsum, H. (1994). Development and Reversion of Methionine Dependence in a Human Glioma Cell Line: Relation to Homocysteine Remethylation and Cobalamin Status. *Cancer Res* 54, 4899–4906.
- Foster, M.T., Song, C.K., and Bartness, T.J. (2010). Hypothalamic paraventricular nucleus lesion involvement in the sympathetic control of lipid mobilization. *Obesity (Silver Spring)* 18, 682–689.
- Froese, D.S., Fowler, B., and Baumgartner, M.R. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 0.
- Gali Ramamoorthy, T., Begum, G., Harno, E., and White, A. (2015). Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. *Front Neurosci* 9, 126.
- Ganguly, P., and Alam, S.F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J* 14, 6.
- Gao, Y., and Sun, T. (2016). Molecular regulation of hypothalamic development and physiological functions. *Mol Neurobiol* 53, 4275–4285.
- Geoffroy, A., Kerek, R., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Daval, J.-L., and Bossenmeyer-Pourié, C. (2017a). Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. *Mol. Neurobiol.* 54, 5017–5033.

Geoffroy, A., Kerek, R., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Daval, J.-L., and Bossenmeyer-Pourié, C. (2017b). Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. *Mol. Neurobiol.* *54*, 5017–5033.

Geoffroy, A., Saber-Cherif, L., Pourié, G., Helle, D., Umoret, R., Guéant, J.-L., Bossenmeyer-Pourié, C., and Daval, J.-L. (2019). Developmental Impairments in a Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid. *Int J Mol Sci* *20*.

Ghemrawi, R., Pooya, S., Lorentz, S., Gauchotte, G., Arnold, C., Gueant, J.-L., and Battaglia-Hsu, S.-F. (2013). Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis* *4*, e553.

Gille, D., and Schmid, A. (2015). Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutr. Rev.* *73*, 106–115.

Glier, M.B., Green, T.J., and Devlin, A.M. (2014). Methyl nutrients, DNA methylation, and cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res* *58*, 172–182.

Gluck, M.E., Viswanath, P., and Stinson, E.J. (2017). Obesity, Appetite, and the Prefrontal Cortex. *Curr Obes Rep* *6*, 380–388.

Goto, M., Arima, H., Watanabe, M., Hayashi, M., Banno, R., Sato, I., Nagasaki, H., and Oiso, Y. (2006). Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology* *147*, 5102–5109.

Green, R., Allen, L.H., Bjørke-Monsen, A.-L., Brito, A., Guéant, J.-L., Miller, J.W., Molloy, A.M., Nexo, E., Stabler, S., Toh, B.-H., et al. (2017). Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 17040.

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

Guéant, J.-L., Chéry, C., Oussalah, A., Nadaf, J., Coelho, D., Josse, T., Flayac, J., Robert, A., Koscinski, I., Gastin, I., et al. (2018). APRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nat Commun* *9*, 67.

H, A.A., I, A., V, S., A, I., Z, A., I, A., and B, S. (2018). Neurohormonal Regulation of Appetite and its Relationship with Stress: A Mini Literature Review. *Cureus* *10*.

Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B., and Hopwood, D. (1994). Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *Journal of Cell Science* *107*, 3569–3577.

Halpern, B.C., Clark, B.R., Hardy, D.N., Halpern, R.M., and Smith, R.A. (1974). The Effect of Replacement of Methionine by Homocystine on Survival of Malignant and Normal Adult Mammalian Cells in Culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 1133–1136.

- Harwood, H.J. (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63, 57–75.
- Higgs, S. (2008). Cognitive influences on food intake: the effects of manipulating memory for recent eating. *Physiol. Behav.* 94, 734–739.
- Hine, C., and Mitchell, J.R. (2015). Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway. *Exp. Gerontol.* 68, 26–32.
- Hine, C., Harputlugil, E., Zhang, Y., Ruckenstuhl, C., Lee, B.C., Brace, L., Longchamp, A., Treviño-Villarreal, J.H., Mejia, P., Ozaki, C.K., et al. (2015). Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 160, 132–144.
- Hiraoka, M., and Kagawa, Y. (2017). Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto)* 57, 142–149.
- Holst, J.J. (2007). The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* 87, 1409–1439.
- Holt, R.L., and Mikati, M.A. (2011). Care for child development: basic science rationale and effects of interventions. *Pediatr. Neurol.* 44, 239–253.
- Horvath, T.L., and Diano, S. (2004). The floating blueprint of hypothalamic feeding circuits. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 662–667.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141.
- Iyer, R., and Tomar, S.K. (2009). Folate: A Functional Food Constituent. *Journal of Food Science* 74, R114–R122.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33 *Suppl*, 245–254.
- Johnston, M.V., Nishimura, A., Harum, K., Pekar, J., and Blue, M.E. (2001). Sculpting the developing brain. *Adv Pediatr* 48, 1–38.
- Kalhan, S.C. (2016). One Carbon Metabolism in Pregnancy: Impact on Maternal, Fetal and Neonatal Health. *Mol Cell Endocrinol* 435, 48–60.
- Kalita, J., Agarwal, R., Chandra, S., and Misra, U.K. (2013). A study of neurobehavioral, clinical psychometric, and P3 changes in vitamin B12 deficiency neurological syndrome. *Nutr Neurosci* 16, 39–46.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P., and Kalra, P.S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10931–10935.

- Kałużna-Czaplińska, J., Żurawicz, E., Michalska, M., and Rynkowski, J. (2013). A focus on homocysteine in autism. *Acta Biochim. Pol.* 60, 137–142.
- Karam, S.M., Straiton, T., Hassan, W.M., and Leblond, C.P. (2003). Defining Epithelial Cell Progenitors in the Human Oxyntic Mucosa. *STEM CELLS* 21, 322–336.
- Kastrup, W., Mobacken, H., Stockbrügger, R., Swolin, B., and Westin, J. (1986). Malabsorption of Vitamin B12 in Dermatitis Herpetiformis and Its Association with Pernicious Anaemia. *Acta Medica Scandinavica* 220, 261–268.
- Kerek, R., Geoffroy, A., Bison, A., Martin, N., Akchiche, N., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Bossenmeyer-Pourié, C., and Daval, J.-L. (2013). Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis* 4, e755.
- Kerins, D.M., Koury, M.J., Capdevila, A., Rana, S., and Wagner, C. (2001). Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 723–729.
- Keunen, K., Counsell, S.J., and Benders, M.J.N.L. (2017). The emergence of functional architecture during early brain development. *Neuroimage* 160, 2–14.
- Khan, K.M., and Jialal, I. (2018). Folic Acid (Folate) Deficiency. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Kirke, P.N., Molloy, A.M., Daly, L.E., Burke, H., Weir, D.G., and Scott, J.M. (1993). Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q. J. Med.* 86, 703–708.
- Kojima, M., and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: Structure and Function. *Physiological Reviews* 85, 495–522.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Korner, J., and Leibel, R.L. (2003). To eat or not to eat - how the gut talks to the brain. *N. Engl. J. Med.* 349, 926–928.
- Lai, S.-C., Nakayama, Y., Sequeira, J.M., Wlodarczyk, B.J., Cabrera, R.M., Finnell, R.H., Bottiglieri, T., and Quadros, E.V. (2013). The transcobalamin receptor knockout mouse: a model for vitamin B12 deficiency in the central nervous system. *FASEB J.* 27, 2468–2475.
- Lambrot, R., Xu, C., Saint-Phar, S., Chountalos, G., Cohen, T., Paquet, M., Suderman, M., Hallett, M., and Kimmins, S. (2013). Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun* 4, 2889.

- Lamers, Y., Prinz-Langenohl, R., Moser, R., and Pietrzik, K. (2004). Supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma total homocysteine concentrations in healthy women. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 473–478.
- Lau, C., and Rogers, J.M. (2004). Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 72, 300–312.
- Lee, D., Xu, I.M.-J., Chiu, D.K.-C., Lai, R.K.-H., Tse, A.P.-W., Lan Li, L., Law, C.-T., Tsang, F.H.-C., Wei, L.L., Chan, C.Y.-K., et al. (2017). Folate cycle enzyme MTHFD1L confers metabolic advantages in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Invest.* 127, 1856–1872.
- Li, K., Wahlqvist, M.L., and Li, D. (2016). Nutrition, One-Carbon Metabolism and Neural Tube Defects: A Review. *Nutrients* 8.
- Liu, A., and Niswander, L.A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 945–954.
- Liu, C., Lee, S., and Elmquist, J.K. (2014a). Circuits controlling energy balance and mood: inherently intertwined or just complicated intersections? *Cell Metab.* 19, 902–909.
- Liu, J., Garza, J.C., Truong, H.V., Henschel, J., Zhang, W., and Lu, X.-Y. (2007). The melanocortinerig pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. *Endocrinology* 148, 5531–5540.
- Liu, L., Song, Z., Jiao, H., and Lin, H. (2014b). Glucocorticoids increase NPY gene expression via hypothalamic AMPK signaling in broiler chicks. *Endocrinology* 155, 2190–2198.
- López, M., Tovar, S., Vázquez, M.J., Williams, L.M., and Diéguez, C. (2007). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 66, 131–155.
- Luengo, A., Gui, D.Y., and Vander Heiden, M.G. (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol* 24, 1161–1180.
- Lv, Y., Liang, T., Wang, G., and Li, Z. (2018). Ghrelin, a gastrointestinal hormone, regulates energy balance and lipid metabolism. *Biosci. Rep.* 38.
- Magnoni, L.J., Salas-Leiton, E., Peixoto, M.-J., Pereira, L., Silva-Brito, F., Fontinha, F., Gonçalves, J.F.M., Wilson, J.M., Schrama, J.W., and Ozório, R.O.A. (2017). Dietary electrolyte balance affects growth performance, amylase activity and metabolic response in the meagre (*Argyrosomus regius*). *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 211, 8–15.
- Magnusson, I., Cho, J.W., Ihre, T., Olsson, J.E., Posloncek, B., Uvnaus-Moberg, K., and Oust, A.R. (1985). Gastrin and Somatostatin in Plasma and Gastric Biopsy Specimens in Pernicious Anemia. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 20, 623–628.

- Maloney, C.A., Hay, S.M., and Rees, W.D. (2007). Folate deficiency during pregnancy impacts on methyl metabolism without affecting global DNA methylation in the rat fetus. *British Journal of Nutrition* 97, 1090–1098.
- Mariani, J., and Changeux, J.P. (1981). Ontogenesis of olivocerebellar relationships. II. Spontaneous activity of inferior olivary neurons and climbing fiber-mediated activity of cerebellar Purkinje cells in developing rats. *J. Neurosci.* 1, 703–709.
- Martin, A. (2001). The “apports nutritionnels conseillés (ANC)” for the French population. *Reproduction Nutrition Development* 41, 119–128.
- Matafome, P., Eickhoff, H., Letra, L., and Seiça, R. (2017). Neuroendocrinology of Adipose Tissue and Gut-Brain Axis. *Adv Neurobiol* 19, 49–70.
- Mattson, M.P., and Shea, T.B. (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* 26, 137–146.
- Meister, B., Herzer, S., and Silaharoglu, A. (2013). MicroRNAs in the hypothalamus. *Neuroendocrinology* 98, 243–253.
- Mercer, A.J., Hentges, S.T., Meshul, C.K., and Low, M.J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front Neurosci* 7, 19.
- Meyer, K.A., and Shea, J.W. (2017). Dietary Choline and Betaine and Risk of CVD: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Nutrients* 9.
- Mihalache, L., Gherasim, A., Niță, O., Ungureanu, M.C., Pădureanu, S.S., Gavril, R.S., and Arhire, L.I. (2016). Effects of ghrelin in energy balance and body weight homeostasis. *Hormones (Athens)* 15, 186–196.
- Mikulášková, B., Maletínská, L., Zicha, J., and Kuneš, J. (2016). The role of food intake regulating peptides in cardiovascular regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 436, 78–92.
- Mohedano-Moriano, A., Muñoz-López, M., Sanz-Arigita, E., Pró-Sistiaga, P., Martínez-Marcos, A., Legidos-García, M.E., Insausti, A.M., Cebada-Sánchez, S., Arroyo-Jiménez, M.D.M., Marcos, P., et al. (2015). Prefrontal cortex afferents to the anterior temporal lobe in the *Macaca fascicularis* monkey. *J. Comp. Neurol.* 523, 2570–2598.
- Monteiro, M.P., and Batterham, R.L. (2017). The Importance of the Gastrointestinal Tract in Controlling Food Intake and Regulating Energy Balance. *Gastroenterology* 152, 1707-1717.e2.
- Moss, S.F., Calam, J., Agarwal, B., Wang, S., and Holt, P.R. (1996). Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 38, 498.
- Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metab. Clin. Exp.* 64, 13–23.

- Mursleen, M.T., and Riaz, S. (2017). Implication of homocysteine in diabetes and impact of folate and vitamin B12 in diabetic population. *Diabetes Metab Syndr 11 Suppl 1*, S141–S146.
- Nash, J.M. (2002). Inside the womb. *Time 160*, 68–75, 77–78.
- Nicolas, J.P., and Guéant, J.L. (1995). Gastric intrinsic factor and its receptor. *Baillieres Clin. Haematol. 8*, 515–531.
- Nikolopoulou, E., Galea, G.L., Rolo, A., Greene, N.D.E., and Copp, A.J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development 144*, 552–566.
- Obeid, R., and Herrmann, W. (2011). Homocysteine, folic acid and vitamin B12 in relation to pre- and postnatal health aspects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) 43*, 1052–1057.
- Oikonomidi, A., Lewczuk, P., Kornhuber, J., Smulders, Y., Linnebank, M., Semmler, A., and Popp, J. (2016). Homocysteine metabolism is associated with cerebrospinal fluid levels of soluble amyloid precursor protein and amyloid beta. *J. Neurochem. 139*, 324–332.
- O’Rahilly, R. (1979). Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 9*, 273–280.
- O’Rahilly, R., and Müller, F. (2008). Significant features in the early prenatal development of the human brain. *Ann. Anat. 190*, 105–118.
- O’Rahilly, R., Bossy, J., and Müller, F. (1981). [Introduction to the study of embryonic stages in man]. *Bull Assoc Anat (Nancy) 65*, 141–236.
- Paoli, P., Sbrana, F., Tiribilli, B., Caselli, A., Pantera, B., Cirri, P., De Donatis, A., Formigli, L., Nosi, D., Manao, G., et al. (2010). Protein N-Homocysteinylation Induces the Formation of Toxic Amyloid-Like Protofibrils. *Journal of Molecular Biology 400*, 889–907.
- Park, J.M., Kakimoto, T., Kuroki, T., Shiraishi, R., Fujise, T., Iwakiri, R., and Fujimoto, K. (2008). Suppression of Intestinal Mucosal Apoptosis by Ghrelin in Fasting Rats. *Exp Biol Med (Maywood) 233*, 48–56.
- Paul, L., and Selhub, J. (2017). Interaction between excess folate and low vitamin B12 status. *Mol. Aspects Med. 53*, 43–47.
- Pearson, C.A., and Placzek, M. (2013). Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. *Curr. Top. Dev. Biol. 106*, 49–88.
- Pereira, C., Barbosa, R.M., and Laranjinha, J. (2015). Dietary nitrite induces nitrosation of the gastric mucosa: the protective action of the mucus and the modulatory effect of red wine. *J. Nutr. Biochem. 26*, 476–483.

Perna, A.F., Ingrosso, D., and De Santo, N.G. (2003). Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids* 25, 409–417.

Petri, R., Malmevik, J., Fasching, L., Åkerblom, M., and Jakobsson, J. (2014). miRNAs in brain development. *Exp. Cell Res.* 321, 84–89.

Pieroth, R., Paver, S., Day, S., and Lammersfeld, C. (2018). Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep* 7, 70–84.

Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K., et al. (2009). Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 4963–4976.

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

Pribic, T., Kilpatrick, L., Ciccantelli, B., Malagelada, C., Accarino, A., Rovira, A., Pareto, D., Mayer, E., and Azpiroz, F. (2017). Brain networks associated with cognitive and hedonic responses to a meal. *Neurogastroenterol. Motil.* 29.

pubmeddev, and al, M.S., et Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. - PubMed - NCBI.

Qin, C., Li, J., and Tang, K. (2018). The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. *Endocrinology* 159, 3458–3472.

Quadros, E.V., Nakayama, Y., and Sequeira, J.M. (2009). The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood* 113, 186–192.

Raznahan, A., Greenstein, D., Lee, N.R., Clasen, L.S., and Giedd, J.N. (2012). Prenatal growth in humans and postnatal brain maturation into late adolescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11366–11371.

Riccomagno, M.M., and Kolodkin, A.L. (2015). Sculpting Neural Circuits by Axon and Dendrite Pruning. *Annu Rev Cell Dev Biol* 31, 779–805.

Rui, L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord* 14, 387–407.

Rush, E.C., Katre, P., and Yajnik, C.S. (2014). Vitamin B12: one carbon metabolism, fetal growth and programming for chronic disease. *Eur J Clin Nutr* 68, 2–7.

Salamone, J.D., Correa, M., Mingote, S.M., and Weber, S.M. (2005). Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol* 5, 34–41.

- Sbodio, J.I., Snyder, S.H., and Paul, B.D. (2019). Regulators of the transsulfuration pathway. *Br. J. Pharmacol.* *176*, 583–593.
- Scaglione, F., and Panzavolta, G. (2014). Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica* *44*, 480–488.
- Schneeberger, M., Altirriba, J., García, A., Esteban, Y., Castaño, C., García-Lavandeira, M., Alvarez, C.V., Gomis, R., and Claret, M. (2012). Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol Metab* *2*, 74–85.
- Schwartz, G.J. (2000). The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* *16*, 866–873.
- Sewards, T.V. (2004). Dual separate pathways for sensory and hedonic aspects of taste. *Brain Res. Bull.* *62*, 271–283.
- Shipton, M.J., and Thachil, J. (2015). Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. *Clin Med (Lond)* *15*, 145–150.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 551.
- Sipponen, P., Laxén, F., Huotari, K., and Härkönen, M. (2003). Prevalence of low vitamin B12 and high homocysteine in serum in an elderly male population: association with atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* *38*, 1209–1216.
- Smith, G.C., Konycheva, G., Dziadek, M.A., Ravelich, S.R., Patel, S., Reddy, S., Breier, B.H., Vickers, M.H., Owens, J.A., and Ferguson, L.R. (2011). Pre- and postnatal methyl deficiency in the rat differentially alters glucose homeostasis. *J Nutrigenet Nutrigenomics* *4*, 175–191.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., and DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* *271*, 33157–33160.
- Sokol, S.Y. (2016). Mechanotransduction During Vertebrate Neurulation. *Curr. Top. Dev. Biol.* *117*, 359–376.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat. Neurosci.* *8*, 1356–1363.
- Stroylova, Y.Y., Zimny, J., Yousefi, R., Chobert, J.-M., Jakubowski, H., Muronetz, V.I., and Haertlé, T. (2011). Aggregation and structural changes of α S1-, β and κ -caseins induced by homocysteinylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1814*, 1234–1245.
- Sweeney, P., and Yang, Y. (2017). Neural Circuit Mechanisms Underlying Emotional Regulation of Homeostatic Feeding. *Trends Endocrinol. Metab.* *28*, 437–448.

- van Swieten, M.M.H., Pandit, R., Adan, R. a. H., and van der Plasse, G. (2014). The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 61–62, 207–220.
- Takahashi, S., Shigeta, J.-I., Inoue, H., Tanabe, T., and Okabe, S. (1998). Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 275, G1137–G1145.
- Tao, Y.-X. (2005). Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 239, 1–14.
- Tawfik, A., Mohamed, R., Elsherbiny, N.M., DeAngelis, M.M., Bartoli, M., and Al-Shabrawey, M. (2019). Homocysteine: A Potential Biomarker for Diabetic Retinopathy. *J Clin Med* 8.
- Testino, G., Menardo, G., Palombino, M.A., Cornaggia, M., De Iaco, F., and Molinari, F. (1993). [The gastric anatomico-functional aspects (parietal cell mass, stimulated acid secretion and gastrinemia) in pernicious anemia]. *Ann. Ital. Med. Int.* 8, 86–88.
- Timper, K., and Brüning, J.C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech* 10, 679–689.
- Tobet, S.A., and McClellan, K. (2013). *Development of the hypothalamus* (San Rafael, CA, Etats-Unis d'Amérique: Morgan & Claypool Life Sciences).
- Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. (2001). Above and within the genome: epigenetics past and present. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 153–167.
- Vanderhaeghen, P., and Cheng, H.-J. (2010). *Guidance Molecules in Axon Pruning and Cell Death*. Cold Spring Harb Perspect Biol 2.
- Vidmar, M., Grželj, J., Mlinarič-Raščan, I., Geršak, K., and Dolenc, M.S. (2018). Medicines associated with folate-homocysteine-methionine pathway disruption. *Arch. Toxicol.*
- Vijayraghavan, D.S., and Davidson, L.A. (2017). Mechanics of neurulation: From classical to current perspectives on the physical mechanics that shape, fold, and form the neural tube. *Birth Defects Res* 109, 153–168.
- Vogt, M.C., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S.M., Awazawa, M., Hampel, B., Neupert, S., Nicholls, H.T., Mauer, J., Hausen, A.C., et al. (2014). Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* 156, 495–509.
- Watanabe, F., and Bito, T. (2018). Vitamin B12 sources and microbial interaction. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 243, 148–158.
- Waterson, M.J., and Horvath, T.L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab.* 22, 962–970.

- Weir, W., Wang, G., Qi, X., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2005). Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology* 146, 1611–1625.
- Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., and Yanagisawa, M. (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 429–458.
- Wilson, R.D., Genetics Committee, Wilson, R.D., Audibert, F., Brock, J.-A., Carroll, J., Cartier, L., Gagnon, A., Johnson, J.-A., Langlois, S., et al. (2015). Pre-conception Folic Acid and Multivitamin Supplementation for the Primary and Secondary Prevention of Neural Tube Defects and Other Folic Acid-Sensitive Congenital Anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 37, 534–552.
- Wu, Q., Boyle, M.P., and Palmiter, R.D. (2009). Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell* 137, 1225–1234.
- Xiao, Y., Su, X., Huang, W., Zhang, J., Peng, C., Huang, H., Wu, X., Huang, H., Xia, M., and Ling, W. (2015). Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67, 158–166.
- Xie, Q., Li, C., Song, X., Wu, L., Jiang, Q., Qiu, Z., Cao, H., Yu, K., Wan, C., Li, J., et al. (2017). Folate deficiency facilitates recruitment of upstream binding factor to hot spots of DNA double-strand breaks of rRNA genes and promotes its transcription. *Nucleic Acids Res.* 45, 2472–2489.
- Yang, H.-J., Lee, D.-H., Lee, Y.-J., Chi, J.G., Lee, J.Y., Phi, J.H., Kim, S.-K., Cho, B.-K., and Wang, K.-C. (2014). Secondary neurulation of human embryos: morphological changes and the expression of neuronal antigens. *Childs Nerv Syst* 30, 73–82.
- Yang, J., Li, H., Deng, H., and Wang, Z. (2018). Association of One-Carbon Metabolism-Related Vitamins (Folate, B6, B12), Homocysteine and Methionine With the Risk of Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol* 8, 493.
- Yao, Y., Yao, S.L., Yao, S.S., Yao, G., and Lou, W. (1992). Prevalence of vitamin B12 deficiency among geriatric outpatients. *J Fam Pract* 35, 524–528.
- Yi, J., Yuan, J., Gilbert, E.R., Siegel, P.B., and Cline, M.A. (2017). Differential expression of appetite-regulating genes in avian models of anorexia and obesity. *J. Neuroendocrinol.* 29.
- Youn, J., Cho, E., and Lee, J.E. (2018). Association of choline and betaine levels with cancer incidence and survival: A meta-analysis. *Clin Nutr.*
- Yu, J.H., and Kim, M.-S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J* 36, 391–398. Nicotinamide N-Methyltransferase Interacts with Enzymes of the Methionine Cycle and Regulates Methyl Donor Metabolism. Finkelstein the metabolism of homocysteine: pathways and regulation. - PubMed - NCBI.

VII-Annexes

1-Publications

Article1: Developmental Impairments in rat model of methyl donor deficiency: Effects of a late maternal supplementation with folic acid



Article

Developmental Impairments in a Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid

Andréa Geoffroy, Lynda Saber-Cherif , Grégory Pourié, Déborah Helle, Rémy Umoret , Jean-Louis Guéant , Carine Bossenmeyer-Pourié ^{*,†} and Jean-Luc Daval ^{*,†}

Université de Lorraine, Inserm U1256, NGERE, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France; g.andrea@hotmail.fr (A.G.); lynda.saber-cherif@univ-lorraine.fr (L.S.-C.); gregory.pourie@univ-lorraine.fr (G.P.); deborah.helle@univ-lorraine.fr (D.H.); remy.umoret@univ-lorraine.fr (R.U.); jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr (J.-L.G.)

* Correspondence: carine.pourie@univ-lorraine.fr (C.B.-P.); jean-luc.daval@inserm.fr (J.-L.D.);
Tel.: +33-3-7274-6139 (C.B.-P.); +33-3-7274-6132 (J.-L.D.)

† These authors contributed equally to the work.

Received: 31 January 2019; Accepted: 19 February 2019; Published: 23 February 2019



Abstract: Vitamins B9 (folate) and B12 act as methyl donors in the one-carbon metabolism which influences epigenetic mechanisms. We previously showed that an embryofetal deficiency of vitamins B9 and B12 in the rat increased brain expression of let-7a and miR-34a microRNAs involved in the developmental control of gene expression. This was reversed by the maternal supply with folic acid (3 mg/kg/day) during the last third of gestation, resulting in a significant reduction of associated birth defects. Since the postnatal brain is subject to intensive developmental processes, we tested whether further folate supplementation during lactation could bring additional benefits. Vitamin deficiency resulted in weaned pups (21 days) in growth retardation, delayed ossification, brain atrophy and cognitive deficits, along with unchanged brain level of let-7a and decreased expression of miR-34a and miR-23a. Whereas maternal folic acid supplementation helped restore the levels of affected microRNAs, it led to a reduction of structural and functional defects taking place during the perinatal/postnatal periods, such as learning/memory capacities. Our data suggest that a gestational B-vitamin deficiency could affect the temporal control of the microRNA regulation required for normal development. Moreover, they also point out that the continuation of folate supplementation after birth may help to ameliorate neurological symptoms commonly associated with developmental deficiencies in folate and B12.

Keywords: development; postnatal brain maturation; folate; vitamin B12; microRNAs; maternal folate supplementation during lactation

1. Introduction

Numerous studies have shown that epigenetic regulations such as DNA methylation and histone modification play a critical role in genomic programming during development, by regulating cell proliferation and differentiation [1–3]. In this respect, the methyl donors folate (vitamin B9) and vitamin B12 are cofactors in the one-carbon metabolism that plays a key role in transmethylation reactions [4,5]. They promote the remethylation of homocysteine to methionine and are essential for the synthesis of S-adenosylmethionine (SAM), the universal methyl donor for biological methylations [6]. In addition, folate and B12 are key regulators of the concentration of homocysteine which can exert adverse effects such as DNA breakage, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, protein

homocysteinylation, and apoptosis [7–10]. Both vitamins are essential for normal development, and their insufficiency constitutes a risk factor for various developmental disorders such as congenital heart defects, Down syndrome, and particularly neural tube defects [11–13]. This led to public health policies recommending periconceptional supplementation with folic acid, usually until the end of the first trimester of pregnancy [14–18]. However, if prenatal life encompasses foundational and critical phases, brain development and maturation continue during the perinatal and postnatal periods, and it has been largely documented that even subtle alterations of the prenatal environment may have meaningful consequences for later development and functional maturation [19–21].

In previous studies, we showed that a methyl donor deficiency (folate and B12) during the embryofetal period in the rat affects the brain expression of several microRNAs that participate in the developmental control of gene expression, impacting their downstream signaling pathways [22,23]. This process could be reversed by a maternal supply with folic acid during the last third of gestation, resulting in a significant mitigation of methyl donor deficiency-associated defects at birth [23].

By using the same experimental model, we therefore aimed to evaluate whether continued folate supplementation during the lactating period until weaning (postnatal day 21 in rats) could bring additional benefits, notably on brain functional maturation. Taken together, our data showed that in utero deficiency in folate and vitamin B12 was associated postnatally with persisting growth retardation and morphological and functional defects, in line with misexpression of miR-34a and miR-23a. Importantly, perinatal and postnatal exposure to supplementation with folic acid restored microRNA levels and proved to be effective in reducing deficiency-related alterations.

2. Results

2.1. Folate, Vitamin B12, and Homocysteine Plasma Concentrations

As a consequence of the maternal deficiency, plasma levels of folate and vitamin B12 were dramatically reduced in the rat progeny at weaning (postnatal day 21). Concomitantly, homocysteinemia was significantly augmented ($p < 0.01$). Figure 1 shows that folic acid supplementation restored folate concentration without affecting the vitamin B12 status, and significantly reduced hyperhomocysteinemia in deficient pups.

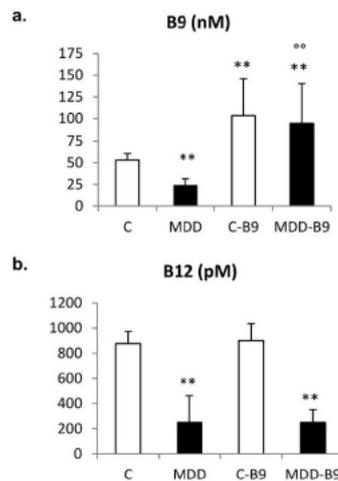


Figure 1. Cont.

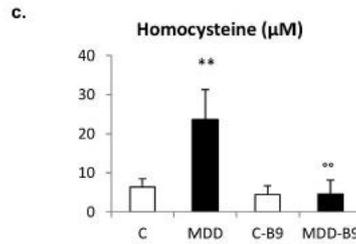


Figure 1. Effects of the maternal dietary regimen on plasma concentrations of folate (a), vitamin B12 (b) and homocysteine (c) in 21-day-old rat pups. Data are mean \pm SD and were obtained from $14 \leq n \leq 39$ individuals. Statistically significant differences: ** $p < 0.01$: With respective control; °° $p < 0.01$: Between MDD and MDD + B9. C = control diet; MDD = methyl donor deficient diet.

2.2. Growth Retardation and Developmental Abnormalities

In rat pups born to deficient dams, the body length was reduced by 26% as compared to controls at 21 days of age, whereas the body weight was decreased by 55% and femur length, reflecting pre- and postnatal growth, was reduced by 21% (Figure 2). The stunting rate could be ameliorated by a maternal supplementation with folic acid (Figure 2).

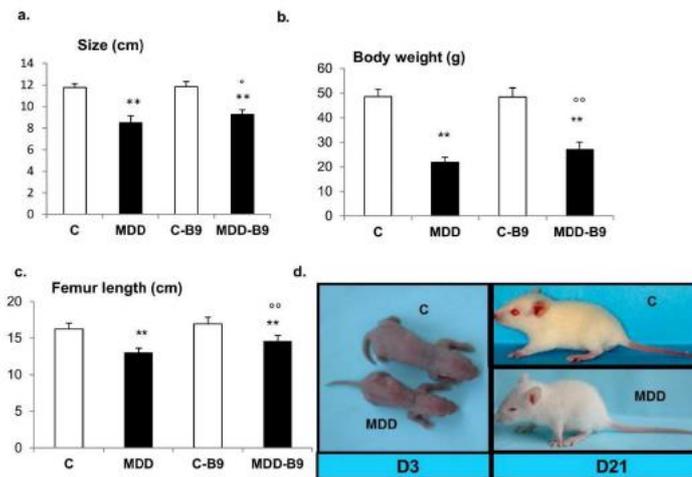


Figure 2. Effects of maternal methyl donor deficiency and folic acid supplementation on rat pup morphometric properties. (a–c) General morphometric measurements in control (C), methyl donor deficient (MDD), supplemented control (C-B9) and supplemented deficient (MDD-B9) rat pups at 21 days of age ($20 \leq n \leq 40$). Data are reported as mean \pm standard deviation. Statistically significant differences between control and MDD rats: ** $p < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: ° $p < 0.05$ and °° $p < 0.01$; (d) Illustration of MDD-associated growth retardation at 3 and 21 postnatal days.

By contrast to controls, 12.5% of deficient fetuses (E20) and 15% of deficient pups at postnatal day 21 were affected by at least one morphological anomaly such as syndactyly, atrophied digits, as well as signs indicative of spina bifida, such as “twisted tail” and open vertebral canal, in addition to delayed ossification and fused vertebrae in the lumbosacral region, as illustrated in Figure 3. Importantly, the occurrence of abnormalities was consistently reduced following folic acid supplementation

that improved cartilage ossification, ameliorated spinal canal phenotype and tail morphology in deficient offspring.

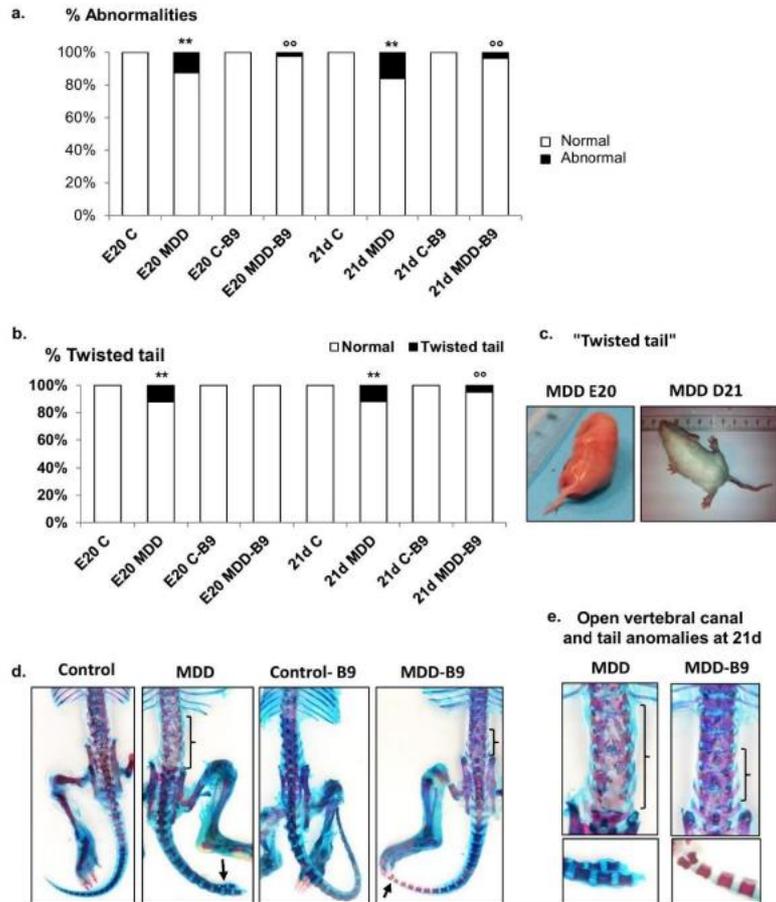


Figure 3. Effects of maternal methyl donor deficiency and folic acid supplementation on developmental abnormalities in the progeny. (a) Occurrence of developmental abnormalities in control and MDD fetuses at embryonic day 20 (E20) and at postnatal day 21 (21 d), and following folic acid (B9) supplementation ($20 \leq n \leq 40$). Statistically significant differences between control and MDD rats: ** $p < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $^{\circ\circ} p < 0.01$; (b) Prevalence of "twisted tail" in controls, MMD and supplemented rats; (c) Illustration of MDD-associated "twisted tail" at E20 and postnatal day 21; (d,e) Photographs of the vertebral canal and tail (Alcian blue/Alizarin red staining) in the various experimental groups at 21 days (square brackets delineate open canal).

The brain size and weight were significantly reduced following exposure to methyl donor deficiency (by 12% and 29%, respectively) (Figure 4). In the hippocampus, the thicknesses of CA1 and CA3 pyramidal cell layers as well as that of the granular cell layer of the dentate gyrus were dramatically affected (about 30%). The same observation was made for the neurogenic subventricular

zone (SVZ). In all cases, maternal supplementation with folic acid allowed significant reduction of these defects.

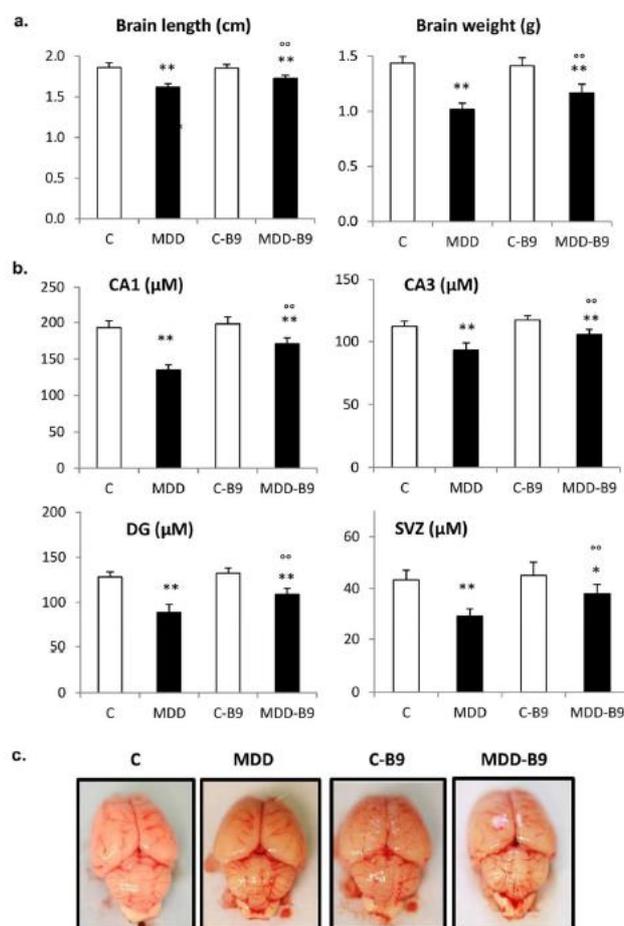


Figure 4. Brain defects associated with maternal methyl donor deficiency in rat pups: influence of folic acid supplementation. (a) Brain length and weight in control (C), methyl donor deficient (MDD), supplemented control (C-B9) and supplemented deficient (MDD-B9) rat pups at 21 days ($20 \leq n \leq 40$). Statistically significant differences between control and MDD rats: ** $p < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: °° $p < 0.01$; (b) thicknesses of hippocampal CA1 pyramidal cell layer, CA3 pyramidal cell layer, granular cell layer of the dentate gyrus (DG), and subventricular zone (SVZ) at 21 days ($6 \leq n \leq 10$). Statistically significant differences between control and MDD rats: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: °° $p < 0.01$; (c) Photographs of representative brain samples showing the absence of macroscopic defects (e.g., improper interhemispheric junction and cerebellar vermis closure) at 21 days regardless of the experimental group.

In a previous study using the same experimental conditions [23], we reported that gestational methyl donor deficiency was associated, at the embryonic stage E20, with the delayed closure of the cephalic parts of the neural tube, as reflected by an improper interhemispheric junction and open

cerebellar vermis. The occurrence of open cerebellar vermis at E20 varied from 41% in deficient fetuses to ~3% in controls. By contrast, as illustrated in Figure 4c, no default could be observed at postnatal day 21, regardless of the experimental group.

2.3. Expression of *let-7a*, *miR-34a* and *miR-23a*

When studied by TaqMan RT-qPCR, the *let-7a* expression level remained unchanged in extracts of hippocampal tissues from deficient pups (Figure 5a), whereas *miR-34a* level was significantly decreased (42%), an effect that was reversed by folic acid supplementation (Figure 5b). Similar observations could be made regarding the expression of *miR-23a*, which was reduced in the same proportions as *miR-34* under deficiency conditions (Figure 5c). The data were confirmed by in situ hybridization in hippocampus tissue sections (Figure 5d–f).

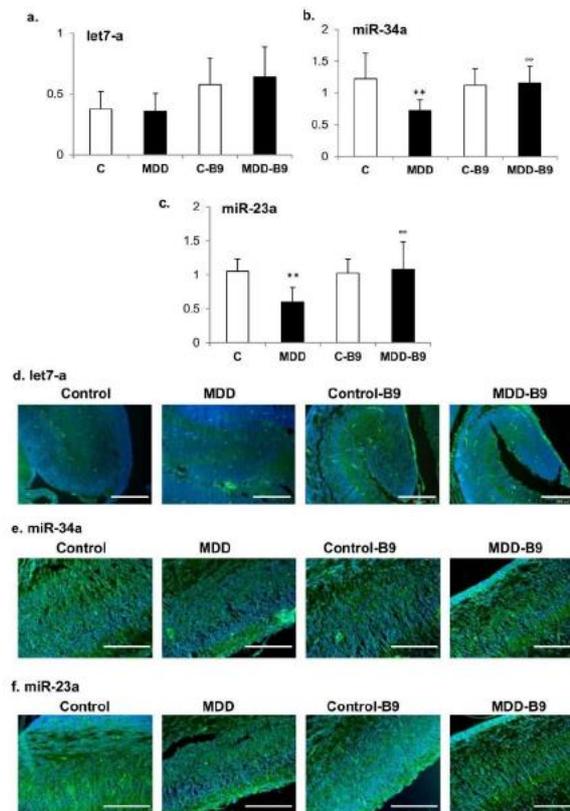


Figure 5. Effects of maternal methyl donor deficiency on the expression of *let-7a*, *miR-34a* and *miR-23a*: influence of folic acid supplementation. (a–c) Expression levels of *let-7a* (a), *miR-34a* (b) and *miR-23a* (c) in arbitrary units in the hippocampus of control (C) and deficient (MDD) rat pups at 21 days, and effects of folic acid (B9) supplementation. Data are reported as mean \pm SD ($6 \leq n \leq 8$). Statistically significant differences between control and MDD: ** $p < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: °° $p < 0.01$; (d–f) Effects of methyl donor deficiency and folic acid supplementation on the expression of *Let-7a* (d), *miR-34a* (e) and *miR-23a* (f) as depicted by in situ hybridization in the hippocampus from rat pups at 21 days. The scale bar corresponds to 200 μ m.

2.4. Neurobehavioral Development

Neurobehavioral development was evaluated through three tests, i.e., the righting reflex at postnatal days 5 and 7, the negative geotaxis at postnatal days 7–11 (both monitoring sensorimotor scores), and the aquatic maze at postnatal days 21–24 (evaluating learning performances). Regarding the early righting reflex, the time necessary to come back to a quadruped position was transiently but significantly increased in the deficient group compared to the control group on the first day of testing, whereas folate supplementation had no significant effect (Figure 6a). In the negative geotaxis test, the time needed to turn up completely in the slope decreased significantly between 7 days and 11 days of age in control pups, indicating improved scores with time. Such amelioration was not observed in deficient pups. Furthermore, folic acid exerted beneficial effects, with improved scores recorded at day 11 compared to day 7 (Figure 6b). Finally, the monitoring of hippocampus-dependent cognitive performances showed that deficient pups always displayed a higher number of errors than controls, reflecting poorer abilities to learn how to escape the maze (Figure 6c). It is noticeable that maternal supplementation improved the learning scores of deficient pups.

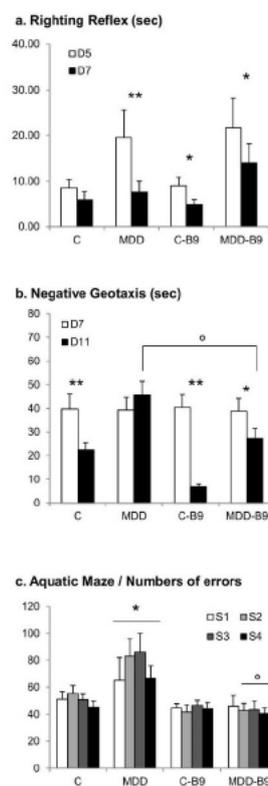


Figure 6. Effects of maternal methyl donor deficiency and folic acid supplementation on rat pup neurobehavioral development. (a) Sensorimotor righting reflex monitored at 5 and 7 days of age; (b) Negative geotaxis monitored daily between 7 and 11 days of age; (c) Learning and memory capacities as reflected by the number of errors in the water-maze from 21 to 24 days of age (sessions 1–4). Data are reported as mean \pm SD ($9 \leq n \leq 26$). Statistically significant differences between control and MDD: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, between MDD and supplemented MDD: $\circ p < 0.05$.

3. Discussion

In our animal model, maternal exposure to methyl donor deficiency is associated with a global growth retardation and brain atrophy, particularly affecting hippocampal cell layers and the neurogenic subventricular zone. We have previously reported various developmental abnormalities, such as spontaneous abortion, congenital malformations, delayed ossification, and a high prevalence of neural tube defects [22,23]. Anomalies previously observed at birth (embryonic day 20) are still present at postnatal day 21. However, whereas we frequently observed improper interhemispheric junction and unclosed cerebellar vermis at E20 [23], none of these defaults could be detected at 21 days, suggesting they are transient and reflect a developmental delay. Nevertheless, sensorimotor properties were shown to be affected in methyl donor deficient pups, while deficits in learning and memory retrieval capacities were recorded at 21–24 days of age, in good accordance with morphologic alterations of the hippocampus.

Folate deficiency is well known to affect fetal and neonatal brain development and can result in various functional deficits [12,24], and the resulting developmental disorders are mediated by a wide range of underlying mechanisms. These include the participation of microRNAs, small noncoding RNAs that regulate target gene expression, which in turn influences cell cycling, cell differentiation, and apoptosis during development [25–28]. In this respect, we have previously shown that gestational deficit in folate and B12 led to a significantly increased brain expression of let-7a and miR-34a in rat fetuses at E20, with subsequent downregulation of their regulatory targets, i.e., Trim71 and Notch signaling partners, respectively [23]. Let-7-associated pathways have been described as key regulators of neural cell proliferation and differentiation [29], and has been tightly associated with the occurrence of neural tube defects [30]. This is consistent with the relatively high prevalence of anomalies of the cephalic part of the neural tube previously depicted in E20 rat pups [23]. miR-34a regulates numerous target genes involved in cell cycle, apoptosis, differentiation, and neuron maintenance [31]. The associated Notch signaling pathway plays multiple roles in the development of the central nervous system including regulating neural stem cell proliferation, survival, self-renewal and differentiation [32]. Interestingly, in the present study, we observed no significant change in the hippocampal expression of let-7a and a decreased expression of miR-34a in deficient pups at 21 days of age. This contrasts with our previous data obtained at E20. Since normal development requires a series of programming processes involving accurate time-controlled gene activation/silencing expressions, our results suggest a desynchronization of the developmental program in conditions of methyl donor deficiency. In other words, gestational vitamin deficiency could modify the windows of normal expression of various microRNAs, affecting their related pathways involved in proper development and influencing the proliferation/differentiation balance.

In addition, we also showed a repression of miR-23a in the brain of 21-day-old rat pups following maternal deficiency. First reported as astrocyte specific [33], miR-23 was shown to be strongly expressed in neuroepithelium progenitor cells in the developing spinal cord [34]. It may play a role in cell proliferation [35] and apoptosis [36,37], and has been described as a key actor for myelination [38,39]. It was also suggested that miR-23a is involved in osteogenic differentiation, as shown in *in vitro* studies [40].

Although not investigated in the present study because it is less involved in methylation processes, vitamin B6 (pyridoxine) is a cofactor of cystathionine beta-synthase that contributes to homocysteine metabolism through the transsulfuration pathway [6]. When it occurs, particularly in the elderly, a vitamin B6 deficiency inhibits the conversion of homocysteine to cystathionine and thus may also cause hyperhomocysteinemia [41].

Early gestational administration of folic acid is recognized to exert beneficial effects, especially for the prevention of neural tube defects such as spina bifida [16,17]. We recently reported that folate supplementation during the third week of gestation in the rat (corresponding to the last trimester in humans) alleviates methyl donor deficiency-associated birth defects [23]. However, the effects of further processing during the postnatal period corresponding to a peak of brain maturation were

not documented. Indeed, numerous neuronal adaptative changes occur during this period, and classic developmental events of neural maturation, circuit refinement and plasticity are known to be influenced significantly by both spontaneous and experience-dependent activities [42–44]. As for gestational supplementation, the maternal administration of folic acid during lactation reduced the frequently observed developmental anomalies following B vitamin deficiency such as growth retardation, delayed ossification, and even signs of neural tube alteration, in line with the restoration of affected microRNAs such as miR-34a and miR-23a, as compared to untreated animals. Most importantly, brain atrophy and functional deficits could be reduced by late folate supply. This suggests that the continuation of folate supplementation after birth may help to ameliorate cognitive functions as those described lately after in utero deficit in folate/vitamin B12 [12,45], as outlined by Hochberg et al. [46] in their review where they address the influence of nutrition in developmental plasticity and epigenetic programming.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Tissue Collection

In vivo experiments were performed on a validated animal model of methyl donor deficiency [47,48]. They were conducted in compliance with the international guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the local University Research Ethics Board. Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) were maintained under standard laboratory conditions, on a 12-h light/dark cycle, with food and water available ad libitum. One month before mating, adult females were fed either a standard diet (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or a methyl donor deficient (MDD) low-choline diet (119 mg/kg vs. 1780 mg/kg) lacking folate and vitamin B12 (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Methionine content (~0.4%) was similar in both diets. The assigned diets were provided to the dams until weaning of the offspring at postnatal day 21. In the supplementation protocol, folic acid (the synthetic form of folate, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) diluted in condensed milk was given per os at the dose of 3 mg/kg per day in a final volume of 1 mL to dams from embryonic days (E) 13 to postnatal day 21. Matched control dams received the same volume of vehicle (i.e., 1 mL condensed milk) over the same period. Whatever the maternal diet, pups were euthanized by excess isoflurane at 21 days of age and blood was withdrawn for subsequent plasma measurements. In some experiments, fetuses were collected at E20. Individuals were weighed and evaluated morphologically with the aid of a BX51WI microscope (Olympus, Rungis, France) coupled to a ProgRes MF cool camera (Jenoptik, Jena, Germany). For biochemical analyses, the brains were rapidly harvested and dissected before freezing in liquid nitrogen and stored at -80°C . For immunohistochemistry, brains were immediately fixed in 4%-paraformaldehyde (24–48 h) at 4°C , dehydrated and included in paraffin. Microtome-generated 12- μm sagittal brain sections were then mounted onto glass slides and stored at ambient temperature.

4.2. Measurement of Plasma Concentrations of Homocysteine, Vitamin B12, and Folate

Homocysteine concentrations were measured by HPLC (Waters, St. Quentin, France) coupled with mass spectrometry (Api 4000 Qtrap; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) [49]. Vitamin B12 and folate concentrations were measured by radio-dilution isotope assay (simulTRAC-SNB; ICN Pharmaceuticals, Versailles, France) [50].

4.3. Histopathological Analyses

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

For skeleton analysis, the procedure adapted from Wallin et al. [51] involves the complete skinning of fresh eviscerated rat embryos following a 24 h-immersion in 95% ethanol. Skeletons were stained

for 48 h with 1% Alcian blue dye, diluted in an ethanol/ acetic acid mix, specific for cartilage staining. Skeletons were then macerated in 2% KOH until bones are visible and stained for 24 h with 0.12% Alizarin red dye diluted in KOH, specific for bone staining. Specimen were finally cleared and hardened in glycerol/ethanol baths and stored in 87% glycerol. Detailed observations and measurements were performed by means of the Cell[®] software (Olympus).

4.4. RNA Extraction

Total RNA was extracted from 0.5 mg of hippocampus using the mirVana[®] miRNA Isolation kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions, and as previously described by Kerek et al. [22]. miRNAs were isolated using a two-step procedure. In the first step, samples were disrupted in a denaturing lysis buffer, and then subjected to acid-phenol/chloroform extraction. The second step consisted of purification over glass-fiber filter that immobilizes the RNA which was later eluted using RNase-free water. According to the manufacturer's instructions, no enrichment procedure is needed while isolating miRNA for expression profiling using miRNA arrays. The concentration and purity of RNA were determined at 260/280 nm by using a nanodrop spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Fisher, Illkirch, France).

4.5. Analysis of let-7a, miR-34a and miR-23a Expression

TaqMan RT-qPCR: Two-step real-time PCR was used to analyze the expression of microRNAs. In the first step total RNA was reverse transcribed using miRNA-specific RT primers (rno-miR-34, rno-miR-23 and U6SnoRNA) and a TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon-sur-Yvette, France). miRNA expression was analyzed using TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems), according to the instructions of the manufacturer. The RT reaction was performed in 15 µL volume, containing 1 µg RNA sample, 3 µL primer, and master mix adjusted to 15 µL/reaction. Products of RT reaction (1.33 µL) were used in a real-time PCR reaction, which also included 10 µL of the TaqMan Universal Master Mix II, and 1 µL TaqMan miRNA assay containing the sequence-specific primers of either the target miRNA (let-7a: UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU, miR-34a: UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU, and miR-23a: AUCACAUUGCCAGGGAAUUUCC) or the U6SnoRNA (CACGAATTTGCGTGTCATCCTT) used as an endogenous control for normalization. Real-time PCR was carried out by means of a Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Incubations were performed in a 96-well plate at 95 °C for 10 min for enzyme activation, followed by 40 cycles of PCR: Denaturation (95 °C for 15 s), and annealing/extending (60 °C for 2 min). Data analysis was performed with the software provided by the manufacturer (Step One Plus).

In situ hybridization: The in situ detection of let-7a, miR-34a and miR-23a was performed on paraffin embedded sections from normal and methyl donor deficient brain tissues by locked nucleic acid (LNA)-oligo in situ hybridization, as previously described by Kloosterman et al. [52]. Briefly, the slides were deparaffinized in xylene, rehydrated in decreasing concentrations of ethanol, and treated with proteinase-k for nucleic acid release. Slides were then re-dehydrated and prehybridized in hybridization buffer with 0.5 nm specific probe (LNA-modified and digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotide, Exiqon, Copenhagen, Denmark) complementary to let-7a (AACTATACAACCTACTACCTCA), miR-34a (ACAACCAGCTAAGACACTGCCA or miR-23a (GGAAATCCCTGGCAATGTGAT). Sections were then washed in saline sodium citrate buffer, followed by blocking in Denhardt solution 1× in a humidified chamber. Slides were then incubated with anti-DIG antibody (1/500, Roche Applied Science, Basel, Switzerland) for 1 h at room temperature, washed in PBS-T and then immunoreactivity was assessed in the presence of a matching secondary antibody conjugated to AlexaFluor (1/2000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 1 h at room temperature. Positive controls (snoRNA U6B, Exiqon: CACGAATTTGCGTGTCATCCTT) were used for each hybridization experiment.

4.6. Behavioral Evaluation

The static righting reflex was studied as described by Blaise et al. [47]. The time needed by the pup to right itself in a supine position was recorded at postnatal days 5 and 7.

The negative geotaxis was tested from postnatal day 7 to postnatal day 11. 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 s.

The learning performances were evaluated using a water maze. The apparatus consists of a square pool filled with water (5 cm maintained at 25 °C). Grey plastic walls 30 cm high were used to delimit 25 square zones equal in size (15 × 15 cm). Open doors in walls allowed communications between zones designing an ideal route from a starting zone to an exit one with additional lateral error-zones. Each pup was allowed to run the maze twice a day during 4 consecutive days from day 21 to day 24 (sessions S1 to S4 with a cut-off time of 2 min). Parameters recorded were the time used to run the maze from the starting zone to the exit one, named “escape latency” (if no exit was recorded, the cut-off time was attributed); the number of errors committed (one or more entries in zones outside of the ideal route). Two days before session one, each pup was allowed to know the apparatus in two habituation sessions (not recorded).

4.7. Statistical Analysis

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

5. Conclusions

Whereas folate supplementation during the last third of gestation in rats was demonstrated to alleviate methyl donor deficiency-related birth defects, our present study suggests that its continuation after birth may help to reduce growth retardation and to ameliorate neurological symptoms commonly associated with developmental deficiencies in folate and vitamin B12.

Author Contributions: C.B.-P. and J.-L.D. conceived and designed the study. J.-L.G. provided expert advice. A.G., L.S.-C., G.P., D.H., and R.U. performed the experiments and analyzed the data. J.-L.D. and C.B.-P. wrote the paper.

Funding: This work was funded by the French National Institute for Health and Medical Research (Inserm), University of Lorraine, and by grants from European funds FEDER, and the “Région Lorraine”, France.

Acknowledgments: A.G. and L.S.-C. are recipients of a fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Craciunescu, C.N.; Brown, E.C.; Mar, M.H.; Albright, C.D.; Nadeau, M.R.; Zeisel, S.H. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 162–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aranda, P.; Agirre, X.; Ballestar, E.; Andreu, E.J.; Román-Gómez, J.; Prieto, I.; Martín-Subero, J.I.; Cigudosa, J.C.; Siebert, R.; Esteller, M.; et al. Epigenetic signatures associated with different levels of differentiation potential in human stem cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cantone, I.; Fisher, A.G. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 282–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Guéant, J.L.; Namour, F.; Guéant-Rodriguez, R.M.; Daval, J.L. Folate and fetal programming: A play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 279–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Guéant, J.L.; Caillerez-Fofou, M.; Battaglia-Hsu, S.; Alberto, J.M.; Freund, J.N.; Dulluc, I.; Adjalla, C.; Maury, F.; Merle, C.; Nicolas, J.P.; et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* **2013**, *95*, 1033–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hoffman, D.R.; Cornatzer, W.E.; Duerre, J.A. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can. J. Biochem.* **1979**, *57*, 56–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mattson, M.P.; Shea, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 137–146. [[CrossRef](#)]
8. Ghemrawi, R.; Pooya, S.; Lorentz, S.; Gauchotte, G.; Arnold, C.; Guéant, J.L.; Battaglia-Hsu, S.F. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Akkiche, N.; Bossenmeyer-Pouré, C.; Kerek, R.; Martin, N.; Pouré, G.; Koziel, V.; Helle, D.; Alberto, J.M.; Ortiou, S.; Camadro, J.M.; et al. Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J.* **2012**, *26*, 3980–3992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Jeong, S.O.; Son, Y.; Lee, J.H.; Choi, S.W.; Kim, S.H.; Cheong, Y.K.; Chung, H.T.; Pae, H.O. Both nitric oxide and nitrite prevent homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and subsequent apoptosis via cGMP-dependent pathway in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *493*, 164–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kirke, P.N.; Molloy, A.M.; Daly, L.E.; Burke, H.; Weir, D.G.; Scott, J.M. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q. J. Med.* **1993**, *86*, 703–708. [[PubMed](#)]
12. Molloy, A.M.; Kirke, P.N.; Brody, L.C.; Scott, J.M.; Mills, J.L. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr. Bull.* **2008**, *29*, S101–S111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Black, M.M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr. Bull.* **2008**, *29*, S126–S131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bailey, L.B. Folate and vitamin B12 recommended intakes and status in the United States. *Nutr. Rev.* **2004**, *62*, S14–S20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. De-Regil, L.M.; Fernández-Gaxiola, A.C.; Dowswell, T.; Peña-Rosas, J.P. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2010**, *10*, CD007950.
16. Czeizel, A.E. Periconceptional folic acid-containing multivitamin supplementation for the prevention of neural tube defects and cardiovascular malformations. *Ann. Nutr. Metab.* **2011**, *59*, 38–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Czeizel, A.E.; Dudás, I.; Paput, L.; Bánhidy, F. Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins? *Ann. Nutr. Metab.* **2011**, *58*, 263–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Fekete, K.; Berti, C.; Trovato, M.; Lohner, S.; Dullemeijer, C.; Souverein, O.W.; Cetin, I.; Decsi, T. Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: A systematic review and meta-analysis on birth weight, placental weight and length of gestation. *Nutr. J.* **2012**, *11*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Breeze, A.C.; Lees, C.C. Prediction and perinatal outcomes of fetal growth restriction. *Semin. Fetal Neonatal Med.* **2007**, *12*, 383–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. DiPietro, J.A.; Kivlighan, K.T.; Costigan, K.A.; Rubin, S.E.; Shiffler, D.E.; Henderson, J.L.; Pillion, J.P. Prenatal antecedents of newborn neurological maturation. *Child Dev.* **2010**, *81*, 115–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Raznahan, A.; Greenstein, D.; Lee, N.R.; Clasen, L.S.; Giedd, J.N. Prenatal growth in humans and postnatal brain maturation into late adolescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11366–11371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kerek, R.; Geoffroy, A.; Bison, A.; Martin, N.; Akkiche, N.; Pouré, G.; Helle, D.; Guéant, J.L.; Bossenmeyer-Pouré, C.; Daval, J.L. Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Geoffroy, A.; Kerek, R.; Pouré, G.; Helle, D.; Guéant, J.L.; Daval, J.L.; Bossenmeyer-Pouré, C. Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 5017–5033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Desai, A.; Sequeira, J.M.; Quadros, E.V. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* **2016**, *126*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kapsimali, M.; Kloosterman, W.P.; de Bruijn, E.; Rosa, F.; Plasterk, R.H.; Wilson, S.W. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fineberg, S.K.; Kosik, K.S.; Davidson, B.L. MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron* **2009**, *64*, 303–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yi, R.; Fuchs, E. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 1775–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Petri, R.; Malmevik, J.; Fasching, L.; Åkerblom, M.; Jakobsson, J. miRNAs in brain development. *Exp. Cell Res.* **2014**, *321*, 84–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Büssing, I.; Slack, F.J.; Grosshans, H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 400–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Maller Schulman, B.R.; Liang, X.; Stahlhut, C.; DelConte, C.; Stefani, G.; Slack, F.J. The let-7 microRNA target gene, *Mlin41/Trim71* is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 3935–3942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Chen, F.; Hu, S.J. Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: A review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2012**, *26*, 79–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lathia, J.D.; Mattson, M.P.; Cheng, A. Notch: From neural development to neurological disorders. *J. Neurochem.* **2008**, *107*, 1471–1481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Smirnova, L.; Gräfe, A.; Seiler, A.; Schumacher, S.; Nitsch, R.; Wulczyn, F.G. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 1469–1477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Farrell, B.C.; Power, E.M.; Mc Dermott, K.W. Developmentally regulated expression of *Sox9* and microRNAs 124, 128 and 23 in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2011**, *29*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kawasaki, H.; Taira, K. *Hes1* is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells. *Nature* **2003**, *423*, 838–842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chen, Q.; Xu, J.; Li, L.; Li, H.; Mao, S.; Zhang, F.; Zen, K.; Zhang, C.Y.; Zhang, Q. MicroRNA-23a/b and microRNA-27a/b suppress Apaf-1 protein and alleviate hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liu, L.; Cheng, Z.; Yang, J. miR-23 regulates cell proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells in coronary heart disease. *Pathol. Res. Pract.* **2018**, *214*, 1873–1878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lin, S.T.; Fu, Y.H. miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis. Models Mech.* **2009**, *2*, 178–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lin, S.T.; Huang, Y.; Zhang, L.; Heng, M.Y.; Ptáček, L.J.; Fu, Y.H. MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 17468–17473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hassan, M.Q.; Gordon, J.A.; Beloti, M.M.; Croce, C.M.; van Wijnen, A.J.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; Lian, J.B. A network connecting *Runx2*, *SATB2*, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19879–19884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Sechi, G.; Sechi, E.; Fois, C.; Kumar, N. Advances in clinical determinants and neurological manifestations of B vitamin deficiency in adults. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 281–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dekkers, M.P.; Nikolettou, V.; Barde, Y.A. Cell biology in neuroscience: Death of developing neurons: New insights and implications for connectivity. *J. Cell Biol.* **2013**, *203*, 385–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Chaudhury, S.; Sharma, V.; Kumar, V.; Nag, T.C.; Wadhwa, S. Activity-dependent synaptic plasticity modulates the critical phase of brain development. *Brain Dev.* **2016**, *38*, 355–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jiang, X.; Nardelli, J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol. Dis.* **2016**, *92*, 3–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Breimer, L.H.; Nilsson, T.K. Has folate a role in the developing nervous system after birth and not just during embryogenesis and gestation? *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2012**, *72*, 185–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Hochberg, Z.; Feil, R.; Constancia, M.; Fraga, M.; Junien, C.; Carel, J.C.; Boileau, P.; Le Bouc, Y.; Deal, C.L.; Lillycrop, K.; et al. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr. Rev.* **2011**, *32*, 159–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Blaise, S.A.; Nédélec, E.; Schroeder, H.; Alberto, J.M.; Bossenmeyer-Pourié, C.; Guéant, J.L.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Daval, J.L.; Blaise, S.; Guéant, J.L. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, E1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ducros, V.; Belva-Besnet, H.; Casetta, B.; Favier, A. A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2006**, *44*, 987–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Chery, C.; Barbe, F.; Lequere, C.; Abdelmouttaleb, I.; Gerard, P.; Barbarino, P.; Boutroy, J.L.; Gueant, J.L. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2002**, *40*, 1105–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Wallin, J.; Wilting, J.; Koseki, H.; Fritsch, R.; Christ, B.; Balling, R. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development* **1994**, *120*, 1109–1121. [[PubMed](#)]
52. Kloosterman, W.P.; Wienholds, E.; de Bruijn, E.; Kauppinen, S.; Plasterk, R.H. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat. Methods* **2006**, *3*, 27–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article 2: Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus



Article

Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus

Lynda Saber Cherif, Grégory Pourié, Andréa Geoffroy, Amélia Julien, Déborah Helle, Aurélie Robert, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié* and Jean-Luc Daval*

Université de Lorraine, Inserm U1256, NGERE, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France; lynda.saber-cherif@univ-lorraine.fr (L.S.C.); gregory.pourie@univ-lorraine.fr (G.P.); g.andrea@hotmail.fr (A.G.); amelia.julien@univ-lorraine.fr (A.J.); deborah.helle@univ-lorraine.fr (D.H.), aurelie.robert@univ-lorraine.fr (A.R.); remy.umoret@univ-lorraine.fr (R.U.); jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr (J.L.G.); carine.pourie@univ-lorraine.fr (C.B.P.); jean-luc.daval@inserm.fr (J.L.D.)

* : These authors contributed equally to the work

* Correspondence: Jean-Luc Daval, E-mail: jean-luc.daval@inserm.fr, Tel : (33) 3 72 74 61 32; Carine Bossenmeyer-Pourié, E-mail: carine.pourie@univ-lorraine.fr, Tel.: (33) 3 72 74 61 39

Abstract: The micronutrients vitamins B9 and B12 act as methyl donors in the one-carbon metabolism involved in transmethylation reactions which critically influence epigenetic mechanisms and gene expression. Both vitamins are essential for proper development, and their deficiency during pregnancy has been associated with a wide range of disorders, including persisting growth retardation. Energy homeostasis and feeding are centrally regulated by the hypothalamus which integrates peripheral signals and acts through several orexigenic and anorexigenic mediators. We studied this regulating system in a rat model of methyl donor deficiency during gestation and lactation. At weaning, a predominance of the anorexigenic pathway was observed in deficient pups, with increased plasma peptide YY, increased hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) mRNA, in line with abnormal leptin, ghrelin, and insulin secretion and/or signaling during critical periods of fetal and/or postnatal development of the hypothalamus. These results suggest that early methyl donor deficiency can affect the development and function of energy balance circuits, resulting in growth and weight deficits. Maternal administration of folic acid (3 mg/kg/day) during the perinatal period tended to rectify peripheral metabolic signaling and central neuropeptide and receptor expression, leading to reduced growth retardation.

Keywords: development; growth; hypothalamus; energy homeostasis; orexigenic and anorexigenic pathways; gestational deficiency; folate; vitamin B12; folate supplementation

1. Introduction

The nutritional methyl donors folate (vitamin B9) and vitamin B12 are cofactors in the one-carbon metabolism that plays a critical role in transmethylation reactions [1,2], and are key regulators of the concentration of homocysteine which, if present in excess, can exert adverse effects such as DNA breakage, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, protein homocysteinylolation, and apoptosis [3-6]. Both vitamins are essential for normal development, and their insufficiency constitutes a risk factor for various developmental disorders, particularly neural tube defects [7-9]. By using a validated rat model of methyl donor deficiency during the gestational and lactating

periods, previous studies in our laboratory have shown that folate and vitamin B12 deprivation was associated in the offspring with persisting global growth retardation, brain atrophy, and morphological and functional defects [10-12]. Whereas the stomach size in deficient pups was found to be much smaller than in control animals at the same age, concomitantly with severe gastritis, a dysfunction of the ghrelin system was also demonstrated [13]. This gastrointestinal hormone plays a significant role in growth through its dual role as a growth hormone-releasing factor and as an appetite stimulating peptide through hypothalamic actions [14]. The hypothalamus is composed of several nuclei that produce neuropeptides involved in key physiological functions. Feeding behavior is finely tuned by the interactions of circulating hormones with peripheral peptidergic and aminergic projections that arise from the brainstem and midbrain to the hypothalamus and ghrelin could inhibit hypothalamic serotonin release [15,16]. The arcuate nucleus plays a role in food intake and energy homeostasis regulation. It integrates peripheral signals such as circulating hormones (ghrelin, leptin, insulin, peptide YY...) and nutrients, and contains two types of neurons. One type co-expresses neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP) that stimulate food intake, while the other set of neurons co-expresses proopiomelanocortin (POMC) and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), which reduce food intake. Both populations project to the paraventricular nucleus and other areas important in the regulation of appetite [17-20]. Leptin and insulin act on their respective receptors, Ob-Rb and insulin receptor, to reduce the expression and release of hypothalamic orexigenic peptides and stimulate anorexigenic peptides. Recently, we showed in our experimental model that methyl donor deficiency disrupts brain Stat3 signaling pathway [11], which is required for hypothalamic regulation of energy balance by leptin through its receptor [21].

Given our previous observations and according to the concept stating that an adverse perinatal environment programmes the development of several tissues, with long-term consequences on physiology and health [22,23], we hypothesized that exposure to methyl donor deficiency during the fetal period and in early life may alter the normal development and function of the hypothalamus, resulting in energy balance dysfunction and reduced growth. We therefore studied the hypothalamic expression profiles of neuropeptides and some related receptors in our rat model of methyl donor deficiency as well as in two hypothalamic cell lines deprived in B9: one mouse cell line (mHypoE46) expressing NPY, AgRP, leptin receptor, insulin receptor and insulin growth factor receptor 1 (Igf1R), and one rat cell line (rHypo-E11) expressing ghrelin, neuropeptide Y receptor 1 (NPY1R), leptin receptor, insulin receptor and Igf1R. The mouse cell line displays therefore the characteristics of NPY/AgRP neuronal cells of the arcuate nucleus, whereas the rat cell line mimics the ghrelin-containing regulating cells [24].

In addition, we investigated whether a perinatal supplementation with folic acid is able to reduce growth retardation in deprived rats and its influence on neuropeptides expression.

Taken together, our data showed that *in utero* and early postnatal deficiency in folate and vitamin B12 was associated with growth retardation, in line with misexpression of hypothalamic neuropeptides and related receptors regulating energy homeostasis, suggesting impaired development of hypothalamic networks. Importantly, perinatal and postnatal supplementation with folic acid helped restore mRNA levels and could be an effective strategy to reduce deficiency-related defects.

2. Results

2.1. Effects of methyl donor deficiency on the expression of neuropeptides and receptors in mouse and rat embryonic hypothalamic cell lines

The profiles of expression changes in response to B9 deprivation reflect the specificities of mouse and rat cell lines (Figures 1 and 2).

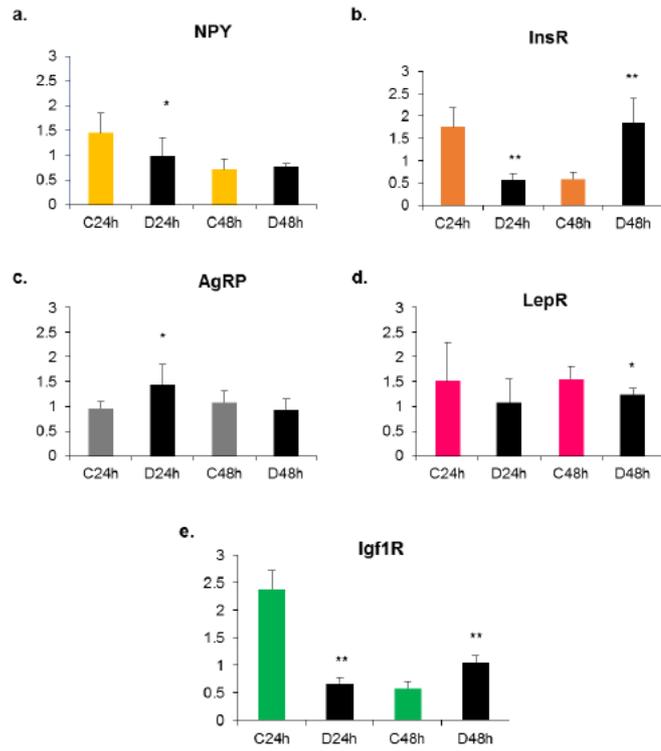


Figure 1. Effects of methyl donor deficiency on mRNA expression of neuropeptides and receptors in the mouse cell line (mHypoE46) at 24h and 48h of growth. Data are means \pm SD from 6 \leq n \leq 8 samples and are reported in arbitrary units. Statistically significant differences between control (C) and B9 deficient (D) cells: *P<0.05 and **P<0.01. (a) Neuropeptide Y (NPY), (b) Insulin receptor (InsR), (c) Agouti-related protein (AgRP), (d) Leptin receptor (LepR), (e) Insulin growth factor receptor 1 (Igf1R).

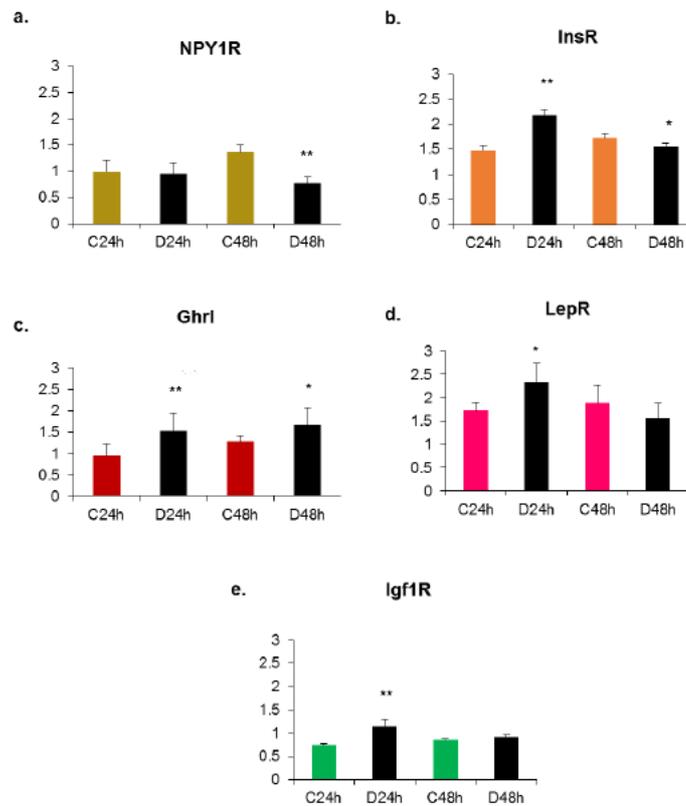


Figure 2. Effects of methyl donor deficiency on mRNA expression of neuropeptides and receptors in the rat cell line (rHypoE11) at 24h and 48h of growth. Data are means \pm SD from 6-8 samples and are reported in arbitrary units. Statistically significant differences between control (C) and B9 deficient (D) cells: *P<0.05 and **P<0.01. (a) Neuropeptide Y receptor 1 (NPY1R), (b) Insulin receptor (InsR), (c) Ghrelin (Ghrl), (d) Leptin receptor (LepR), (e) Insulin growth factor receptor 1 (Igf1R).

RT-qPCR experiments led to two striking observations: the expression patterns of neuropeptides and receptors differed between the two cell lines on the one hand, and on the other, they varied as a function of time in a given cell line. We observed that the rat cell line is a hypothalamic cell line secreting ghrelin and expressing receptors for NPY, insulin and leptin whereas the mouse cell line is a NPY/AgrP-secreting cell line. After 24h of B9 deficiency, the expression of the AgrP gene was increased in the mouse cell line while the expression of NPY and of the various receptors was decreased. In the rat cell line, a 24h-B9 deficiency induced an overexpression of the genes encoding ghrelin and the different receptors. These results reflect the direct effect of B9 deficiency on hypothalamic neuropeptides and receptors gene expression, and show that receptors expression varied depending on the neuropeptide secretion by the cells.

2.2. Plasma concentrations of folate, vitamin B12 and homocysteine, and growth status of weaned rat pups

As previously documented, nutritional methyl donor deficiency starting 1 month prior to mating affected female ability to conceive. Globally, 45.7% gave birth to pups (vs 84% in controls). The number of live fetuses per litter was consistently reduced (6.7 vs 11.2) [25]. In addition to spontaneous abortions, maternal pup-killing behavior and cannibalism was more frequently

observed in deficient dams, as previously documented for thiamine deficiency [26]. Maternal supplementation with folic acid by itself had no significant effects on the same parameters.

In response to maternal deficiency during gestation and lactation, plasma levels of folate and vitamin B12 were dramatically reduced in the rat progeny at weaning (postnatal day 21). In parallel, homocysteinemia was significantly augmented ($P<0.01$). Table 1 shows that folic acid supplementation restored folate concentration without affecting vitamin B12 status, and significantly reduced hyperhomocysteinemia in deficient pups.

Table 1. Effects of the maternal dietary regimen on plasma concentrations of folate, vitamin B12, homocysteine, body weight and brain weight in 21-day-old rat pups.

	Plasma folate (nmol/L)	Plasma vitamin B12 (pmol/L)	Plasma homocysteine (μ mol/L)	Body weight (g)	Brain weight (g)
21d Control-vehicle	53.1 \pm 7.5	876.6 \pm 94.1	6.7 \pm 1.8	48.6 \pm 3.2	1.43 \pm 0.20
21d MDD-vehicle	23.8 \pm 7.6**	249.4 \pm 211.6**	23.3 \pm 7.1**	22.1 \pm 2.0**	1.01 \pm 0.29**
21d Control + B9	103.2 \pm 42.7**	899.3 \pm 134.6	4.2 \pm 2.4	48.4 \pm 3.7	1.51 \pm 0.11
21d MDD + B9	94.1 \pm 46.4**/°°	249.7 \pm 102.2**	4.5 \pm 3.7**/°°	27.2 \pm 3.1**/°°	1.32 \pm 0.36**/°°

Data are means \pm SD and were obtained from 15 \leq n \leq 40 individuals. Statistically significant differences: **P< 0.01: with respective control; °°P<0.01: between MDD and MDD + B9 (MDD = methyl donor deficiency).

In rat pups born to deficient dams, body weight was decreased by 55% as compared to controls at 21 days of age, whereas brain weight was concomitantly reduced by 30%. Growth was noticeably ameliorated by maternal supplementation with folic acid (Table 1).

2.3. Plasma concentrations of peripheral hormones

Figure 3 shows plasma levels of peripheral hormones playing a role in appetite control, i.e. ghrelin, leptin and peptide YY (peptide tyrosine tyrosine). The concentration of the anorexigenic peptide YY was dramatically increased in the plasma of deficient pups (Figure 6a), suggesting satiety and decreased food intake. By contrast, plasma levels of leptin and ghrelin were decreased, reflecting a dysregulation of the hormone tandem. In all cases, maternal folate supplementation tended to remediate the situation.

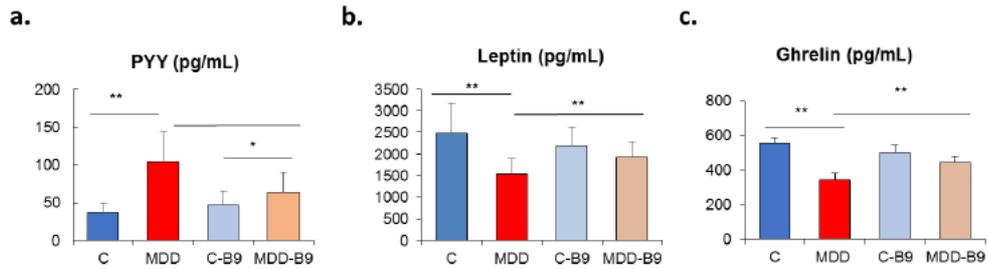


Figure 3. Effects of methyl donor deficiency on plasma concentrations of peripheral hormones rat pups at 21 days of age, and effects of folate supplementation. (a) Peptide YY (PYY); (b) Leptin; (c) Ghrelin. Data are means \pm SD from 6 individuals per group. Statistically significant differences between the different animal groups: *P<0.05 and **P<0.01.

2.4. Effects of methyl donor deficiency on the expression of neuropeptides and receptors in the hypothalamus of rat pups - Consequences of maternal folate supplementation

As shown in Figure 4, the expression of all genes studied was enhanced following exposure to methyl donor deficiency, except for insulin growth factor receptor 1 (Igf1R), which remained unaffected (Figure 4f).

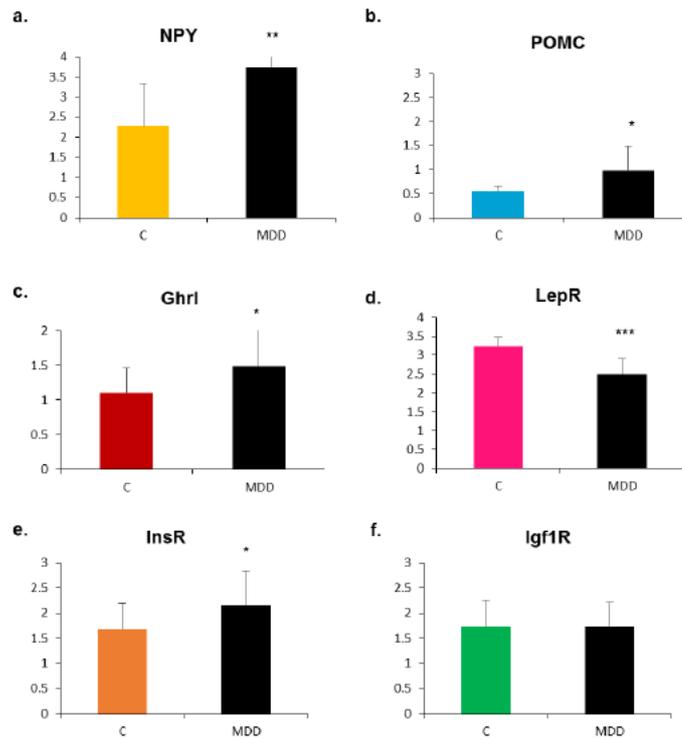


Figure 4. Effects of methyl donor deficiency on mRNA expression of neuropeptides and receptors in the hypothalamus of rat pups at 21 days of age. Data are means \pm SD from 6-8 individuals and are reported in arbitrary units. Statistically significant differences between control (C) and deficient (MDD) rats: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. (a) Neuropeptide Y (NPY), (b) Proopiomelanocortin (POMC), (c) Ghrelin (Ghrl), (d) Leptin receptor (LepR), (e) Insulin receptor (InsR), (f) Insulin growth factor receptor 1 (Igf1R).

Interestingly, maternal supplementation with folic acid restored mRNA expression levels which were affected by methyl donor deficiency in the hypothalamus of rat pups (Figure 5), except for the ghrelin gene that remained significantly more elevated than control (Figure 5c).

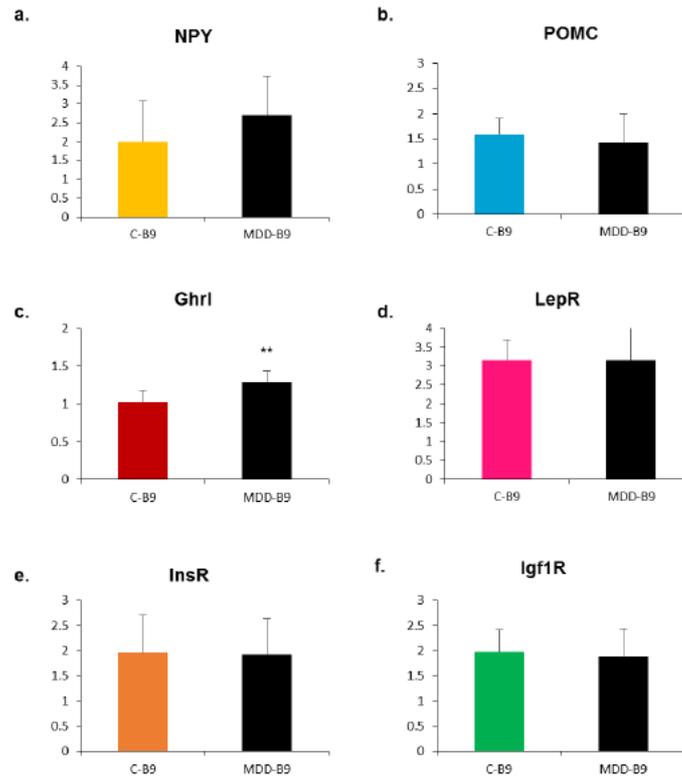


Figure 5. Effects of folate supplementation on mRNA expression of neuropeptides and receptors in the hypothalamus of rat pups at 21 days of age. Data are means \pm SD from 6-8 individuals and are reported in arbitrary units. Statistically significant differences between control (C-B9) and deficient (MDD-B9) rats: ** $P < 0.01$. (a) Neuropeptide Y (NPY), (b) Proopiomelanocortin (POMC), (c) Ghrelin (Ghrl), (d) Leptin receptor (LepR), (e) Insulin receptor (InsR), (f) Insulin growth factor receptor 1 (Igf1R).

Figure 6 illustrates the expression of NPY and ghrelin in the arcuate nucleus in the various experimental conditions. The punctuate labeling of NPY expression reflects its high localization in axonal projections. The observation contrasts with methyl donor deficiency-associated NPY mRNA levels, suggesting a post-transcriptional regulation.

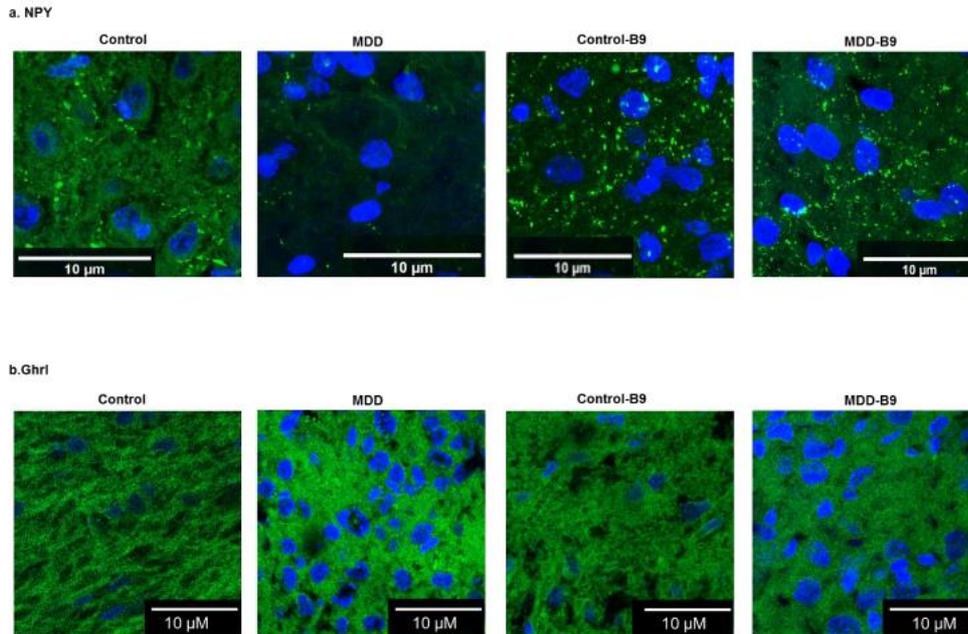


Figure 6. Effects of methyl donor deficiency and folate supplementation on the immunohistochemical expression of neuropeptide Y and ghrelin in the arcuate nucleus of the hypothalamus of control and deficient (MDD) rat pups at 21 days. (a) Neuropeptide Y (NPY); (b) Ghrelin (Ghrl). Cell nuclei are counterstained by DAPI.

3. Discussion

In our animal model, maternal exposure to methyl donor deficiency is associated with a global growth retardation and brain atrophy in the offspring. In a previous study using the same experimental conditions, we mentioned that femur length, reflecting pre- and postnatal growth, was reduced by 21% at 21 days of age [27]. While normalizing the one-carbon metabolism, the return to a normal diet after weaning remained associated with growth and weight deficits [10,13]. Furthermore, we previously showed that the perinatal deficiency in methyl donors led to an increase of gastric ghrelin mRNA expression but also to a defect of the protein secretion, inducing a reduction of plasma ghrelin concentration in the deficient pups [13]. The central systems regulating energy homeostasis contain a regionalised and interconnected neural network, and most of the neuronal projections and synaptic connections between the hypothalamic nuclei develop within the first weeks after birth [28]. During this period, the integration of peripheral metabolic signals (i.e., ghrelin, leptin, insulin, peptide YY...), especially to the arcuate nucleus, is essential for the harmonious and functional organization of the hypothalamus [29]. Moreover, the development of axonal projections from the arcuate nucleus to the paraventricular nucleus of the hypothalamus is highly sensitive to changes in the nutritional environment [18,30,31]. In the rat, plasma leptin is detectable at embryonic day 19 and plasma ghrelin at embryonic day 17 [32-34]. Thus, if during the perinatal period the integration of these signals to the arcuate neurons is disrupted, it will disturb the production of the neuropeptides, respectively POMC (which will produce by cleavage the anorexigenic α -Msh peptide), and the orexigenic neuropeptides NPY and Agrp [35]. This signaling defect will permanently affect the neuronal projections from the arcuate nucleus to the various functional hypothalamic areas possessing receptors for these neuropeptides (Y1R, MC4R, etc.), as observed in leptin-deficient mice (Ob/Ob) [36,37]. The capacity of nutritional status to alter the

developing hypothalamus has been demonstrated in rodent models of maternal obesity or of protein starvation [23]. For example, maternal high-fat feeding increases hypothalamic cell proliferation in rat embryos, resulting in higher numbers of neurons containing orexigenic neuropeptides in the paraventricular nucleus and the lateral hypothalamic area [30], whereas gestational low-protein diet produces hypoleptinemia, increased hypothalamic gene expression of the orexigenic neuropeptides NPY and AgRP, and decreased expression of the anorexigenic neuropeptides POMC and CART [35]. These results suggest that the early nutritional environment can affect the development of energy balance circuits, and these effects appear to be mediated, to some extent, by abnormal leptin, ghrelin, and insulin secretion and/or signaling during critical periods of fetal and/or postnatal development.

The present study showed that methyl donor deficiency leads to an increase of ghrelin mRNA and protein expression in the hypothalamus, as previously shown in the stomach [13]. However, since the gastric gland is the major site of ghrelin production, plasma ghrelin is dramatically reduced due to altered secretion of the protein. We previously showed that methyl donor deficiency is accompanied by a 50% reduction of global DNA methylation in 20-day-old rat embryos [25]. The observed increased mRNA expression of ghrelin can be due to the demethylation condition but, to our knowledge, there is no available data demonstrating that the promoter of the ghrelin gene is regulated by methylation. We report for the first time that perinatal methyl donor deficiency also affects other peripheral metabolic signals, leading to increased plasma concentration of the anorexigenic peptide YY and decreased plasma concentration of leptin. In our model, plasma insulin was also reduced but presented a large variability between pups (data not shown).

The induction of vitamin B9 deficiency in rat and mouse embryonic cell lines, respectively corresponding to hypothalamic ghrelin cells and NPY cells, allowed us to depict the specific effect of folate deficit on gene expression without interference or regulation by other neurons or peripheral signals. The observed folate-related effects would mainly reflect epigenetic regulations such as promoter or histone methylation or post-transcriptional regulation by microRNA, as previously documented by our laboratory [11,25,38]. In these cell models, we observed specific effects of folate deficiency on mRNA expression depending on the neuropeptide secreted by the cells. Specifically, folate deficiency led to decreased NPY expression and to overexpression of *Agrp* mRNA, along with reduced expression of the leptin and insulin receptors, whereas ghrelin overexpression was associated with reduced expression of these receptors.

In vivo data in 21-day-old deficient pups differed from those obtained *in vitro* due to the presence of cell-cell regulations and peripheral metabolic signaling. Surprisingly in the hypothalamus of deficient pups, both orexigenic (ghrelin/NPY mRNA) and anorexigenic pathways (POMC mRNA) appeared to be stimulated. However, immunohistochemical analyses of the arcuate nucleus revealed that NPY mRNA in excess was not translated, since the protein labelling was lower than control. This could be the result of specific microRNA regulation as documented in the literature [39,40]. Recently, Yang and colleagues showed that an excess intake (10-fold) of folic acid during gestation is linked to increased food intake and obesity in male rat offspring post-weaning [41]. In their model, high gestational folic acid levels increased the number of mature NPY-positive neurons in the hypothalamus of the male offspring, which can contribute to increased food intake and higher body weight later in life. Accordingly, we observed the contrary in our model of gestational B9/B12 restriction, since the results showed a predominance of the anorexigenic pathway, with increased plasma peptide YY, increased hypothalamic POMC, and, as previously shown [10,13], definitive growth and weight deficits in spite of the return to a normal diet at weaning.

The hypothalamus develops early during gestation and continues during the postnatal period [42]. These developmental windows represent important periods of vulnerability during which environmental alterations may lead to abnormal hypothalamic development. We recently reported that an adapted maternal folate supplementation from the beginning of the third week of gestation till weaning alleviates methyl donor deficiency-associated birth defects in the rat progeny [25,27]. This perinatal period corresponds to a peak of brain maturation with the occurrence of numerous neuronal adaptive changes, like synaptogenesis, circuit refinement and plasticity. In the present study, we observed that maternal administration of folic acid tended to rectify peripheral metabolic

signaling and central neuropeptide and receptor expression, leading to reduced growth retardation, weight deficit and brain atrophy. This suggests that perinatal folate supplementation may beneficially influence the developmental plasticity and epigenetic programming of the hypothalamic circuits.

4. Materials and Methods

4.1. Cell cultures

mHypoE46 (mouse) et rHypoE11 (rat) neuronal cell lines purchased from American Type Culture Collection (ATCC) were conditionally immortalized by transfer of a temperature-sensitive simian virus 40 large tumor (SV40 T) antigen to primary hypothalamic neuronal cell cultures obtained from fetal mice on embryonic days E15, E17 and E18, and from E18 fetal rats, respectively [43]. Cells were cultivated in 1x Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, D5796, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) with 10% fetal bovine serum (CVFVSF0001, lot: S52751-2262, Eurobio, Courtaboeuf, France), 1% penicillin/streptomycin (P4333, Sigma-Aldrich) and maintained at 37°C with 5% CO₂. For homogeneity, the same lot of serum was used throughout all experiments. The cells grew to form a monolayer culture, attached to the culture plate and were split when they reached 70-90% confluence, with a plate ratio of 1:5. Because standard DMEM does not contain vitamin B12, methyl donor deficiency was induced by using a poor medium (DMEM D2429, Sigma-Aldrich) lacking B9 (folic acid), with addition of 2mM glutamine (G7513, Sigma-Aldrich), 3.7% sodium bicarbonate (S8761, Sigma-Aldrich), 0.35% glucose (G8769, Sigma-Aldrich), 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Cells were kept in B9-free conditions for 24h or 48h before subsequent analyses

4.2. Animals and tissue collection

Animal experiments were conducted by using a validated rat model of early methyl donor deficiency, as previously described [10,44]. They were performed according to the European guidelines (2010-63-UE), and were approved by the local University Research Ethics Board (CELMEA, approval APAFIS#5509-2016053112249550, March 31 2017). Wistar rats (Charles River, l'Arbresle, France) were maintained in an accredited facility according to a 12-hour light/dark cycle with access to food and water ad libitum. One month prior to mating, females (n = 5 per experimental group matched to 1 male for 2 females for mating) were fed either a standard diet (Maintenance diet M20, Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France) or a diet deficient in folate and vitamin B12 and lowered in choline (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). Methionine content (~0.4%) was similar in both diets. For maternal supplementation, folic acid (the synthetic form of folate, Sigma-Aldrich) diluted in condensed milk was given per os at the dose of 3 mg/kg per day in a final volume of 1 mL to dams from embryonic day 13 to postnatal day 21 (weaning). Matched control dams received the same volume of vehicle (i.e., 1 mL condensed milk) over the same period, as previously described [25] (refer to supplementary material for the experimental design). Whatever the maternal diet, all pups of both sexes (15 ≤ n ≤ 40 issued from at least 3 different litters per experimental group) were euthanized between 8:00 and 10:00 a.m. by excess isoflurane at 21 days of age and blood was withdrawn for subsequent plasma measurements. Individuals were weighed and evaluated morphologically. The brains were rapidly collected, weighed, and the hypothalamus was carefully dissected before freezing in liquid nitrogen and storage at -80°C. For immunohistochemistry, brains were fixed with 4%-paraformaldehyde 4% (24-48h) at 4°C, dehydrated and included in paraffin. Microtome-generated 12-µm Sagittal brain sections (12 µm) were generated at the level of hypothalamus by means of a microtome. They were then mounted onto glass slides and stored at ambient temperature.

4.3. Plasma assays

Plasma concentrations of vitamins B9 and B12 were determined using a radioisotope dilution assay (simulTRACSNB; ICN Pharmaceuticals, Versailles, France) as previously reported [45]. Concentrations of homocysteine were measured by high-performance liquid chromatography (Waters, St. Quentin, France) coupled with mass spectrometry (Api 4000 Qtrap; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) [46].

Plasma levels of total ghrelin was measured in duplicate after appropriate dilution by specific radioimmunoassays using commercial kits (RK-031-31; Phoenix Europe GmbH, Karlsruhe, Germany), as previously described [13]. Leptin, peptide YY and insulin were measured using the MILLIPLEX Rat Metabolic Hormone Panel (RMHMAG-84K, Millipore, Fontenay-sous-Bois, France).

4.4. RNA extraction and quantitative RT-PCR

RNA was purified from cell cultures by using a commercial kit (NucleoSpin® RNA Plus, Macherey Nagel, Düren, Germany). In the case of rat hypothalamus tissues, RNA extraction was performed with TRIzol® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA were determined at 260/280 nm by using a nanodrop spectrophotometer Multiskan GO (Thermo Scientific, Fisher, Illkirch, France).

RNA (300 ng) was then subjected to a two-step RT-qPCR using the PrimeScript™ RT Master Mix and SYBR® Premix Ex Taq® (Takara, Ozyme, Saint-Cyr-l'Ecole, France) following the manufacturer's instructions. Primers are detailed in Table 2 and were purchased from Eurogentec, (Liège, Belgium). The products of amplification were analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm amplicon size and primer specificity (a single band at the expected size). Cycle threshold (Ct) was determined from each sample and real-time PCR amplification efficiencies were expressed by calculating the ratio of crossing points of amplification curves. The expression of genes of interest was normalized to those of GAPDH/RPS29 for the rat species and Pol2/RPS29 for the mouse species using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Table 2. Sequences of primers used for quantitative PCR.

Gene	Forward	Reverse	Species
Neuropeptide Y	AGATCCAGCCCTGAGACACT	TTCAAGCCTTGTTCTGGGGG	Rat
Neuropeptide Y receptor 1	TGC-TAC-TTC-AAG-ATA-TAC-GTT-CGC	ACG-ATG-GAG-AGC-AGC-ATG-AC	Rat
Insulin receptor	GGA-CCA-GGC-ATC-CTG-TGA-AA	ATC-CTG-CCC-GTC-AAA-CTC-TG	Rat
Leptin receptor	CCC-CCA-CTG-AAA-GAC-AGC-TT	GGC-TTC-ACA-ACA-AGC-ATG-GG	Rat
Proopiomelanocortin	CGA-CGG-AGG-AGA-AAA-GAG-GTT	CTG-AGG-CTC-TGT-CGC-GGA-A	Rat
Insulin growth factor receptor 1	AAG-GCC-AGA-GGT-GGA-GAA-TAA	TAC-CAT-GCA-GTT-CCG-AGC-AG	Rat
Ghrelin	CCA-AGA-AGC-CAC-CAG-CTA-AA	CTG-ATT-TCC-AGC-TCC-TCC-TC	Rat
Neuropeptide Y receptor 1	Reference: qMmuCIP0029884 (BioRad, Marnes-la-Coquette, France)		Mouse
Leptin receptor	Reference: qMmuCID0015266 (BioRad)		Mouse
Agouti-related protein	CGG-AGG-TGC-TAG-ATC-CAC-AGA	AGG-ACT-CGT-GCA-GCC-TTA-CAC	Mouse
Insulin growth factor receptor 1	GCA-CCA-ATG-CTT-CAG-TCC-CT	TTG-GAG-CAG-TAG-TTG-TGC-CG	Mouse
Insulin receptor	AGA-TGT-CCC-ATC-AAA-TAT-TGC-CA	CAT-CCG-GCT-GCC-TCT-TTC-TC	Mouse

4.5. Immunohistochemistry

Immunohistological analyses were performed on brain sections at the level of the arcuate nucleus of the hypothalamus according to the Paxinos and Watson rat brain atlas [47]. Nonspecific binding sites were blocked in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin (BSA) and incubation was performed overnight with an antibody against one of the following proteins: NPY (rabbit polyclonal, 1/200, Cell Signaling Technology, Ozyme), ghrelin (rabbit polyclonal, 1/200, Millipore, Fontenay-sous-Bois, France). Cell nuclei were counterstained with the DNA fluorochrome 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, Sigma-Aldrich). After a washing step, immunoreactivity was assessed by incubation in the presence of an appropriate secondary anti-IgG antibody conjugated to AlexaFluor for 1h at 25°C (1/1000, Life Technologies, Saint-Aubin, France). Control experiments were conducted by omitting the primary antibody. Immunofluorescence visualization and image acquisition (x20 and x60 magnification) were performed with a confocal microscope (Nikon Instruments, Champigny sur Marne, France) and analyzed by Cell® software (Olympus, Rungis, France).

4.6. Statistical analysis

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

5. Conclusion

The results of the present study suggest that early methyl donor deficiency can impair the hypothalamus development, with altered expression of neuropeptides and related receptors regulating eating behavior and energy homeostasis, leading to growth retardation. If maternal supplementation with folic acid during the perinatal period could not fully reverse the deleterious consequences of deficiency, it was shown to exert beneficial effects.

Author Contributions: C.B.P. and J.L.D. conceived and designed the study. J.L.G. provided expert advice. L.S.C., G.P., A.G., A.J., D.H., A.R. and R.U. performed the experiments and analyzed the data. J.L.D. and C.B.P. wrote the paper.

Funding: This work was funded by the french National Institute for Health and Medical Research (Inserm), University of Lorraine, and by grants from European funds for regional development (FEDER), and the "Région Lorraine", France.

Acknowledgments: The authors are indebted to Jean-Marc Alberto and Philippe Gérard for their valuable assistance. L.S.C. and A.G. are recipients of a fellowship from the French Ministry for Higher Education and Research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Guéant, J.L., Namour, F., Guéant-Rodriguez, R.M., Daval, J.L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* 2013, 24, 279-289.
2. Guéant, J.L.; Caillerez-Fofou, M.; Battaglia-Hsu, S.; Alberto, J.M.; Freund, J.N.; Dulluc, I.; Adjalla, C.; Maury, F.; Merle, C.; Nicolas, J.P.; Namour, F.; Daval, J.L. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* 2013, 95, 1033-1040.
3. Mattson, M.P.; Shea, T.B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 2003, 26, 137-146.
4. Chemrawi, R.; Pooya, S.; Lorentz, S.; Gauchotte, G.; Arnold, C.; Guéant, J.L.; Battaglia-Hsu, S.F. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* 2013, 4, e553.
5. Akchiche, N.; Bossenmeyer-Pourié, C.; Kerek, R.; Martin, N.; Pourié, G.; Koziel, V.; Helle, D.; Alberto, J.M.; Ortiou, S.; Camadro, J.M.; Léger, T.; Guéant, J.L.; Daval, J.L. Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J.* 2012, 26, 3980-3992.
6. Jeong, S.O.; Son, Y.; Lee, J.H.; Choi, S.W.; Kim, S.H.; Cheong, Y.K.; Chung, H.T.; Pae, H.O. Both nitric oxide and nitrite prevent homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and subsequent apoptosis via cGMP-dependent pathway in neuronal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017, 493, 164-169.
7. Kirke, P.N.; Molloy, A.M.; Daly, L.E.; Burke, H.; Weir, D.G.; Scott, J.M. Maternal plasma folate and vitamin B12 are independent risk factors for neural tube defects. *Q J Med.* 1993, 86, 703-708.
8. Molloy, A.M.; Kirke, P.N.; Brody, L.C.; Scott, J.M.; Mills, J.L. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr. Bull.* 2008, 29, S101-S111.
9. Black, M.M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr. Bull.* 2008, 29, S126-S131.
10. Blaise, S.A.; Nédélec, E.; Schroeder, H.; Alberto, J.M.; Bossenmeyer-Pourié, C.; Guéant, J.L.; 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.

11. Kerek, R.; Geoffroy, A.; Bison, A.; Martin, N.; Akchiche, N.; Pourié, G.; Helle, D.; Guéant, J.L.; Bossenmeyer-Pourié, C.; Daval, J.L. Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis.* 2013, 4, e755.
12. Bossenmeyer-Pourié, C.; Pourié, G.; Koziel, V.; Helle, D.; Jeannesson, E.; Guéant, J.L.; Beck, B. Early methyl donor deficiency produces severe gastritis in mothers and offspring through N-homocysteinylation of cytoskeleton proteins, cellular stress, and inflammation. *FASEB J.* 2013, 27, 2185-2197.
13. Bossenmeyer-Pourié, C.; Blaise, S.; Pourié, G.; Tomasetto, C.; Audonnet, S.; Ortiou, S.; Koziel, V.; Rio, M.C.; Daval, J.L.; Guéant, J.L.; Beck, B. Methyl donor deficiency affects fetal programming of gastric ghrelin cell organization and function in the rat. *Am. J. Pathol.* 2010, 176, 270-277.
14. Kojima, M.; Kangawa, K. Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 2005, 85, 495-522.
15. Brunetti, L.; Recinella, L.; Orlando, G.; Michelotto, B.; Di Nisio, C.; Vacca, M. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 454, 189-192.
16. Brunetti, L.; Di Nisio, C.; Recinella, L.; Orlando, G.; Ferrante, C.; Chiavaroli, A.; Leone, S.; Di Michele, P.; Shohreh, R.; Vacca, M. Obestatin inhibits dopamine release in rat hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* 2010, 641, 142-147.
17. Morton, G.J.; Schwartz, M.W. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2001, 25 (Suppl. 5), S56-S62.
18. Korner, J.; Leibel, R.L. To eat or not to eat - how the gut talks to the brain. *N. Engl. J. Med.* 2003, 349, 926-928.
19. van den Top, M.; Lee K.; Whyment, A.D.; Blanks, A.M.; Spanswick, D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat. Neurosci.* 2004, 7, 493-494.
20. Chaudhri, O.; Small, C.; Bloom, S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2006, 361, 1187-1209.
21. Bates, S.H.; Stearns, W.H.; Dundon, T.A.; Schubert, M.; Tso, A.W.; Wang, Y.; Banks, A.S.; Lavery, H.J.; Haq, A.K.; Maratos-Flier, E.; Neel, B.G.; Schwartz, M.W.; Myers, M.G. Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003, 421, 856-859.
22. Lau, C.; Rogers, J.M. Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 2004, 72, 300-312.
23. Breton, C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J. Endocrinol.* 2013, 216, R19-R31.
24. Cowley, M.A.; Smith, R.G.; Diano, S.; Tschöp, M.; Pronchuk, N.; Grove, K.L.; Strasburger, C.J.; Bidlingmaier, M.; Esterman, M.; Heiman, M.L.; Garcia-Segura, L.M.; Nillni, E.A.; Mendez, P.; Low, M.J.; Sotonyi, P.; Friedman, J.M.; Liu, H.; Pinto, S.; Colmers, W.F.; Cone, R.D.; Horvath, T.L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003, 37, 649-661.
25. Geoffroy, A.; Kerek, R.; Pourié, G.; Helle, D.; Guéant, J.L.; Daval, J.L.; Bossenmeyer-Pourié, C. Late maternal folate supplementation rescues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring let-7 and miR-34 pathways. *Mol. Neurobiol.* 2017, 54, 5017-5033.
26. Bâ, A. Perinatal thiamine deficiency-induced spontaneous abortion and pup-killing responses in rat dams. *Nutr. Neurosci.* 2013, 16, 69-77.
27. Geoffroy, A.; Saber-Cherif, L.; Pourié, G.; Helle, D.; Umoret, R.; Guéant, J.L.; Bossenmeyer-Pourié, C.; Daval, J.L. Developmental Impairments in a Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 973.
28. Rinaman, L. Visceral sensory inputs to the endocrine hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 2007, 28, 50-60.
29. Warchoń, M.; Krauss, H.; Wojciechowska, M.; Opala, T.; Pięta, B.; Żukiewicz-Sobczak, W.; Kupsz, J.; Grochowalska, A. The role of ghrelin, leptin and insulin in foetal development. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2014, 21, 349-352.

30. Chang, G.Q.; Gaysinskaya, V.; Karatayev, O.; Leibowitz, S.F. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J. Neurosci.* 2008, 28, 12107-12119.
31. Gali Ramamoorthy, T.; Begum, G.; Harno, E.; White, A. Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. *Front. Neurosci.* 2015, 9, 126.
32. Steculorum, S.M.; Colden, G.; Coupe, B.; Croizier, S.; Lockie, S.; Andrews, Z.B.; Jarosch, F.; Klusmann, S.; Bouret, S.G. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *J. Clin. Invest.* 2015, 125, 846-858.
33. Kawai, M.; Yamaguchi, M.; Murakami, T.; Shima, K.; Murata, Y.; Kishi, K. The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 240, 798-802.
34. Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999, 402, 656-660.
35. Cripps, R.L.; Martin-Gronert, M.S.; Archer, Z.A.; Hales, C.N.; Mercer, J.G.; Ozanne, S.E. Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation. *Clin. Sci. (Lond)* 2009, 117, 85-93.
36. Bouret, S.G.; Draper, S.J.; Simerly, R.B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 2004, 304, 108-110.
37. Abegg, K.; Hermann, A.; Boyle, C.N.; Bouret, S.G.; Lutz, T.A.; Riediger, T. Involvement of Amylin and Leptin in the Development of Projections from the Area Postrema to the Nucleus of the Solitary Tract. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2017, 8, 324.
38. Pourié, G.; Martin, N.; Bossenmeyer-Pourié, C.; Akkiche, N.; Guéant-Rodriguez, R.M.; Geoffroy, A.; Jeannesson, E.; El Hajj Chehadeh, S.; Mimoun, K.; Brachet, P.; Koziel, V.; Alberto, J.M.; Helle, D.; Debard, R.; Leininger, B.; Daval, J.L.; Guéant, J.L. Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor α . *FASEB J.* 2015, 29, 3713-3725.
39. Derghal, A.; Djelloul, M.; Trouslard, J.; Mounien, L. The Role of MicroRNA in the Modulation of the Melanocortinergic System. *Front. Neurosci.* 2017, 11, 181.
40. Croizier, S.; Park, S.; Maillard, J.; Bouret, S.G. Central Dicer-miR-103/107 controls developmental switch of POMC progenitors into NPY neurons and impacts glucose homeostasis. *Elife* 2018, e40429.
41. Yang, N.V.; Pannia, E.; Chatterjee, D.; Kubant, R.; Ho, M.; Hammoud, R.; Pausova, Z.; Anderson, G.H. Gestational folic acid content alters the development and function of hypothalamic food intake regulating neurons in Wistar rat offspring post-weaning. *Nutr. Neurosci.* 2018, 30, 1-12.
42. Remmers, F.; Delemarre-van de Waal, H.A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr. Rev.* 2011, 32, 272-311.
43. Dalvi, P.S.; Nazarians-Armavil, A.; Tung, S.; Belsham, D.D. Immortalized neurons for the study of hypothalamic function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011, 300, R1030-R1052.
44. Daval, J.L.; Blaise, S.; Guéant, J.L. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, E1.
45. Ducros, V.; Belva-Besnet, H.; Casetta, B.; Favier, A. A robust liquid chromatography tandem mass spectrometry method for total plasma homocysteine determination in clinical practice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006, 44, 987-990.
46. Chery, C.; Barbe, F.; Lequere, C.; Abdelmouttaleb, I.; Gerard, P.; Barbarino, P.; Boutroy, J.L.; Gueant, J.L. Hyperhomocysteinemia is related to a decreased blood level of vitamin B12 in the second and third trimester of normal pregnancy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002, 40, 1105-1108.
47. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th ed.; Academic Press: London, England, 2013; 472 p.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Fiche technique 1 : Trypsination des cellules

-Élimination du milieu de culture, à l'aide d'une pipette pasteur reliée à un système d'aspiration.

-Lavage de 5min avec PBS1x (D1408-500ML, Sigma-Aldrich) pour éliminer le reste du milieu de culture.

-Ajout Trypsine-EDTA (D3924-100 ML, Sigma-Aldrich) pendant 5min à 37°C (le volume dépend de la surface du flasque (1-5 mL).

-Blocage de l'action de la trypsine avec le milieu de culture complet ou du sérum de veau fœtal (CVFSVF0001, lot : S52751-2262, Eurobio).

-Centrifugation des cellules pendant 5min à 200 xg (Heraeus Megafuge 16R centrifuge, Thermo Scientific).

-Resuspension des cellules dans le milieu d'entretien et remise en culture à raison d'un ratio de 1/5.

-Incubation à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

Ces lignées cellulaires poussent vite et sont confluentes au bout de 2jours. Elles peuvent supporter jusqu'à 40 passages. Au-delà, la préservation de leur phénotype n'est plus assurée.

Fiche 2 : Milieux carencés pour mHypoE-46 et rHypoE-11

1-Tamponnage du DMEM carencé en B9 (DMEM D2429)

	Solution mère	Solution finale
H2O stérile	-	-
DMEM D2429	10X	1X
Bicarbonate de Na (S8761, Sigma- Aldrich)	7,5%	0.37%
Glutamine (G7513, Sigma-Aldrich)	200mM	2mM

2-Préparation du milieu de culture carencé pour la prolifération

	Solution mère	Solution finale
DMEM 2429 tamponné	-	-
Glucose (G8769, Sigma-Aldrich)	45%	0,35%
SVF (CVFSVF0001, Eurobio) (décomplémenté)	100%	10%
Pénicilline (P4333, Sigma-Aldrich)	10 000U/mL	1%
Streptomycine (P4333, Sigma- Aldrich)	10 000mg/mL	

Fiche technique 3 : entretien des animaux

-Age des animaux à l'arrivée au laboratoire : 8-10 semaines.

-Acclimatation : 2 semaines.

-Conditions d'hébergement standards : température : 22-23°C, cycle de lumière/obscurité de 12h, nourriture et eau à volonté.

➤ Accouplement

-Femelles mises en présence de mâles en fin de journée.

-Réalisation d'un frottis vaginal le lendemain matin, comme suit :

- Prélèvement réalisé avec un coton tige imbibé de sérum physiologique.
- Étalement sur une lame.
- Observation au microscope : Présence de spermatozoïdes, le test est positif et le rat est retiré de la cage, âge embryonnaire E 0,5.

: Absence de spermatozoïdes, le test est négatif, laisser le rat dans la cage et recommencer l'opération 24H après.

Fiche technique 4 : Supplémentation en folate

Après confirmation de la fécondation par le frottis vaginal :

-Suivi quotidien du poids des rates ; une prise de poids confirme la fécondation.

-A l'âge embryonnaire E13, la supplémentation avec les folates est introduite à raison de 3mg/Kg/J.

-La quantité d'acide folique nécessaire (en fonction du poids) est mélangé à 1mL de lait concentré, laissé en libre accès dans la cage pour éviter d'induire un stress.

-Les femelles témoins reçoivent 1mL de véhicule (lait concentré) sans l'acide folique.

-La supplémentation est maintenue jusqu'au sevrage des ratons (21 jours après la naissance).

Fiche technique 5 : Détection de l'apoptose en utilisant le kit Apoptag® Fluorescein Direct In Situ

-Perméabilisation des membranes par incubation pendant 5 min à -20°C, dans un mélange contenant l'éthanol et l'acide acétique (2 :1) pré-refroidi.

-Lavages : 2x5min avec le PBS1X.

-Incubation pendant au moins 10 secondes avec du tampon d'équilibration.

-Ajout de l'enzyme TdT à raison de 55µL/5cm² et incubation pendant 1h à 37°C dans une chambre humide.

-Ajout de le Working Strength Stop/Wash Buffer et agitation des échantillons pendant 15 sec, puis incubation 10 min à température ambiante.

-Lavages : 3x1min avec le PBS1X.

-Ajout de l'Anti-Digoxigenin Conjugate à raison de 65µL/5cm², et incubation pendant 30min à température ambiante dans une chambre humide à l'obscurité.

-Lavages : 4 fois 2 min au PBS 1X

-Marquage des noyaux 5 min avec une solution de DAPI 1/3000 dans de l'eau MilliQ.

-Lavages : 2x5 min avec le PBS 1X et rinçage rapide à l'eau distillée.

-Montage des échantillons au fluoromount-G™ (00-4958-02, Invitrogen) : recouvrir les coupes de quelques gouttes, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C à l'obscurité. Analyse des coupes au microscope confocal (Nikon Instruments Ti).

Fiche technique 6 : Extraction d'ARN avec le kit NucleoSpin® RNA Plus

Homogénéisation et lyse des échantillons

-Ajouter 350µL du tampon LBP au culot cellulaire et homogénéiser en faisant quelques pipetages-refoulements avec la pipette.

Élimination de l'ADN génomique et filtration des lysats

-Placer dans un tube de collection, la colonne NucleoSpin ® gDNA Removal, puis transférer le lysat homogénéisé et centrifuger 30s à 11000 xg (5424 Centrifuge, Eppendorf).

- Jeter la colonne et continuer avec le lysat filtré.

Liaison de l'ARN

-Ajouter 100µL du tampon de liaison BS au lysat, mixer en vortexant.

-Transférer la totalité du lysat à la colonne NucleoSpin® RNA Plus, placée dans un tube de collection, puis centrifuger 15s à 11000 xg.

Lavage et séchage de la membrane de silice

-Ajouter 200µL du tampon WB1 à la colonne NucleoSpin® RNA Plus, puis centrifuger pendant 15s à 11000 xg.

- Ajouter 600µL du tampon WB2 à la colonne et centrifuger une nouvelle fois à 11000 xg pendant 15s.

-Ajouter 250 μ L de WB2 à la colonne et centrifuger pendant 2min à 11000 xg pour sécher complètement la membrane.

Élution de l'ARN

-Placer la colonne dans un tube de collection nucleases-Free, puis ajouter 30 μ L d'eau RNase-Free, centrifuger pendant 1min à 11000 xg.

-Répéter l'étape précédente une fois.

Dosage de l'ARN extrait et évaluation de sa pureté

Cette étape se fait à l'aide un spectrophotomètre (MultiSkan Go™, Thermo Fisher Scientific) et détermine les absorbances aux longueurs d'ondes λ_{230} , λ_{260} et λ_{280} nm. Les ratio DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{230} permettent d'évaluer la pureté de l'ARN et doivent être compris entre 1,8 et 2. La concentration en ARN est déterminée à partir de l'absorbance à 260 nm selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon.l.C$, avec A : Absorbance, ϵ : coefficient d'absorbance moléculaire, l : trajet optique, C : concentration de l'ARN dans la solution.

Fiche technique 7 : Extraction d'ARN au TRIzol (Invitrogen) pour Tissus avec tubes PLG (Eppendorf)

Lyse et homogénéisation de l'échantillon

-Dans des microtubes type SafeLock ou SafeSeal de 1.5 mL, ajouter 500 µL de TRIzol pour 10-20 mg de tissu.

-Homogénéiser avec une micropipette.

Séparation des phases

-Incuber l'échantillon homogénéisé 5 min à température ambiante (dissociation des complexes nucléoprotéiques).

-Centrifuger les tubes Phase Lock Gel (PLG) à 12000 xg (5424 Centrifuge, Eppendorf) dans une micro-centrifugeuse pendant 30 à 60s.

-Transférer l'échantillon lysé dans le tube PLG centrifugé.

-Ajouter 100 µL de chloroforme.

-Agiter vigoureusement à la main pendant 15 secondes.

-Incuber 3 minutes à température ambiante.

-Centrifuger les échantillons à 12000 xg/4°C/15 min (Allegra X-22R centrifuge, Beckman Coulter).

Note : Le mélange est séparé en 2 parties : une phase inférieure contenant le Phénol/chloroforme et les ADN, séparée par le gel de la phase supérieure aqueuse incolore contenant l'ARN.

-Transférer la phase aqueuse dans un nouveau microtube type SafeLock ou SafeSeal de 1.5 mL.

-2^{ième} lavage chloroforme : Ajouter 200µL de chloroforme à la phase aqueuse, agiter vigoureusement à la main, incuber 3 min à température ambiante, centrifuger à 12000 xg 4°C pendant 10 min, récupérer la phase aqueuse dans un nouveau microtube.

Précipitation de l'ARN

-Ajouter 250 µL d'isopropanol 100% à la phase aqueuse.

-Incuber 10 min à température ambiante, agiter doucement à la main régulièrement.

-Centrifuger à 12,000 xg/4°C/10 min.

Lavage de l'ARN

-Retirer le surnageant du tube sans toucher le culot d'ARN.

-Laver le culot avec 500 µL d'éthanol 75%.

-Agiter l'échantillon brièvement et centrifuger le tube à 7500 xg/4°C/5 min. Éliminer le surnageant.

-Effectuer un deuxième lavage à l'éthanol 75%, pour cela répéter les deux étapes précédentes.

-Sécher le culot à l'air libre pendant 5–10 minutes : tube retourné sur un papier absorbant.

-Reprendre l'ARN dans le tampon souhaité (eau RNase-Free, eau milliQ).

-Chauffer à 55°C/5 min pour le solubiliser. Ou laisser à 4°C pendant 1h.

-Dosage de la même manière que précédemment.

Fiche technique 8 : contrôle qualité de l'ARN extrait

Le test de contrôle de l'intégrité de l'ARN se fait par une électrophorèse horizontale sur un gel d'agarose.

Préparation du gel

-Choisir la concentration en agarose en fonction de la taille de(s) bande(s) recherchée(s)

Concentration d'agarose (%)	Gamme de tailles idéales (en kb)
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

-Dans un Erlenmeyer, peser la masse d'agarose (A9539, Sigma Life Science) adéquate et ajouter le TAE 1x, mélanger manuellement.

-Placer l'erenmeyer dans le micro-onde, et chauffer jusqu'à ébullition de la solution, laisser bouillir ~10s (attention à ce que la solution ne déborde pas) et sortir l'erenmeyer du four micro-ondes. Vérifier que la poudre soit totalement dissoute.

Attendre 2-3min afin de laisser refroidir la solution (jusque 50-60°C).

-Ajouter 5µL de Bromure d'éthidium (X328) à la solution. Mélanger manuellement.

Verser la solution dans le système de coulage. Attendre la polymérisation de l'agarose, 10 à 30 min.

Enlever délicatement le peigne.

-Récupérer le rack avec le gel et placer les dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE (Tris Acétate EDTA)1x.

Préparation et dépôt des échantillons

-Dans une mini plaque avec puits ronds, déposer 10µL de chaque échantillon puis ajouter 2µL de tampon de charge (Loading dye solution, Sigma, SB2040) pour chacun d'eux.

-Déposer les échantillons préparés ainsi que le marqueur de taille (Ladder 100pb, Invitrogen 10068-013 ; Thermo Scientific, SM0333) dans les puits du gel.

Migration

-La Migration du gel se fait à 90V constant pour un grand gel et à 80V constant pour un petit gel pendant 60-80min.

Révélation

-La migration terminée, récupérer le gel et le transférer dans un transilluminateur, appareil de révélation : Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

Quand l'ARN est intègre, on observe deux bandes correspondantes aux fractions 18S et 28S et parfois la fraction 5S. Quand il est dégradé, on observe un Smear (multitude de bandes) sur le gel.

Fiche technique 9 : La Rétrotranscription et la PCR quantitative

➤ La rétrotranscription

-Dilution de 300ng d'ARN dans de l'eau RNase-Free pour faire un volume final de 10 µL.

-Ajout de 2 µL du 5x PrimeScript RT Master Mix.

-Conditions d'incubation : 15 min à 37°C, 5 sec à 85°C pour l'inactivation de l'enzyme et enfin 12°C pour l'attente.

➤ La PCR quantitative

-Dans une plaque de 96 puits, déposer 18 µL du mix contenant les amorces sens et anti-sens à une concentration de 0,2 µM, le Rox Ref Dye 1x, le Sybr Green 1x et l'eau RNase-Free.

-Ajouter 2 µL d'ADN complémentaires (ADNc) issus de l'étape de rétrotranscription.

-Centrifugation de la plaque pendant 30s à grande vitesse (Plate Fuge Microplate Microcentrifuge, Benchmark Scientific).

-Conditions d'amplification : 95°C pendant 30s pour la dénaturation initiale et l'activation de l'enzyme, 40 cycles de dénaturation et hybridation/élongation, comme suit : 95°C pendant 5sec, 30s à température d'hybridation spécifique du couple d'amorces (voir tableau ci-dessous).

-La mesure de la fluorescence se fait avec le logiciel (StepOne Software v2.3) à l'aide de la sonde Sybr Green qui s'intercale avec l'ADN double brin.

-La détermination du taux d'expression des gènes se fait avec le calcul de $2^{-\Delta C_t}$. Elle est normalisée par rapport à deux gènes de référence (RPS29 et Pol II/ GAPDH) et par rapport à un calibrateur externe (mélange d'ADNc de toutes les conditions).

Tableau 2: Amorces de qPCR et conditions d'utilisation

Gène	Sens de l'amorce	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (T _m)	Espèce
Neuropeptide Y	Sens	AGATCCAGCCCTGAGACACT	60°C	Rat
	Anti-sens	TTCAAGCCTTGTCTGGGGG		Rat
Récepteur 1 au Neuropeptide Y	Sens	AGA-TCC-AGC-CCT-GAG-ACA-CT	61°C	Rat
	Anti-sens	TTC-AAG-CCT-TGT-TCT-GGG-GG		Rat
Récepteur aux Glucocorticoïdes	Sens	ATG-TCA-TTA-CGG-GGT-GCT-GA	61°C	Rat
	Anti-sens	ATT-GTG-CTG-TCC-TTC-CAC-TGC		Rat
Récepteur à l'insuline	Sens	GGA-CCA-GGC-ATC-CTG-TGA-AA	61°C	Rat
	Anti-sens	ATC-CTG-CCC-GTC-AAA-CTC-TG		Rat
Récepteur à la leptine	Sens	CCC-CCA-CTG-AAA-GAC-AGC-TT	61°C	Rat
	Anti-sens	GGC-TTC-ACA-ACA-AGC-ATG-GG		Rat
Propiomélanocortine	Sens	CGA-CGG-AGG-AGA-AAA-GAG-GTT	60°C	Rat
	Anti-sens	CTG-AGG-CTC-TGT-CGC-GGA-A		Rat
Récepteur du facteur de croissance à l'insuline	Sens	AAG-GCC-AGA-GGT-GGA-GAA-TAA	57°C	Rat
	Anti-sens	TAC-CAT-GCA-GTT-CCG-AGC-AG		Rat
Ghréline	Sens	CCA-AGA-AGC-CAC-CAG-CTA-AA	61°C	Rat
	Anti-sens	CTG-ATT-TCC-AGC-TCC-TCC-TC		Rat

NeuropeptideY	Sens+Anti-sens	Ref : qMmuCIP0029884 (BioRad)	59°C	Souris
Récepteur à la leptine	Sens+Anti-sens	Ref : qMmuCID0015266 (BioRad)	60°C	Souris
Récepteur aux glucocorticoïdes	Sens	TGA-AGC-TTC-GGG-ATG-CCA-TT	61°C	Souris
	Anti-sens	ATT-GTG-CTG-TCC-TTC-CAC-TG		
Agouti related protein	Sens	CGG-AGG-TGC-TAG-ATC-CAC-AGA	57°C	Souris
	Anti-sens	AGG-ACT-CGT-GCA-GCC-TTA-CAC		
Récepteur du facteur de croissance à l'insuline	Sens	GCA-CCA-ATG-CTT-CAG-TCC-CT	61°C	Souris
	Anti-sens	TTG-GAG-CAG-TAG-TTG-TGC-CG		
Récepteur à l'insuline	Sens	AGA-TGT-CCC-ATC-AAA-TAT-TGC-CA	60°C	Souris
	Anti-sens	CAT-CCG-GCT-GCC-TCT-TTC-TC		

Fiche technique 10 : Extraction des protéines au tampon RIPA et dosage avec l'acide bicinchoninique (BCA)

➤ Protocole pour les cellules

Travailler toujours à +4°C (sur lit de glace)

-Laver 3 fois les cellules encore adhérentes aux flasques avec du D-PBS 1x froid. Bien aspirer lors du dernier lavage.

-Distribuer 500 µL de tampon RIPA 1X sur le tapis cellulaire, puis gratter toute la surface à l'aide d'un grattoir. Transférer dans un microtube 1.5 mL.

-Lyser les cellules par un bain aux ultrasons pendant 30 min à 4°C, min, puis par broyage mécanique à l'aide d'une seringue 1 mL et d'une aiguille 26G. La lyse est terminée par 3 cycles congélation (azote liquide) / décongélation (bain marie 37°C).

-Le mélange est centrifugé (Avanti J-26 XP centrifuge, Beckman coulter) à 20.000 xg/4°C/30 min.

-Le surnageant protéique est prélevé, homogénéisé et stocké par aliquots au congélateur à -80°C.

➤ Protocole pour les tissus

Travailler toujours à +4°C (sur lit de glace)

-Broyer le tissu dans l'azote à l'aide d'un mortier et un pilon. Faire attention à ne pas décongeler l'échantillon.

- Resuspendre le broyat (30 mg) dans du tampon RIPA1X froid (550 μ L).
- Incuber 10 min sur glace.
- Broyage à l'aide d'une seringue de 1mL et d'une aiguille 26G.
- Lyser avec 3 cycles de congélation/décongélation (azote liquide – bain marie 37°C).
- Centrifuger à 20 000 xg/30min/4°C.
- Récupérer le surnageant, l'aliquoter et le stocker à -80°C.

➤ **Dosage protéique**

- Réalisation d'une gamme étalon avec plusieurs concentrations de l'albumine de sérum bovin (BSA) (UP36859, Interchim).
- Préparation du réactif de travail contenant 50 volumes du réactif A (BCA) et 1 volume de la solution B (CuSO₄).
- Distribution de 25 μ L de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser dans une plaque 96 puits en triple exemplaires.
- Ajout de 200 μ L du mélange contenant le réactif A et B dans chaque puit et agiter la plaque.
- Couvrir la plaque et incuber 30 min à 37°C.
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre lecteur de plaque, Victor 3 (1420-041 Multilabel Plate Counter Victor3, Perkin Elmer).

-La concentration en protéines est déterminée à l'aide de l'équation de la droite réalisée à partir des valeurs de densité optique de la gamme étalon.

Fiche technique 11 : Western Blot

1-Séparation des protéines en conditions dénaturantes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Cette étape est réalisée à l'aide d'un gel de concentration à 5% permettant de concentrer les protéines au même niveau, pour migrer ensuite en fonction du poids moléculaire sur le gel de séparation. Le pourcentage du gel de séparation est défini en fonction du poids moléculaire des protéines cibles.

➤ Préparation des échantillons

Prévoir un dépôt de 20 à 30 µg de protéines par puits.

-Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X (Laemmli Sample Buffer, L004126C) additionné de β-mercapto-éthanol à 1 volume d'échantillon.

-Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons.

-Charger les puits avec les échantillons.

➤ Migration

-Gel de concentration : 80V, environ 15 mn.

-Gel de séparation : 110V, environ 1h30.

2-Electro-transfert semi-liquide sur membrane de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF)

➤ Préparation de la membrane

-La membrane de nitrocellulose est prête à l'emploi, tandis que la membrane de PVDF nécessite une activation d'au moins 30 sec dans du méthanol.

-Équilibrer la membrane (nitrocellulose/PVDF) dans le tampon de transfert froid pendant quelques minutes (maximum 5min), ainsi que les filtres.

-Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid pendant quelques minutes (maximum 5min).

➤ Transfert

-Dans la cassette de transfert du Trans-Blot® Turbo™ (BioRad), préparer un sandwich dans l'ordre : 3 papiers filtres, la membrane, le gel et 3 papiers filtres (Whatman® 3M).

- Humidifier la surface de la cassette avec le tampon de transfert froid.

- Conditions de transfert : 1A, 25V, 20-30 min en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt.

-Vérification de la qualité du transfert par coloration au Rouge Ponceau S pendant 5min puis décoloration à l'eau distillée.

3-Blocage des sites libres et incubation avec les anticorps

-Blocage dans du lait écrémé (Régilait®) ou BSA (BSA fraction V, 04-100-811, Euromodex) 5% (en fonction de l'anticorps) préparé dans le tampon de lavage, sous agitation pendant 1h à température ambiante.

-Incubation avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine recherchée, dilué dans la solution de blocage pendant une nuit à 4°C sous agitation lente (tableau anticorps).

-Lavages dans le tampon de lavage 4 fois 10 min, sous agitation rapide à température ambiante.

-Incubation avec l'anticorps secondaire correspondant, couplé à l'enzyme HRP (Horseradish peroxydase), pendant 1 heure sous agitation lente à température ambiante.

-Lavages dans le tampon de lavage 4 fois 10 min, sous agitation rapide à température ambiante.

4-Révélation ECL

-Préparation du réactif Clarity Western ECL Substrate (S35) en mélangeant la solution de peroxyde avec la solution activatrice de luminol à volume égal.

-Dépôt d'1mL du réactif obtenu dans l'étape précédente, sur un film Saran.

-Élimination de l'excès du tampon de lavage et dépôt de la membrane sur le film Saran contenant l'ECL.

-Incubation 5 min à température ambiante.

-Séchage de la membrane entre deux papiers absorbants et révélation sur un système d'imagerie chimioluminescence, Fusion Fx7 (Fisher, S/N, 10-201068).

-Traitement des données à l'aide du logiciel ImageJ v1.49.

5-Déshybridation des membranes

-Immerger les membranes dans un bac contenant le tampon de déshybridation chaud (40°C) pendant 30 min en agitant toutes les 10 min environ.

-Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée, ensuite dans le tampon de lavage.

-Reprendre le protocole de western à partir de l'étape de blocage.

Tableau 3: Anticorps primaires (Western Blot et Immunomarquage)

Anticorps	Référence	Western blot	Immunofluorescence	Duolink	Fournisseur	Espèce hôte
Anti-récepteur aux glucocorticoïdes (GR)	NB300-731	1/1000	1/200	1/200	Novus Biological	Souris
Anti-GAPDH	2821	1/10000	—	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-Neuropeptide Y	11976	—	1/200	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-Homocystéine	AB5512	—	1/200	1/200	Millipore	Lapin
Anti-Récepteur à la leptine	AB5593	—	1/200	—	Abcam	Lapin
Anti-récepteur à l'insuline	3025	—	1/100	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-récepteur du facteur de croissance à l'insuline	NBP1-77680	—	1/100	—	Novus Biological	Lapin
Anti-Ghréline	MAB10404	—	1/200	—	Millipore	Lapin
Anti-Cox2	AB15191	1/2000	—	—	Abcam	Lapin
Anti-pNFκB	3033	1/2000	—	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-NFκB	4764S	1/2000	—	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-IKBα	4814	1/2000	—	—	Cell Signaling	Souris
Anti-pIKB α	2859	1/2000	—	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-pErk1/2		1/2000	—	—		
Anti-PP2Ac	05-577	1/2000	—	—	Upstate	Souris
Anti-pIKKβ	2697	1/2000	—	—	Cell Signaling	Lapin
Anti-caspase 9 clivée	9507	1/2000	—	—	Cell signaling	Lapin
Anti-caspase 3 clivée	9664	1/2000	—	—	Cell signaling	Lapin
Anti-caspase 3	9661	1/2000	—	—	Cell signaling	Lapin
Anti-UEA1	U4754	—	1/200	—	Sigma-Aldrich	Lapin
Anti-GSII	MABN1182	—	1/200	—	Sigma-Aldrich	Souris
Anti-E-cadherin	Ab76319	—	—	1/200	Abcam	Lapin

Anti- β -catenin	9581	—	—	1/200	Cell signaling	Lapin
Anti-SOD	Ab13533	1/2000	—	—	Abcam	Lapin

Fiche technique 12 : Immunohistochimie

-Sortir les lames (tissus) du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher).

-Entourer les coupes de DakoPen™ (stylo hydrophobe).

-Fixer les cellules ou coupes en déposant 200 µL de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 min pour les tissus et 10 min pour les cellules à température ambiante sous hotte.

-Rincer les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante.

-Incuber les coupes dans un bain de Triton à 0,1% (Triton X-100, 17-1315-01, Amersham) pour les tissus et à 0,01% pour les cellules afin de perméabiliser les membranes, pendant 10min à température ambiante.

-Laver dans un bain de PBS 1X pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.

-Déposer 200 µL d'une solution de BSA à 10% (tissus) ou à 1% (cellules) (BSA fraction V, 04-100-811, Euromodex), diluée dans du PBS 1X et incuber 1h à température ambiante en chambre humide.

-Déposer environ 100 µL d'anticorps primaire dirigé contre la protéine cible (tableau anticorps, fiche technique n°10) et incuber une nuit à 4°C en chambre humide.

-Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce.

-Déposer environ 80 µL d'anticorps secondaire (dilution 1/1000 dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) et laisser incuber pendant 1h à l'obscurité dans une chambre humide à température ambiante.

- Laver les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min sous agitation douce.

- Déposer environ 100 µL de DAPI à une concentration de 1/3000 dans l'eau Milli-Q et laisser incubé 5 min à l'obscurité en chambre humide à température ambiante.

- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min sous agitation douce.

- Faire un lavage rapide à l'eau distillée.

- Monter les lames au fluoromount-G™ (00-4958-02, Invitrogen) : les coupes sont recouvertes de quelques gouttes de liquide de montage, ensuite poser dessus une lamelle et laisser sécher à 4°C à l'obscurité.
Pour les cellules, la lamelle contenant les cellules marquées est prélevée avec une pince et est déposée sur une lame contenant une goutte de liquide de montage face cellules. Séchage à 4°C et à l'obscurité.

- Conserver bien les lames à l'obscurité à 4°C.

- Observation au microscope à épifluorescence BX51 WI (Olympus, Rungis) couplé à une Caméra ProgRes MF cool (Jenoptik, Jena) et /ou au microscope confocal (Nikon Instruments Ti) et analysés à l'aide du Cell® Software.

Fiche technique 13 : Duolink®

-Fixation des cellules ou des coupes de cerveau au PFA 4% pendant 10 min pour les cellules ou 15min pour les tissus.

-Perméabilisation des membranes cellulaires en incubant 10 min dans du PBS 1x - triton 0.1% pour les tissus et 0.01% pour des cellules.

-Lavage au PBS 1x 3 fois pendant 5 min.

-Blocage pendant 1h à température ambiante dans le tampon de blocage (DUO 82007, Sigma-Aldrich).

-Dépôt de l'anticorps primaire dilué dans la solution Antibody diluent (DUO82008) au 1/200 (tableau anticorps, fiche technique 11).

-Incubation à 4°C pendant 24h.

-Lavage des coupes 2 fois pendant 5 min avec le tampon A (préparation selon les recommandations du fournisseur données dans le manuel : Duolink® II, Fluorescence).

-Ajout des sondes PLA (Proximity Ligation Assay) : Négative (Probe anti-Mouse Minus, DUO 92004, Sigma-Aldrich) et positive (Probe anti-Rabbit Plus, DUO 82002) diluées au 1/5 dans le diluant Antibody du kit.

-Incubation pendant 1h à 37°C en chambre humide.

-Lavage des coupes 2 fois pendant 5 min avec le tampon A.

-Dilution au 1/5 du tampon de ligation (fourni dans le kit) dans l'eau Milli-Q et dilution au 1/40 de la ligase dans le tampon de ligation dilué (1/5).

- Incubation pendant 30 min à 37°C en chambre humide.
- Lavage des coupes 2 fois pendant 2 min avec le tampon A.

- Dilution au 1/5 du tampon d'amplification (DUO82010) dans l'eau Milli-Q et dilution au 1/80 de la polymérase (DUO82028) dans le tampon d'amplification dilué (1/80).

- Incubation pendant 1h40 min à 37°C en chambre humide à l'obscurité (étape sensible à la lumière).

- Lavage des coupes 2 fois pendant 10 min avec le tampon B, puis une fois pendant 1 min avec le tampon B 0,01x (préparation selon les recommandations du fournisseur données dans le manuel : Duolink® II, Fluorescence).

- Dépôt de la solution de DAPI diluée au 1/3000 dans l'eau Milli-Q et incubation pendant 5 min en chambre humide à l'obscurité.

- Lavages 2 fois pendant 10 min avec le tampon A et rinçage à l'eau distillée, puis montage des lames de la même manière que précédemment.

- Observation des lames au microscope confocal, puis traitement des données avec le logiciel Blobfinder, Freeware obtenu auprès de l'université d'Uppsala, Suède.

Fiche technique 14 : Extraction d'ADN avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) sur tissus

-Placer 10-20 mg de tissus dans l'azote liquide et le broyer soigneusement avec un mortier et un pilon. Décanter la poudre de tissu et laisser évaporer l'azote liquide.

-Récupérer le tissu dans un tube de 1,5 mL et ajouter 180 µL de la solution ATL.

-Ajouter 20 µL de la protéinase K et vortexer. Incuber à 56°C sur la nuit, sous une petite agitation (600 rpm).

-Ajouter 200 µL de la solution AL et incuber à 72°C pendant 10min.

-Ajouter 200 µL d'éthanol pur.

-Transférer le mix dans la colonne QIAamp Mini spin placée dans un tube de collection. Centrifuger à 6000 xg pendant 1 min, éliminer le filtrat.

-Ajouter 500 µL de la solution AW1 et centrifuger à 6000 xg pendant 1 min (5424 Centrifuge, Eppendorf). Éliminer le filtrat.

-Ajouter 500 µL de la solution AW2 et centrifuger à grande vitesse (20000 xg) pendant 3 min.

-Étape optionnelle : centrifugation à grande vitesse (>11000 xg) pendant 1min pour éliminer le reste du tampon)

-Ajouter 200 µL d'eau distillée dans la colonne QIAamp Mini spin et centrifuger pendant 1min à 6000 xg pour éluer l'ADN.

-Pour optimiser la quantité d'ADN, répéter la dernière étape.

-Dosage : Cette étape se fait à l'aide un spectrophotomètre (MultiSkan Go™, Thermo Fisher Scientific) et détermine les absorbances aux longueurs d'ondes λ_{230} , λ_{260} et λ_{280} nm. Les ratio DO_{260}/DO_{280} et DO_{260}/DO_{230} permettent d'évaluer la pureté de l'ADN et doivent être compris entre 1,8 et 2. La concentration en ADN est déterminée à partir de l'absorbance à 260 nm selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon.l.C$, avec A : Absorbance, ϵ : coefficient d'absorbance moléculaire, l : trajet optique, C : concentration de l'ADN dans la solution.

Fiche technique 15 : Extraction d'ADN avec le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) sur cellules

-Dans un tube Eppendorf contenant le culot cellulaire (environ 10^6 cellules), ajouter 20 μL de la protéinase K et 200 μL de la solution AL, mixer et vortexer pendant 15s.

-Incubation pendant 10 min à 56°C .

-Ajouter 200 μL d'éthanol pur, mixer et vortexer une nouvelle fois pendant 15s.

-Transférer le mélange dans la colonne QIAamp Mini Spin placée dans un tube de collection, centrifuger à 6000 xg pendant 1 min (5424 Centrifuge, Eppendorf). Jeter le filtrat.

-Ajouter 500 μL de la solution AW1, centrifuger 1 min à 6000 xg.

-Ajouter 500 μL de la solution AW2 et centrifuger à 20 000 xg pendant 3 min.

-Étape optionnelle : faire une centrifugation à vide à grande vitesse pendant 1 min.

-Placer la colonne QIAamp Mini Spin dans un nouveau tube de 1,5mL, ajouter 200 μL d'eau distillée et incubé pendant 1min à température ambiante, ensuite centrifuger à 6000 xg pendant 1min pour éluer l'ADN.

-L'ADN élué est dosé et sa pureté est évalué (voir fiche technique 6)

Fiche technique 16 : Méthylation et Bisulfitation des échantillons

600 ng d'ADN ont été méthylés et /ou bisulfités pour optimiser le résultat

➤ Méthylation

-Dans un tube contenant 600ng d'ADN, ajouter 3 µL du tampon 10X CpG, 1,5 µL de la S-adenosylmethionine 20X, 1,5 µL de la CpG Methylase (4 unités/µL). Ajuster le volume à 30 µL avec de l'eau.

-Incuber à 30°C pendant une nuit et inactiver pendant 20 min à 65°C.

➤ Bisulfitation

-Ajout de 5 µL du réactif M-Dilution Buffer à l'échantillon contenant les 600 ng d'ADN et ensuite ajuster le volume à 50 µL avec de l'eau.

-Incuber l'échantillon pendant 15 min à 37°C.

-Ajouter 100 µL du réactif CT Conversion dans chaque tube et incuber les échantillons dans le thermocycler (Sure Cycler 8800, Agilent Technologies) suivant le programme : 95°C pendant 30s, puis 50°C pendant 1h en répétant ce cycle 16 fois. Le maintien des échantillons se fait à 4°C.

-Déposer 400 µL du tampon M-Binding dans la colonne Zymo-Spin™ IC et ajouter l'échantillon. Mélanger en inversant la colonne plusieurs fois et centrifuger à grande vitesse ($\geq 10\,000$ xg) pendant 30s.

-Ajouter 100 µL du tampon de lavage et centrifuger à grande vitesse pendant 30s.

-Ajouter 200 μL du tampon M-Desulphonation à la colonne et incuber à température ambiante pendant 15 min, ensuite centrifuger à grande vitesse pendant 30s.

-Ajouter 200 μL du tampon de lavage à la colonne et centrifuger à grande vitesse pendant 30s. Répéter cette étape une deuxième fois.

-Éluer l'ADN bisulfité dans 10 μL de tampon d'éluion.

Fiche technique 17 : Amplification par PCR et digestion enzymatique

➤ **Amplification**

L'amplification a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase Taq Platinum™ (Invitrogen)

-Dans un tube contenant 10 ng d'ADN, ajouter 2,5 µL du tampon de PCR 10X, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL des amorces sens et anti-sens 10 µM et 0,25 µL de la Taq Platinum. Ajuster le volume à 25 µL avec de l'eau.

-Conditions d'incubation : 2 min à 95°C pour l'activation de l'enzyme et la dénaturation initiale, ensuite 40 cycles d'hybridation/amplification comme suit : 30s à 95°C, 50°C pendant 30s et 72°C pendant 45s. Enfin l'élongation se fait à 72°C pendant 7min et le maintien des échantillons à 4°C.

➤ **Digestion enzymatique**

Nous avons utilisé deux enzymes de restriction : la SSPI-HF® (R3132S, New England BioLabs) qui nous a permis de vérifier la bisulfitation. Elle reconnaît les sites : 5' AAT[^]ATT 3'. La DRDI (R0530S, New England BioLabs) qui reconnaît les sites : 5' GACNNNN[^]NNGTC 3', donc qui digère les échantillons si les deux sites étudiés sont méthylés.

-Dans chaque tube contenant 5 µL de produit de PCR, ajouter 1,5 µL du tampon de l'enzyme et 0,25 µL de l'enzyme. Compléter avec de l'eau pour avoir un volume final de 15 µL.

-Conditions d'incubation : 1h à 37°C.

-La visualisation des produits clivés se fait sur un gel d'agarose de 2% et l'analyse des résultats se fait par quantification de la densité des bandes générées à l'aide du logiciel ImageJ v1.49.

Tableau 4: Amorces PCR et conditions d'utilisation

Gène	Sens de l'amorce	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (T _m)	Espèce
Ghréline site A méthylé	Sens	GAG-TGT-TTA-TTT-GGA-ATG-TTT-GGG-GA	59°C	Rat
	Anti-sens	ACA-CAA-CTA-CAC-AAC-CTC-AAA-AAC-G		Rat
Ghréline site A non méthylé	Sens	ACA-CAA-ACT-ACA-CAA-CCT-CAA-AAA-CA	59°C	Rat
	Anti-sens	GAG-TGT-TTA-TTT-GGA-ATG-TTT-GGG-GA		Rat
Ghréline site B non méthylé	Sens	AGG-AAG-TTT-TGT-GTT-TGT-TTA-TAT-TC	60°C	Rat
	Anti-sens	CCC-CAC-CCA-AAA-ATA-ACC-TC		Rat
Ghréline site B méthylé	Sens	AGG-AAG-TTT-TGT-GTT-TGT-TTA-TAT-TT	60°C	Rat
	Anti-sens	CCC-CAC-CCA-AAA-ATA-ACC-TC		Rat
Ghréline	Sens	CCA-CAG-AAG-GAA-GCT-TTT-GC	58°C	Rat
	Anti-sens	GGC-TTC-TTT-CCA-CCC-TTT-TC		Rat
Ghréline Bisulfite (Sites A et B)	Sens	TTA-TTT-GTT-AGT-TTA-TTA-TTA-GAG-TTA-TAT-AAG-AGG	50°C	Rat
	Anti-sens	AAA-CAA-AAC-CTA-ATA-TAC-TAA-AAA-ACT-ATC-CA		Rat
Ghréline non Bisulfite (Sites A et B)	Sens	TCA-CCT-GCC-AGC-CCA-CCA-CCA-GAG	60°C	Rat
	Anti-sens	CGA-GGC-AGA-GCC-TGA-TGT-GCT-G		Rat

VII-Valorisation scientifique

1-Liste des publications

-Geoffroy A, **Saber cherif L.**, Pourié G., Helle D., Umoret R., Guéant J-L., Pourié C*., Daval J-L*. (2019). Developmental impairments in a Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 973; doi:10.3390/ijms20040973

- **Saber cherif L.**, Pourié G., Daval J.L., Helle D., Guéant J.L., Beck B., Bossenmeyer-Pourié C. Persistence of the gastric mucosa inflammation in adult and old rats after fetal and early post-natal exposure to methyl donor deficiency (**Under construction, The Faseb Journal**).

-**Lynda Saber cherif**, Grégory Pourié, Andréa Geoffroy, Amélia Julien, Déborah Helle, Aurélie Robert, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Carine Bossenmeyer-Pourié *, Jean-Luc Daval*. Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus (**Accepted, International journal of molecular science**).

2- Liste des communications

- **L. SABER CHERIF**, J-L. GUEANT, J-L. DAVAL and C. BOSSENMEYER-POURIE. Poster, 12th International Conference on one carbon metabolism, B vitamins and Homocysteine: Understanding their role in health and disease from the womb to old age. Tarragona, Southern Catalonia, 9th-13th June 2019

- Effects of early methyl donor deficiency on the ontogeny and plasticity of hypothalamic networks and energy homeostasis.

L. SABER CHERIF. Oral Presentation, Commun Workshop FHU arrimage-FHU Cartage. Vandoeuvre-Lès-Nancy, France, 4th-5th April 2019.

-Effects of folates deficiency (vitamin B9) on gene and protein expression in hypothalamic cell lines.

L. SABER CHERIF, J-L. GUEANT, J-L. DAVAL and C. BOSSENMEYER-POURIE.
Poster, 3ème journée thématique de la société française de neurosciences : Advances in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. Strasbourg, 7th-8th June 2018

- Effects of early methyl donor deficiency on the ontogeny and plasticity of hypothalamic networks.

L. SABER CHERIF, J-L. GUEANT, J-L. DAVAL and C. BOSSENMEYER-POURIE.
Poster BioSE (Biology Health and Environment) Doctoral School Day. Vandoeuvre-Lès-Nancy, France,
November 2017.

Résumé

La mise en place du système nerveux central se fait à un stade précoce de la gestation et elle est suivie de sa maturation qui se poursuit après la naissance pour assurer le bon fonctionnement des circuits neuronaux. Une carence en nutriments donneurs de méthyles (vitamines B9/B12) pendant cette période entraîne des anomalies développementales, un retard de croissance et des troubles cognitifs permanents. Nous avons étudié dans un modèle de carence gestationnelle et postnatale chez le rat les conséquences potentielles sur le développement et la plasticité des réseaux hypothalamiques impliqués dans la régulation du comportement alimentaire et l'homéostasie énergétique. Nous avons également testé si une supplémentation maternelle en folate au cours de la période périnatale, cruciale pour la maturation cérébrale, peut réduire le retard de croissance associé à la carence. Les résultats ont montré que la carence durant la période gestationnelle poursuivie jusqu'au sevrage entraîne une perturbation de la mise en place des réseaux hypothalamiques et un défaut d'intégration des signaux métaboliques périphériques ainsi qu'une anomalie persistante de la muqueuse gastrique avec l'activation d'une réaction inflammatoire associée à une apoptose et un stress oxydant. Une supplémentation tardive en acide folique (3mg/kg/jour) s'est avérée bénéfique en inversant les effets de la carence.

Mots clé : Folate, glande gastrique, homéostasie énergétique, hypothalamus, plasticité synaptique.

Abstract

The formation of the central nervous system occurs at an early stage of gestation and is followed by its maturation which continues after birth to ensure the proper functioning of neural circuits. Nutritional deficiency in methyl donors (B9/B12 vitamins) during this period leads to developmental abnormalities, growth retardation and persisting cognitive impairments. We investigated in a rat model of gestational deficiency the potential consequences on the development and plasticity of the hypothalamic networks involved in the regulation of eating behavior and energy homeostasis. We also tested whether maternal folate supplementation during the perinatal period, critical for brain maturation, may reduce the deficiency-associated growth retardation. The results showed that deficiency during the gestational period until weaning induces a disruption of the formation of the hypothalamic networks and a lack of integration of the peripheral metabolic signals as well as persisting abnormalities of the gastric mucosa with the activation of inflammation, apoptosis and oxidative stress. Late supplementation with folic acid (3 mg/kg/day) appeared to be beneficial and reversed the effects of deficiency.

Key words: folate, gastric gland, energy homeostasis, hypothalamus, synaptic plasticity