



**HAL**  
open science

**Effets de la carence en vitamine B12 au niveau cérébral  
chez le modèle murin invalidé pour le gène CD320 :  
approche comportementale et mécanismes moléculaires  
de l'apprentissage hippocampo-dépendant**

Khalid Mimoun

► **To cite this version:**

Khalid Mimoun. Effets de la carence en vitamine B12 au niveau cérébral chez le modèle murin invalidé pour le gène CD320 : approche comportementale et mécanismes moléculaires de l'apprentissage hippocampo-dépendant. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0262 . tel-01822463

**HAL Id: tel-01822463**

**<https://theses.hal.science/tel-01822463>**

Submitted on 25 Jun 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

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

**Par**

**KHALID MIMOUN ELHMMALI**

**Effets de la carence en vitamine B12 au niveau cérébral chez le modèle murin  
invalidé pour le gène *CD320* : approche comportementale et mécanismes  
moléculaires de l'apprentissage hippocampo-dépendant**

**Le 18 Décembre 2017**

**Membres du jury**

**Rapporteurs :**

Mme. Veronique KEMMEL

M. Jean-Louis MILLOT

MCU-PH, Université de Strasbourg

PU, Université de Franche-Comté

**Examineurs :**

M. Jean-Louis GUEANT

Mme. Natacha DREUMONT

PU-PH, Université de Lorraine

MCU, Université de Lorraine

Co-directrice de thèse

**Membre invité:**

M. Grégory POURIE

MCU, HDR, Université de Lorraine



## Remerciements

---

Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur le professeur Jean - Louis GUEANT, directeur de l'unité Inserm U954 pour son accueil. Il m'a donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire pour ma thèse tout en fournissant le cadre nécessaire à sa réalisation. Veuillez trouver le témoin de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Dr. Grégory POURIE, directeur de thèse, Je tiens à le remercier pour son accueil, ses conseils, son calme, sa patience et sa manière de travailler avec le plus grand sérieux sans négliger la petite touche de gentillesse, qui fait avancer toute l'équipe dans les meilleures des conditions.

A Madame Natacha DREUMONT, co-directrice de thèse, Merci pour s'être engagée dans la co-direction de ce travail, pour m'avoir guidée, conseillée et enseignée les réflexes du bon chercheur. Sa passion insatiable pour la recherche est réellement transmissible et bienfaisante.

A Madame Veronique Kemmel et à Monsieur Jean-Louis Millot, rapporteurs de ma thèse, Je suis honorée qu'ils aient accepté de juger ce manuscrit de thèse. Mes plus sincères remerciements pour leur participation et pour avoir consacré une partie de leur temps, en tant que rapporteurs, à évaluer ce travail.

A Monsieur le docteur Jean-marc Alberto, Un grand merci pour son aide, sa disponibilité et ses conseils. Son intelligence et sa vision pour la recherche plus que motivantes m'ont permis d'acquérir énormément.

Je tiens à remercier également les techniciens et les membres de l'unité Inserm U954. Merci pour leur accueil exemplaire de chaleur et de sympathie et pour avoir contribué à la bonne ambiance quotidienne.

A ma famille, ma femme, mes enfants (*Mohammed, Mimoun, Aisha, Abdulmalik, Hassan, Safoan*), et mes frères qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans mes études. Mille mercis, vous êtes mon bonheur, sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	1
LIST DES FIGURES ET TABLEAUX .....	3
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE .....	8
CHAPITRE I : FOLATES, VITAMINE B12 ET HOMOCYSTEINE .....	9
I.1. Les folates ou vitamine B9.....	9
I.1.1. Métabolisme des folates .....	10
I.1.2. Les apports nutritionnels journaliers conseillés.....	10
I.2. Vitamine B12 .....	11
I.2.1. Découverte de la vitamine B12 .....	11
I.2.2. Structure de la vitamine B12 .....	11
I.2.3. Sources alimentaires de vitamine B12.....	12
I.2.4. Les apports nutritionnels journaliers conseillés.....	13
I.2.5. Métabolisme de la vitamine B12 .....	13
I.2.6. Rôle de la vitamine B12 dans le métabolisme des monocarbones.....	16
I.2.7. Etiologies de la carence en vitamine B12.....	17
I.2.8. Les maladies rares du métabolisme de la B12.....	18
I.2.9. Manifestations biologiques et cliniques du déficit en vit B12.....	20
I.3. Homocystéine.....	21
I.3.1. L'histoire de la découverte de l'homocystéine.....	21
I.3.2. Métabolisme de l'homocystéine : .....	22
I.3.3. Les facteurs conduisant à l'hyperhomocystéinémie .....	24
I.3.4. Pathologies associées à l'homocystéine .....	25
CHAPITRE II : L'APPRENTISSAGE ET LA MEMOIRE .....	27
II.1. Neuroanatomie de l'hippocampe.....	27
II.2. Neuroanatomie du Cortex Préfrontal .....	30
II.3. Les différents types de mémoire.....	32
II.4. Rôle des récepteurs glutamatergiques dans la memorization .....	34
II.5. La plasticité synaptique .....	35
II.6. La superfamille des récepteurs nucléaires .....	37
II.7. Les Glucocorticoïdes .....	38
II.7.1. Biosynthèse des glucocorticoids.....	39
II.7.2. Les récepteurs aux glucocorticoïdes : .....	40
II.7.3. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes .....	41
II.7.4. Régulation des glucocorticoïdes.....	43
II.7.5. L'impact des glucocorticoïdes sur la mémoire.....	44

II.7.6. Impact des Glucocorticoïdes sur la plasticité hippocampique:.....	45
II.8. La souris comme modèle génétique pour la carence en vitamine B12 .....	46
CHAPITRE III : OBJECTIFS DE TRAVAIL .....	47
CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES .....	49
IV.1. Modèle animal.....	50
IV.1.1. Les animaux .....	50
IV.1.2. Conditions d'élevage.....	50
IV.1.3. Prélèvement et traitement d'organes (Fiche 1).....	51
IV.2. Génotypage par PCR (Fiche 2) .....	51
IV.3. Profile biochimique.....	52
IV.3.1. Mesure de la concentration en protéines (Fiches 3 &4) .....	52
IV.3.2. Electrophorèse et immunoblot (Fiche 5 &6) .....	53
IV.3.3. Marqueurs nutritionnels et métabolites (Fiche 7,8 &9).....	53
IV.4. Analyses comportementales (Fiche 11) .....	55
IV.4.1. LABYRINTHE AQUATIQUE MULTI-T.....	55
IV.4.2. Le test de l'open field (L'espace ouvert ouverte).....	56
CHAPITRE V : RESULTATS.....	57
V.1. Caractérisation biochimique du modèle : concentrations en vitamines B9, B12, de l'homocystéine et des déterminants de son métabolisme dans l'hippocampe.....	58
V.2. Les souris KO enregistrent des performances cognitives inférieures aux contrôles, mais un stress modéré normalise les performances. ....	60
V.3. L'expression du récepteur des glucocorticoïdes (GR) est légèrement réduite chez les KO... 64	
V.4. La plasticité neuronale implique des protéines clés conduisant à des effecteurs en aval au niveau de la synapse .....	66
V.5. Mesure de l'expression des protéines clés de la synapse dans le cortex préfrontal.....	69
CHAPITRES VI : DISCUSSION .....	71
VI.1. Le récepteur de la transcobalamine dans le cerveau et les conséquences sur le métabolisme des monocarbone tissulaire : .....	73
VI.2. Certains marqueurs comportementaux sont affectés par la diminution du taux de vitamine B12 tissulaire : .....	74
VI.3. Un stress modéré peu influencer positivement l'apprentissage hippocampo-dépendant : ....	76
REFERENCES.....	82

# LIST DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1: structure chimique de l'acide folique .....	9
Figure 2: Structure de la vitamine B12 (cobalamine) .....	12
Figure 3: Mécanisme d'absorption et de transport de la vitamine B12. ....	15
Figure 4: le transport intracellulaire de la B12.....	16
Figure 5: Métabolisme de l'homocystéine: .....	23
Figure 6: L'hippocampe de rat : .....	28
Figure 7: Schéma présentant le circuit de Papez.....	29
Figure 8: Schéma présentant l'organisation histologique du néocortex humain .....	31
Figure 9: Le Modèle "serial-parallel-independent" (SPI).....	34
Figure 10: Mécanismes d'action de la LTP (long-term potentiation).....	35
Figure 11: Biosynthèse des glucocorticoïdes .....	39
Figure 12 : Schéma de la structure générale des récepteurs des glucocorticoïdes. ....	40
Figure 13: Les mécanismes génomiques et non géomiques du récepteur des glucocorticoïdes . .....	43
Figure 14: schéma représentant le génotypage des souris CD320.....	52
Figure 15: Schema du labyrinthe aquatique multi-T (Learning protocole 1.....	55
Figure 16: Représentation schématique du Protocole CD320/cortisol. ....	56
Figure 17: Concentrations en vitamines B9 et B12 dans l'hippocampe. ....	58
Figure 18: Analyse des principaux métabolites dans les tissus de l'hippocampe.....	59
Figure 19: Principaux paramètres obtenus dans le test du labyrinthe aquatique. ....	60
Figure 20: Les paramètres principaux obtenus dans le test d'évitement passif des chocs electriques .....	61
Figure 21: Les paramètres principaux obtenus dans le test du labyrinthe aquatique.....	62
Figure 22: L'évaluation des indicateurs de stress : .....	63
Figure 23: La forme générale de la zone CA1 .....	64
Figure 24: Expression et localisation du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans les extraits et les coupes d'hippocampes de souris. ....	65
Figure 25: Expression et localisation des protéines clés de la voie des GR dans les extraits et les tranches d'hippocampes de souris. ....	68
Figure 26: Analyse par western-blot de l'expression des protéines PRMT-1 dans l'hippocampe des souris femelles et mâles.....	69

Figure 27: Analyse par western-blot de l'expression des protéines impliquées dans la plasticité neu-ronale le cortex préfrontal des souris CD320.....	70
Figure 28 : Modèle schématique de la régulation mécaniste de la plasticité synaptique en cas de carence en B12 dans le cerveau.....	81
Tableau 1: Apports nutritionnels journaliers conseillés de la population française pour la vita B12.	13
Tableau 2: Solutions pour la préparation des gels de séparation ( solution d'acrylamide à 30%) .....	110
Tableau 3: Solutions pour la préparation des gels de Concentration ( solution d'acrylamide à 30%)	111
Tableau 4: Anticorps primaires utilisés en Western blot.....	112
Tableau 5: Anticorps secondaires utilisés en Western blot.....	112
Tableau 6: Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.....	120
Tableau 7: Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence .....	120

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Vit B9** : Vitamine B9  
**Vit B12** : Vitamine B12  
**pABA** : Acide *p*-amino-benzoïque  
**FGCP** : Folylpoly- $\gamma$ -glutamate carboxypeptidase  
**5,10-MTHF** : 5,10-Méthylène tétrahydrofolate  
**5,10-MTHFR** : 5,10-Méthylène tétrahydrofolate reductase  
**5-méthyl THF** : 5-Méthyltétrahydrofolate  
**Ado-Cbl** : Adénosylcobalamine  
**OH-Cbl** : Hydroxycobalamine  
**GS-Cbl** : Glutathionylcobalamin  
**CN-Cbl** : Cyanocobalamine  
**HC** : Haptocorrine  
**TC** : Transcobalamine  
**HCl** : Acide chlorhydrique  
**TCII** : Transcobalamine II  
**MUT** : Méthyl- malonyl-CoA mutase  
**MS** : Méthionine synthase  
**MMCoA** : Méthylmalonyl-CoA  
**MS** : Méthionine synthase  
**MT** : Méthyltransférase  
**MMA** : Méthylmalonique  
**ScoA** : Succinyl-CoA  
**N5-MeTHF** : N5- méthyltétrahydrofolate  
**5'-UTR** : 5'untranslated region  
**Cyl** : Cystathionine- $\gamma$ -lyase  
**AC** : Adénylate cyclase  
**Ad4BP** : Adrenal 4-binding protein  
**ANOVA** : Abreviations analysis of variance  
**AF1** et **AF2** : Activation function 1 and 2  
**ANT** : Adenine Nucleotide Transporter  
**BCA** : Acide bicinchoninique  
**BDNF** : Brain-derived neurotrophic factor  
**BET** : Bromure d'éthidium  
**BHMT** : Bétaïne homocystéine méthyltransférase  
**BSA** : Bovin Serum Albumin  
**CA1** : Corne d'ammon 1  
**CBS** : Cystathionine-béta-synthase  
**CBP** : CREB Binding Protein  
**CREB** : cAMP Response Element Binding protein  
**DAPI** : 4',6'-Diamidino-2-phénylindole  
**DBD** : Domaine de liaison à l'ADN

**DHF** : Dihydrofolate  
**DHT** : Dihydrotestostérone  
**DOC** : Deoxycholate de sodium  
**dTMP** : Désoxythymidine 5'-monophosphate  
**DTT** : Dithiothreitol  
**dUMP** : Désoxyuridine 5'-monophosphate  
**ERE** : estrogen response element  
**FI** : Facteur intrinsèque  
**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase  
**GSH** : Gluthation  
**HCY** : Homocystéine  
**HERP** : Homocystéine-inducible Endoplasmic Reticulum stress Protein  
**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Performance  
**LBD** : Domaine de liaison au ligand  
**LC-MS/MS**: Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry  
**MA** : Maladie d'Alzheimer  
**MAPK** : mitogen-activated protein Kinase  
**MAT** : Méthionine adénosyltransferase  
**NAD** : nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADP** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**PBR** : Récepteur périphérique des benzodiazépines  
**PMSF** : Phenylmethylsulfonyl fluoride  
**PVDF** : Polyvinylidene difluoride  
**RIPA**: Radioimmunoprecipitation Assay  
**SAH**: S-adénosylhomocystéine  
**SAHH**: S-adénosylhomocystéine hydrolase  
**SAM**: S-adénosylméthionine  
**SDS**: Sodium dodecyl sulfate  
**SF-1**: Steroidogenic factor 1  
**SNC** : Système nerveux central  
**SVZ** : Zone sub-ventriculaire  
**SGZ** : Zone sous-granulaire  
**TBE** : Tampon Tris – Borate – EDTA  
**TCII** : Transcobalamine II  
**THF** : Tétrahydrofolate  
**VMH** : Ventro-médiale de l'hypothalamus  
**MCV** : Maladies cardiovasculaires  
**Hhcy** : Hyperhomocystéinémie  
**DTT** : Dithiotreitol  
**MA** : Maladie d'Alzheimer  
**Hipp** : Hippocampe (Hipp)  
**HD** : Hippocampe dorsal  
**HV** : Hippocampe ventral  
**GD** : Gyrus denté  
**Sub** : Subiculum  
**CRH** : Corticotropin-releasing hormone  
**CPF** : Cortex préfrontal

**M1** : Cortex moteur primaire  
**SPI** : Serial-parallel-independent  
**NMDA** : N-methyl-D-aspartate)  
**AMPA** : Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique  
**CREB** : C-AMP Response Element-binding protein  
**LTP** : Potentiation à long-terme  
**NRs** : Récepteurs nucléaires  
**RARs** : Retinoic Acid Receptors  
**PPARs** : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  
**TRs** : Thyroid Receptors)  
**VDR** : Vitamin D Receptor  
**RXRs** : Retinoid X Receptors  
**HNF-4** : Hepatic Nuclear Factor-4  
**ERs** : Estrogen Receptors  
**ERRs** : Estrogen-Related Receptors  
**GR** : Glucocorticoïde récepteur  
**MR** : Mineralocorticoid receptor  
**PR** : Progesterone Receptor  
**AR** : Androgen Receptor  
**NGFIB** : Nerve Growth Factor IB  
**NURR1** : NUclear Receptor Related 1  
**NOR1** : Neuron-derived Orphan Receptor 1  
**SF1** : Steroidogenic Factor 1  
**LRH-1** : Liver Receptor Homolog-1  
**GCNF** : Germ Cell Nuclear Factor-like  
**GC** : Glucocorticoïdes  
**Hsp** : Protéines de choc thermique  
**GRIP-1** : GR interacting protein 1  
**PCAF** : P300/CBP associated factor  
**SRC-1** : Steroid receptor coactivator 1  
**HDAC** : Histone deacetylase  
**NF-KB** : Nuclear Factor KB  
**AP-1** : Activating Protein-1  
**HPA** : Hypothalamic pituitary adrenal  
**CRH** : Corticotropin releasing hormone  
**POMC** : Pro-opiomélanocortine  
**ACTH** : Adrenocorticotropic hormone  
**AVP** : Arginine vasopressine  
**NPV** : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
**TCbIR** : Transcobalamin cobalamin recepteur  
**CRE** : Elément de réponse à l'AMPc

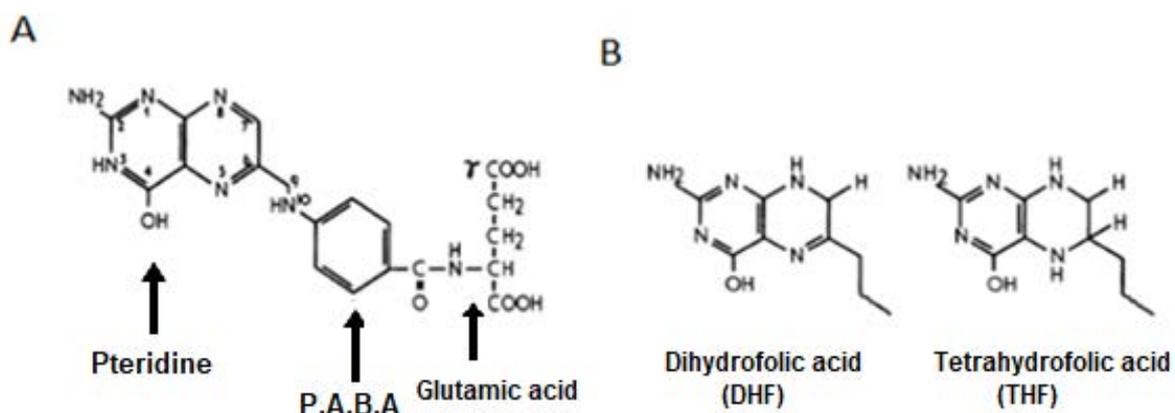
## **CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE**

# CHAPITRE I : FOLATES, VITAMINE B12 ET HOMOCYSTEINE

## I.1. Les folates ou vitamine B9

La vitamine B9, également appelée folate, est une vitamine hydro-soluble. Elle se compose de trois éléments principaux : une molécule d'acide *p*-amino-benzoïque (*p*ABA), une base ptéridine (2-amino-4-hydroxy-méthylptéridin) et une ou plusieurs molécules d'acide glutamique. La molécule de folate peut varier dans sa structure grâce à la réduction de la fraction de ptéridine en dihydrofolate (DHF) et en tétrahydrofolate (THF), à l'allongement de la chaîne du glutamate, au remplacement de l'unité 1-C à l'extrémité N-5 ou N-10, ou bien aux deux positions (Figure 1) ; (Shinton 1972; Clarke *et al.* 2008).

L'acide folique, qui se produit rarement dans la nature, est la forme de monoglutamates entièrement oxydée du folate et il est largement utilisé dans l'enrichissement des aliments ainsi que dans la supplémentation en raison de sa stabilité chimique. Les formes réduites, l'acide dihydrofolique (DHF) et l'acide tétrahydrofolique (THF) avec des dérivés méthyl, méthylène, formyl-THF, sont biologiquement actives. Les polyglutamates (PG) sont les formes naturelles (folates alimentaires) alors que les formes pharmacologiques stables sont l'acide folique et l'acide folinique (Navarra 2004).



**Figure 1:** structure chimique de l'acide folique. (A) la molécule de l'acide folique est composée de trois parties distinctes : un noyau ptéridine lié à un acide para-aminobenzoïque (*p*ABA) sur lequel s'articule une chaîne de glutamate dont le nombre de résidus varie de 1 à 14. (B) les formes réduites des folate (Shinton 1972).

### **I.1.1. Métabolisme des folates**

Dans les aliments, le folate est en majorité présent sous forme de polyglutamates. Dans le jéjunum proximal et au niveau de la bordure en brosse des entérocytes de l'intestin grêle, la folylpoly- $\gamma$ -glutamate carboxypeptidase (FGCP) hydrolyse les polyglutamates alimentaires en monoglutamates qui sont ensuite absorbés par des mécanismes actifs et passifs. Après leur absorption, les monoglutamates sont réduits d'abord en DHF puis en THF. Les deux réactions utilisent le NADPH comme cofacteur et sont respectivement catalysées par l'enzyme folate et dihydrofolate réductase (DHFR). Le THF est ensuite méthylé en 5,10- méthylène-THF (5,10-MTHF) grâce à la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) puis enfin réduit en 5-méthyltétrahydrofolate (5-méthyl THF) par la 5,10- méthylènetétrahydrofolate réductase (5,10-MTHFR) (Forges *et al.* 2008).

Pour intégrer le cycle des folates, le 5-méthyl THF doit être déméthylé. Ce donneur de groupement méthyl jouera un rôle fondamental dans la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine, grâce à deux enzymes : la méthionine synthase (MS) et son cofacteur la vitamine B12, ainsi que la bêtaïne homocystéine méthyltransférase (BHMT) (Hubner *et al.* 2007). Le foie et les reins peuvent également utiliser la bêtaïne (BET) en tant que donneur de méthyl pour régénérer de la méthionine par l'intermédiaire de la BHMT (Coşar *et al.* 2014).

La plupart de l'acide folique est réabsorbé au niveau des tubules rénaux proximaux. Une petite quantité de folate alimentaire est excrétée dans l'urine (Herbert 1994).

### **I.1.2. Les apports nutritionnels journaliers conseillés**

Les corps des mammifères ne peuvent pas synthétiser l'acide folique de novo. Ce composé doit être fourni dans l'alimentation soit dans les formes naturelles réduites (légumes verts feuillus, le foie, les fruits et les graines), soit par la supplémentation et la fortification sous la forme d'acide folique (forme synthétique) (Castellanos-Sinco *et al.* 2015). Les taux plasmatiques des folates sont de 5 à 15  $\mu\text{g/L}$ . Le contenu du corps en acide folique est estimé entre 15 et 30 mg (EFSA 2006). En Europe, les apports nutritionnels journaliers conseillés en acide folique sont environ de 400  $\mu\text{g/jour}$  chez l'adulte. Cette valeur augmente jusqu'à 600  $\mu\text{g/jour}$  chez les femmes qui planifient une grossesse, et devient 500  $\mu\text{g/jour}$  pendant l'allaitement (Stover 2008).

## **I.2. Vitamine B12**

### **I.2.1. Découverte de la vitamine B12**

L'histoire de la découverte de cette vitamine est en relation avec les efforts pour traiter l'anémie pernicieuse. Selon Combe (1822), cette maladie mortelle est liée à un dysfonctionnement du système digestif. Plus tard en 1849, Combe et Addison décrivaient les symptômes cliniques d'anémie pernicieuse. Jusqu'au début du XXe siècle, cette maladie était incurable. Bien que la vitamine B<sub>12</sub> n'ait pas fait l'objet d'une attention particulière pendant le début du XXe siècle, au milieu des années 20, George Whipple (pathologiste et chercheur biomédical américain) a effectué des expériences sur des chiens atteints par l'anémie. Il a découvert qu'un régime contenant du foie cru ou d'autres tissus animaux pouvait conduire à la guérison de l'anémie. En 1926, George Minot et William Murphy ont montré que les patients souffrant d'anémie pernicieuse voyaient des améliorations remarquables quand ils adoptaient le régime du foie cru. Minot, Murphy et Whipple ont reçu le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1934 pour la découverte du facteur antipernicieux (Ball 1998).

En 1948, Karl Folkers et ses collègues ont isolé un composé cristallin rouge du foie et ont nommé ce composé, la vitamine B<sub>12</sub>. Ainsi, la vitamine B<sub>12</sub> fut largement étudiée durant les décennies suivantes. En 1956, la structure chimique tridimensionnelle de l'adénosyl-vitamine B<sub>12</sub> a été élucidée par Hodgkin et collaborateurs. Il a reçu le prix Nobel de chimie en 1964 (Gray 1955).

### **I.2.2. Structure de la vitamine B12**

La vitamine B<sub>12</sub>, également connue sous le nom de cobalamine (Cbl), est une molécule organométallique hydrosoluble ayant une masse moléculaire de 1356 g/mol.

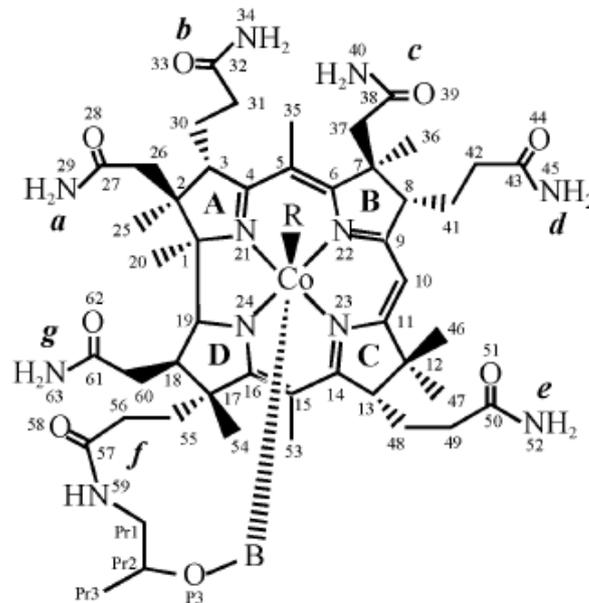
La molécule est constituée d'un noyau corrine central presque plan, qui contient quatre ligands sur l'ion cobalt central. Elle comporte deux chaînes axiales. L'une est en position  $\alpha$  (en-dessous) avec un groupement pseudo-nucléotidique (diméthylbenzimidole-ribose-phosphate) dont le groupe imidazole est relié au cobalt et dont le phosphate est relié à l'un des noyaux pyrroles. L'autre chaîne, en position  $\beta$  (au-dessus), est occupée par un radical anionique variable R.

La nature et la fonction physiologique de la vitamine B<sub>12</sub> est déterminée par les ligands occupant la position axiale supérieure de la molécule (Brown 2005).

Les principales formes identifiées dans les tissus des mammifères sont : la méthylcobalamine (Me-Cbl) et l'adénosylcobalamine (Ado-Cbl), qui agissent comme des cofacteurs, et

l'hydroxycobalamine (OH-Cbl), le glutathionylcobalamine (GS-Cbl), qui sont des intermédiaires. Dans la plupart des tissus, Ado-Cbl est prédominant par rapport à Me-Cbl (Thakkar & Billa 2015).

La cyanocobalamine (CN-Cbl) est formée quand un ion cyanure est attaché à l'atome de cobalt. Ce composé est la forme stable produite industriellement (Kräutler & Kr 2005).



**Figure 2:** Structure de la vitamine B12 (cobalamine). La vitamine B<sub>12</sub> est composée d'un noyau corrine formé d'un atome de cobalt central relié à quatre noyaux pyrroles (A, B, C, D) et deux chaînes axiales, l'une en position  $\alpha$  avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole et l'autre un radical anionique variable R en position  $\beta$  qui détermine le nom du composé vitaminique (Brown 2005).

### I.2.3. Sources alimentaires de vitamine B12

La vitamine B<sub>12</sub> n'est synthétisée que par des microorganismes. Elle n'est pas présente dans les aliments d'origine végétale et se trouve principalement dans les produits d'origine animale. Les aliments riches en vitamine B<sub>12</sub> sont la viande, les abats (foie, rognons), la volaille, le poisson, les crustacés, les fruits de mer, les produits laitiers et les œufs. Les algues vertes (aonori, laitue de mer), rouges (dulse, nori) et la spiruline (une micro-algue), sont également une bonne source. (Watanabe 2007).

#### I.2.4. Les apports nutritionnels journaliers conseillés

Le besoin physiologique en vitamine B<sub>12</sub> est extrêmement faible. Selon le régime alimentaire, les apports conseillés quotidiens pour les adultes varient de 2 à 2,8 µg par jour. Le tableau I résume les apports nutritionnels recommandés *selon les tranches d'âge* des individus et les conditions physiologiques (AFSSA 2001).

**Tableau 1: Apports nutritionnels journaliers conseillés de la population française pour la vita-mine B12 (µg/jour).**

Catégorie	Apports nutritionnels conseillés en vitamine B <sub>12</sub> en microgrammes (µg/jour)
Enfants de 1 à 3 ans	0,8
Enfants de 4 à 6 ans	1,1
Enfants de 7 à 9 ans	1,4
Enfants de 10 à 12 ans	1,9
Adolescents de 13 à 15 ans	2,3
Adolescents de plus de 16 ans et adultes	2,4
Femmes enceintes	2,6
Femmes allaitantes	2,8

Environ la moitié de l'excédent en vitamine B<sub>12</sub> est stockée dans le foie. Chez l'adulte, la réserve hépatique varie entre 2 et 5 mg, ce qui est suffisant pour 3 à 5 ans (National Academy of Sciences, 2000).

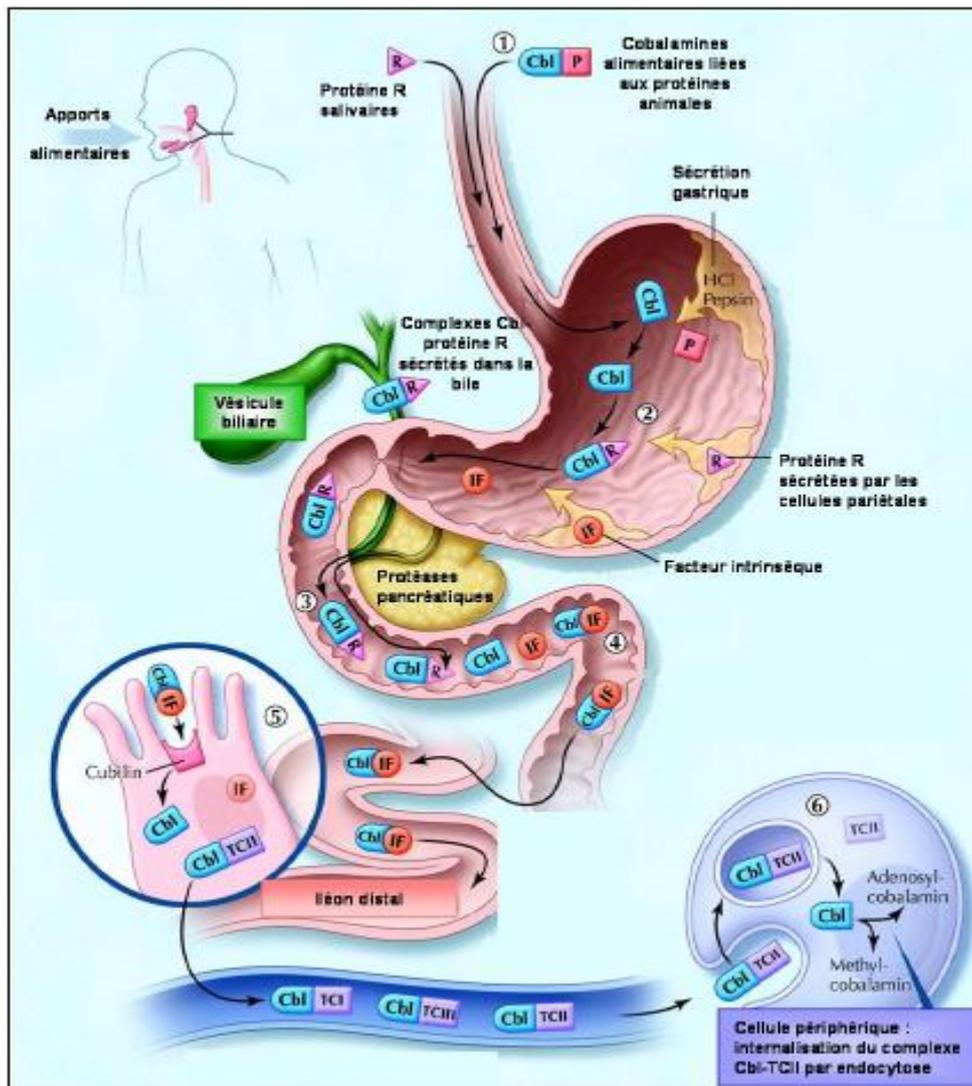
#### I.2.5. Métabolisme de la vitamine B12

La vitamine B<sub>12</sub> est liée à trois protéines : l'haptocorrine (HC, ou protéines R), le facteur intrinsèque (FI) et la transcobalamine (TC) qui l'achemine dans les liquides extracellulaires. Après l'ingestion de nourriture, la vitamine B<sub>12</sub> libérée des nutriments sous l'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique (HCl) se lie à l'haptocorrine, d'origine salivaire et gastrique (Figure 3 ; dans l'intestin, la vitamine B<sub>12</sub> est libérée de la HC par les protéases pancréatiques. La vitamine B<sub>12</sub> se lie alors avec une haute affinité au facteur intrinsèque (FI), une glycoprotéine de 45 kDa qui est résistante aux protéases, et sécrétée par les cellules pariétales dans le fundus et le cardia de l'estomac. Le complexe FI-Cbl traverse le jéjunum vers l'iléon distal où il est fixé sur des récepteurs membranaires spécifiques multi-ligands, situés sur les microvillosités des entérocytes de l'iléon appelé cubam (Quadros 2010).

Le récepteur Cubam est constitué de deux molécules : la cubiline, une protéine périphérique de 460 kDa (codée par le gène *CUBN*, chromosome 6) et amnionless, une protéine transmembranaire de 45-50 kDa (codée par le gène *AMN*, chromosome 7), (Pedersen *et al.* 2010). Ce récepteur possède une affinité élevée pour le complexe FI-Cbl, mais il ne se lie pas à la cobalamine, au FI seule (Quadros 2010).

Le cubam est essentiel au transport du complexe FI-Cbl à partir de la lumière intestinale vers l'intérieur de l'entérocyte. La protéine transmembranaire est co-exprimée conjointement avec la cubiline dans les épithéliums polarisés, en particulier dans les reins, les intestins et la vésicule ombilicale (Namour *et al.* 2011).

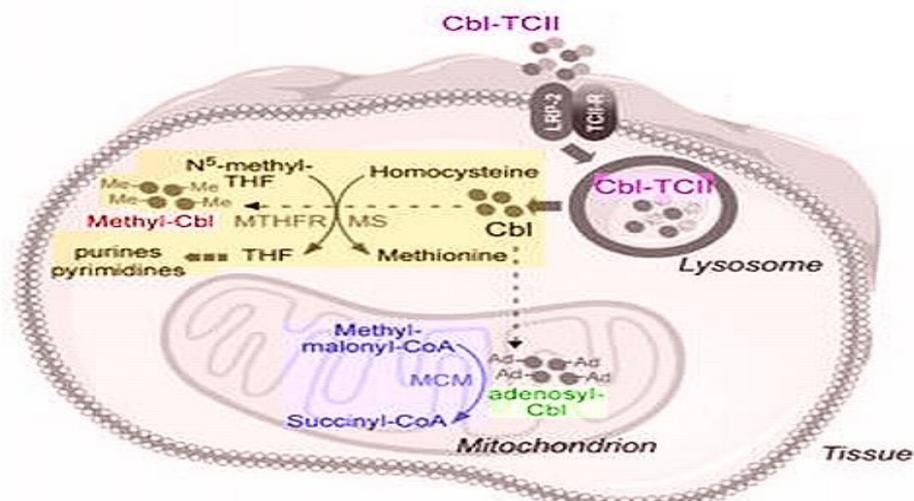
Après l'endocytose, le FI est dégradé et la vitamine apparaît dans le sang, principalement liée à la transcobalamine II (TCII), protéine porteuse de 38 kDa synthétisée dans plusieurs tissus (Quadros *et al.* 1999). Le complexe Cbl-TC II est capté par les cellules hépatique et autres organes par le récepteur d'endocytose CD320, protéine transmembranaire présente à la surface cellulaire de tous les tissus (Quadros *et al.* 2009).



**Figure 3:** Mécanisme d'absorption et de transport de la vitamine B12. La nourriture B12 est libérée dans l'estomac et se lie aux HC salivaires. Dans l'intestin grêle, les aliments B12 et B12 biliaries sont libérés des HC par les protéases pancréatiques et se lient au facteur intrinsèque (IF). Le complexe IF-B12 se lie ensuite au récepteur Cubilin [Cub] dans l'iléon terminal pour l'internalisation et la libération dans le plasma où il est lié par TC. Cbl : cobalamine ; R : haptocorrine IF : facteur intrinsèque ; TC2 : transcobalamine II (Andrès *et al.* 2004).

La libération de la cobalamine dans le cytoplasme suite à la dégradation lysosomale de la TC II est une étape obligatoire pour le métabolisme intracellulaire de la cobalamine.

Dans le cytoplasme, la cob(III)alamine (la forme la plus oxydée de la cobalamine) doit être convertie séquentiellement en cob(II)alamine et en cob(I)alamine par deux réductases. Plus de 95% de la cobalamine intracellulaire est liée à deux enzymes intracellulaires : la méthyl-malonyl-CoA mutase (MUT) et la méthionine synthase (MS) (Michael Whitehead 2006).



**Figure 4:** le transport intracellulaire de la B12. Le complexes Cbl-TCII est internalisé par endocytose et après libération dans la cellule, B12 est réduite et convertie en adénosylcobalamine dans les mitochondries et méthylcobalamine dans le cytosol, où ils servent de cofacteurs pour les 2 réactions dépendantes de B12 (Serraj *et al* 2009).

Le foie contient la majorité des stocks de vitamine B12 de l'organisme qui sont de l'ordre de 2 à 5 mg. Il existe un cycle entéro-hépatique avec une réabsorption très efficace. Ce stockage et la faiblesse des besoins journaliers expliquent la rareté des signes cliniques en cas de carence d'apport isolée (Ermens & Vlasveld 2003).

### I.2.6. Rôle de la vitamine B12 dans le métabolisme des monocarbone

Bien qu'il existe différentes formes de la vitamine B12, chez l'Homme, seulement deux formes, la méthylcobalamine et la 5'déoxyadénosylcobalamine, fonctionnent comme des coenzymes et jouent un rôle important dans le métabolisme.

- **Désoxyadénosylcobalamine (AdoCbl)**

L'Ado-Cbl est le cofacteur de l'enzyme méthylmalonyl-CoA mutase (MUT, EC 5.4.99.2), qui se trouve dans la matrice mitochondriale de la plupart des tissus des mammifères. A ce niveau, le catabolisme de certains acides aminés ramifiés (l'isoleucine, la valine, la méthionine, la thréonine), de la thymine, des acides gras à nombre impair de carbone, du cholestérol conduit à formation d'une molécule de propionyl-CoA (Moreno-Garcia *et al.* 2013). Ce dernier est

carboxylé sous l'action de la propionyl-CoA carboxylase pour être converti en D-méthylmalonyl-CoA (MMCoA), qui est soit converti en son isomère, le L-méthylmalonyl-CoA, soit hydrolysé en acide méthylmalonique (MMA) par la D-méthylmalonyl-CoA hydrolase.

La L-méthylmalonyl-CoA est converti en succinyl-CoA (ScoA) par l'enzyme MUT avec l'Ado-Cbl comme cofacteur. Le ScoA peut être recyclé dans le cycle de Krebs, utilisé pour la biosynthèse de l'hème, ou pour la néoglucogenèse dans le foie (Takahashi-Iñiguez *et al.* 2012).

- **Méthylcobalamine**

Dans la cellule, la synthèse de méthylcobalamine s'est produit dans le cytoplasme, (Rutsch *et al.* 2009). La Me-Cbl est le cofacteur de la méthionine synthase (MS). Cette dernière catalyse le transfert d'un groupe méthyl à partir du N5- méthyltétrahydrofolate (N5-MeTHF), un métabolite de l'acide folique, vers l'homocystéine pour former la méthionine et pour la régénération du tétrahydrofolate (THF) (Marsh 1999).

La méthionine est ensuite convertie en SAM. Cette dernière est nécessaire pour les réactions biologiques de méthylation, y compris la synthèse de la créatine, des phospholipides et des neurotransmetteurs, ainsi que la méthylation de l'ADN, l'ARN et des protéines. La carence en vitamine B12 entraîne une accumulation du N5-MeTHF ce qui induit une diminution du THF et donc une réduction de la synthèse de thymidylate nécessaire à la synthèse d'ADN (Takahashi-Iñiguez *et al.* 2012).

### **I.2.7. Etiologies de la carence en vitamine B12**

Les étiologies principales de la carence en vitamine B12 sont : un apport nutritionnel insuffisant, le syndrome de malabsorption intestinale et des interventions médicales (Andrés *et al.* 2005). Parmi les causes de risque de carence en vitamine B12 chez les adultes et les enfants, on retrouve une consommation insuffisante d'aliments d'origine animale ou de produits laitiers (Da Silva *et al.* 2014). Le nourrisson né de mère déficient en vitamine B12 présente le risque de naître avec une carence en vitamine B12. (Langan & Zawistoski 2011).

L'anémie pernicieuse (maladie de Biermer) est une maladie auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre le FI, entraînant une atrophie idiopathique de l'épithélium gastrique (Zulfiqar *et al.* 2012). chez l'adulte, cette maladie représente de 20 à 50% des causes de carence en vitamine B12 (Stabler 2013).

La malabsorption légère peut être due à la difficulté à libérer la vitamine B12 des protéines associées et de degrés variables de gastrite atrophique (O'Leary & Samman 2010). Parmi les principales causes d'une carence en vitamine B12 sont les maladies chroniques intestinales (rectocolite hémorragique, maladie cœliaque, maladie de Crohn). Certains médicaments tels que oxyde nitrique, la metformine contribuent à diminuer l'absorption et le métabolisme de la vitamine B12, ce qui exacerbe les symptômes chez les patients déficients en vitamine B12 (Namour *et al.* 2011).

### **I.2.8. Les maladies rares du métabolisme de la B12**

Plusieurs anomalies génétiques ont été identifiées qui affectent l'absorption, le transport ou la synthèse cellulaire de la cobalamine. Ces défauts sont transmis sur le mode autosomique récessif. Ces maladies généralement détectées au cours des premières années de vie par des anomalies hématologiques, des difficultés d'alimentation, un retard staturo-pondéral et une atteinte neurologique (Boulat *et al.* 2012).

#### **a) Déficience du facteur intrinsèque :**

La déficience en facteur intrinsèque congénital est une maladie rare de l'absorption de la vitamine B12 due à l'absence ou à la non fonctionnalité du facteur intrinsèque (Tanner *et al.* 2012). Des mutations du gène *GIF* peuvent réduire la production de ce facteur, diminuer son affinité pour la vitamine B12 ou même augmenter sa sensibilité à la protéolyse (García Jiménez *et al.* 2008).

L'absence du facteur interne entraîne une absorption insuffisante de la vitamine B12 (moins de 1%) (Solomon 2007). Ceci conduit à une diminution du niveau de cobalamines plasmatiques disponibles pour la synthèse d'Adénosyl Cobalamine et de Méthyl Cobalamine et conséquence réduire de l'activité enzymatique de *Mut* et de MS. Cette maladie se caractérise par une hyperhomocystéinémie, une anémie mégalo-blastique, des perturbations neurologiques. (Orozco-Barrios *et al.* 2009). Dix mutations du gène *GIF* sur le chromosome 11q12.1 ont été identifiées tels que la mutation c.290C>T (p.M97T) qui entraîne une réduction de l'affinité du FI pour la vitamine b12 et la mutation c.435-437delGAA (p. K145-N146delinsN) qui conduit à une diminution de la capacité de liaison de la vitamine b12. Le traitement de cette maladie consiste des injections intramusculaires hebdomadaires ou mensuelles d'hydrox cobalamine ou de cyanocobalamine, jusqu'à la récupération complète des réserves en cobalamine ( Guéant *et al.* 2013).

### **b) Imerslund-Gräsbeck (IGS) :**

Le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck (IGS) ou malabsorption sélective de la vitamine B12 est une cause rare de carence en vitamine B12 qui se transmet selon un mode autosomique récessif. Cette maladie est causée par des mutations sur le gène de l'AMN ou CUBN gènes qui code pour amnionless ou de la cubiline protéines, respectivement (Altay *et al.* 1995; Gueant *et al.* 2014). Ces mutations conduisent à une diminution de l'activité de liaison du récepteur spécifique au complexe Cbl-FI et une réduction de l'affinité pour ce complexe. Le syndrome d'Imerslund-Gräsbeck a d'abord été décrit en Norvège et en Finlande dans quelques familles. L'âge de l'apparition de l'IGS peut aller de la petite enfance (4 mois après la naissance) à l'enfance (Gräsbeck 2006; Solomon 2007).

Les symptômes de cette maladie comprennent un retard de croissance, une anémie mégalo-blastique, une protéinurie légère est présente chez la moitié des malades, des anomalies anatomiques dans les voies urinaires, des infections fréquentes et des dommages neurologiques (Watkins *et al.* 2011). Le traitement de cette maladie comprend des injections intramusculaire de 1 mg de l'HOCbl ou de CNCbl d'une façon journalière jusqu'au rétablissement complet des réserves en vitamine B12 (Guéant *et al.* 1995).

### **c) Déficience en transcobalamine II :**

La déficience en transcobalamine II est une maladie autosomique récessive dont le début de la petite enfance est caractérisé par une anémie mégalo-blastique, un retard staturo-pondéral, et une pancytopenie. (Scott *et al.* 1972). En cas d'absence de traitement, le trouble peut entraîner un retard mental et des anomalies neurologiques. Dans cette pathologie le niveau de vitamine b12 ne pas diminué remarquable (Haberle *et al.* 2009; Hakami *et al.* 1971). Les mutations du gène *TCN2* entraînent une diminution de la synthèse de la TC ou un désordre de la capacité de TC mutée de se lier à la cobalamine. Le traitement basé sur l'administration intramusculaire ou orale de la hydroxy cobalamine ou de Cyano cobalamine (Teplitzky *et al.* 2004).

### **d) Déficience en récepteur de la transcobalamine (CD320) :**

Le récepteur de la TC est composé d'un domaine extracellulaire de 199 acides aminés contenant deux domaines de deux récepteurs de LDL-classe A, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique de 21, de 32 acides aminés respectivement (Lai *et al.* 2011). Ce gène

est localisé sur le chromosome 19.p13.2. Chez cinq nouveau-nés asymptomatiques patients, des délétions dans le gène *CD320* ont été identifiées ont une capacité réduite de fixer le complexe Cbl/TCII. Ces cinq patients ont un taux élevé d'acidurie méthylmalonique associée avec un taux d'homocystéinémie normal ou élevé (Quadros *et al.* 2010; Alam *et al.* 2016).

### **I.2.9. Manifestations biologiques et cliniques du déficit en vit B12**

Les altérations hématologiques sont très caractéristiques et indicateurs de la carence en vitamine B12, au contraire des troubles neurologiques, beaucoup plus variés, et souvent les premiers et parfois seuls signes cliniques. Il existe une corrélation inverse dans la sévérité des symptômes neurologiques et hématologiques mais les causes n'en sont pas connues (Pétavy-Catala *et al.* 2003).

#### **a) Manifestations hématologiques**

Généralement, l'anémie par carence ou d'un trouble du métabolisme de la vitamine B<sub>12</sub> (anémie de Biermer) est lié au déficit en FI. Cette anémie est macrocytaire, mégaloblastique, normochrome, arégénérative. Elle s'accompagne d'une anisocytose due à un défaut de réplication de l'ADN par piégeage du 5-méthylTHF. Le premier signe de carence en vitamine B<sub>12</sub> est la macrocytose. Elle apparaît avant l'anémie et résulte d'un asynchronisme de la maturation du cytoplasme et du noyau (Federici *et al.* 2007).

#### **b) Signes neuropsychiatriques**

La carence en vitamine B<sub>12</sub> peut affecter le système nerveux central (cerveau, moelle épinière et nerf optique) et le système nerveux périphérique (mabrouk *et al.* 2015). Les troubles neurologiques associés à la carence en vitamine B<sub>12</sub> sont polymorphes. Ils comprennent la myélopathie, la neuropathie, les anomalies neuropsychiatriques et, moins souvent, l'atrophie du nerf optique (Sahoo *et al.* 2011).

Dans le système nerveux, la vitamine B<sub>12</sub> agit comme coenzyme dans la réaction de méthylmalonyl-CoA mutase, qui est nécessaire pour la synthèse de la myéline (Mota *et al.* 2016). La carence en vitamine B<sub>12</sub> entraîne donc une synthèse de la myéline défectueuse conduisant à plusieurs dysfonctionnements du système nerveux central et périphérique. La première anomalie est habituellement une déficience sensorielle, se présentant le plus souvent sous forme de paresthésie distale et symétrique aux membres inférieurs fréquemment associée à l'ataxie (Ralapanawa *et al.* 2015).

Les manifestations neuropsychiatriques telles que la perte de mémoire, la dépression, l'hypomanie, la psychose paranoïde avec hallucinations auditives et visuelles, la folie mégaloblastique ont été décrites suite à une carence en vitamine B12 (Scherer 2003). Il n'est toujours pas clair si une déficience légère ou modérée de B12 peut causer la démence et si la supplémentation de la diète avec B<sub>12</sub> peut prévenir ou retarder l'apparition de démences comme la maladie d'Alzheimer (Li *et al.* 2017).

### **I.3. Homocystéine**

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré formé à la suite du retrait du groupement méthyle de la méthionine. Toutes les cellules de l'organisme peuvent synthétiser l'Hcy. Elle n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines (Antoniades *et al.* 2009).

#### **I.3.1. L'histoire de la découverte de l'homocystéine**

En 1932, Butz et Du Vigneaud, dans le cadre de leurs études sur l'insuline, ont découvert que lorsque l'on chauffe de la méthionine dans de l'acide sulfurique concentré, on produit un nouvel acide aminé qui a des caractéristiques chimiques semblables à la cystéine. Ils ont suggéré comme nom de ce composé « homocystéine » (Butz 1932). En 1955, Du Vigneaud a remporté le prix Nobel de chimie pour sa participation à ce travail. En 1962, Carson et Neil ont montré des concentrations élevées d'homocystéine dans l'urine de certains enfants souffrant d'un retard mental, causées par une déficience en cystathionine synthase, une enzyme nécessitant la vitamine B6 pour une activité normale (Carson 1967).

En 1969, McCully *et al.* rapportent une pathologie vasculaire chez un enfant souffrant d'homocystéinurie, de méthylmalonurie et de cystathioninurie secondaire avec un métabolisme anormal de la cobalamine, y compris des lésions artérielles et des changements hémostatiques ressemblant à ceux observés chez les patients souffrant de carence en cystathionine- $\beta$ -synthase (McCully 2005).

En 1976, Wilcken *et al.* ont observé que les concentrations du disulfure mixte cystéine-homocystéine étaient plus élevées chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (MCV), par rapport aux témoins (Wilcken & Wilcken 1976).

### **I.3.2. Métabolisme de l'homocystéine :**

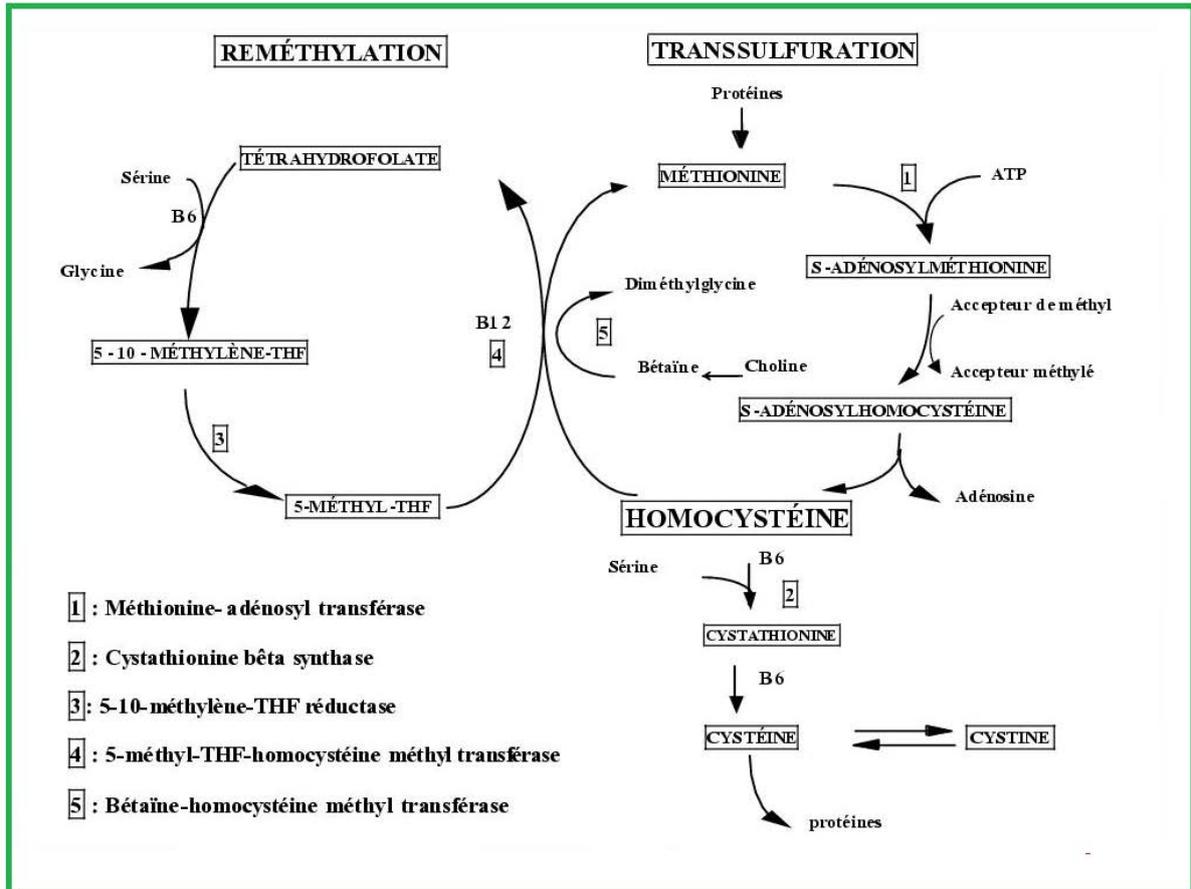
L'homocystéine est un acide aminé soufré synthétisé par toutes les cellules de l'organisme. Elle est catabolisée principalement dans le foie et les reins par deux grandes voies vitamine-dépendantes : la première est la voie de la reméthylation, où elle est dégradée en méthionine, la seconde est la voie de la trans-sulfuration, pour former, avec la cystathionine, la sérine (Mills *et al.* 1995).

Les deux formes principales de l'homocystéine circulant dans le plasma sont soit une forme libre, soit une forme liée aux protéines, 25-30 % de l'Hcy totale étant sous forme libre (majoritairement oxydée et en faible proportion réduite) (Dominguez-Salas *et al.* 2012).

La forme libre (filtrée par le rein) oxydée est principalement représentée par des disulfides mixte homocystéine-cystéine, par le disulfide Hcy-Hcy qui est appelé homocystine et par l'Hcy thiolactone. Par contre, la forme liée aux protéines (non filtrée par le rein), principalement l'albumine, représentée par des ponts disulfures ou des ponts peptidiques, constitue 75-80 % de l'Hcy totale. L'homocystéine totale (tHcy) représente la somme des fractions libres ou liées d'Hcy (Skovby *et al.* 2010).

#### **a) La voie de la transsulfuration:**

Chez les mammifères, l'Hcy est principalement catabolisée en cystéine par la voie de transsulfuration, la méthionine fournissant un atome de soufre. L'enzyme dépendante de la vitamine B6, la cystathionine  $\beta$  synthase (CBS, E.C. 4.2.1.22), catalyse la première réaction, dans laquelle le groupement hydroxyle de la sérine condense avec le thiol de l'Hcy pour former la L-cystathionine (Field *et al.* 2013). Cette dernière est clivée et désaminée par la cystéine lyase (CGL, E.C.4.4.1.1), une seconde enzyme dépendante de la vitamine B6, pour former la cystéine et l' $\alpha$ -cétobutyrate (Manolescu *et al.* 2010). L'excès de cystéine formée à partir de l'Hcy est converti soit en glutathion, un acide aminé soufré antioxydant majeur, soit en sulfates inorganiques qui sont excrétés dans les urines (Hankey *et al.* 2004).



**Figure 5:** Métabolisme de l’homocystéine. L’homocystéine est située à un point de branche métabolique et peut être dégradée de manière irréversible à la cystéine par voie de transsulfuration, ou conservée par reméthylation à la méthionine (Vesin *et al.* 2007).

### b) La voie de la reméthylation :

L’Hcy est reméthylée en méthionine *via* deux réactions enzymatiques distinctes : la première catalysée par la méthionine synthase (MS ou MTR), qui nécessite le 5-MTHF comme co-substrat et la cobalamine comme cofacteur, la seconde par la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase (BHMT), qui utilise la bêtaïne en tant que donneur de méthyle (Joseph & Loscalzo 2013). L’apport excessif en méthionine favorise une augmentation de la concentration intracellulaire de la SAM, ce qui inhibe la MTHFR et active la CBS et donc la trans-sulfuration. Au contraire, lorsque l’apport en méthionine est faible, la concentration en SAM n’est pas suffisante pour inhiber la MTHFR et la CBS n’est pas stimulée (Finkelstein 1998).

La voie de reméthylation est alors favorisée. L’hyperhomocystéinémie est définie comme une affection médicale caractérisée par un taux anormalement élevé (supérieur à 15  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) d’homocystéine dans le sang (Boyle 2005).

### **I.3.3. Les facteurs conduisant à l'hyperhomocystéinémie**

Le métabolisme de l'homocystéine peut être affecté par plusieurs facteurs, par exemple génétiques et nutritionnels.

#### **a) Les facteurs nutritionnels**

Le métabolisme normal de l'homocystéine dépend de la disponibilité des vitamines B9, B12 et B<sub>6</sub> comme cofacteurs ou co-substrats essentiels, que ce soit dans la voie de trans-sulfuration (B<sub>6</sub>) ou dans le cycle de reméthylation (B9, B12). Plusieurs études ont montré que les carences en l'un de ces facteurs peuvent avoir pour conséquences des perturbations du métabolisme de l'homocystéine (Seshadri *et al.* 2002).

Environ les deux tiers des hyperhomocystéinémies modérées est causée par des carences en ces vitamines, principalement chez les personnes âgées (PM *et al.* 2001).

#### **b) Les Facteurs environnementaux**

L'âge, le sexe, certains médicaments et différents états pathologiques constituent les facteurs environnementaux qui contribuent à augmenter les taux d'Hcy. Habituellement, le niveau d'homocystéine est relativement stable, jusqu'à l'âge de 40 ans. Par la suite, ce niveau augmente rapidement, surtout après 70 ans. La concentration plasmatique d'homocystéine est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Cette différence s'explique par une plus grande masse musculaire et du fait de l'activité hormonale. Pendant la grossesse, l'homocystéine élevée peut conduire à la naissance d'enfants avec un poids inférieur à la normale. Les éléments qui interfèrent avec le métabolisme de l'acide folique, tels que certains médicaments comme le méthotrexate, la phénytoïne, la carbamazépine, peuvent provoquer une hyperhomocystéinémie (Brattström *et al.* 1990).

Le monoxyde d'azote inactive la vitamine B12, et l'azaribine empêche l'activité de la CBS. Certains états pathologiques, tels que l'hypothyroïdie, l'insuffisance rénale, des troubles inflammatoires, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, le diabète de type II, les maladies lymphoprolifératives et certains cancers (du sein, de l'ovaire, du pancréas), contribuent à l'augmentation du taux de Hcy. Généralement, pour réduire le niveau de l'Hcy, il suffit de consommer des compléments en folate et / ou en vitamine B<sub>12</sub> (Cattaneo 1999).

### **c) Facteurs génétiques**

On peut associer l'augmentation de la concentration de l'Hcy à de nombreuses mutations génétiques des enzymes impliquées dans la reméthylation et la trans-sulfuration de l'homocystéine. Des polymorphismes dans les gènes de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (*MTHFR* ; C677T ; A1298C), la méthionine synthase (*MTR* ; A2756G), la cystathionine bêta-synthétase (*CBS* ; T833C / 844ins68, G919A) sont impliqués dans le métabolisme de l'homocystéine (Hsuan-Yu *et al.* 2007). Chez les personnes de souche européenne, on associe l'augmentation du taux d'homocystéine plasmatique à allèle *MTHFR* C677T (Cattaneo 1999).

### **I.3.4. Pathologies associées à l'homocystéine**

Une hyperhomocystéinémie est observée chez approximativement 5% de la population générale et a été associée avec certains troubles, bien qu'il soit le plus souvent difficile de déterminer si les symptômes observés chez un patient hyperhomocystéinémique sont dus à l'hyperhomocystéinémie elle-même ou si cette dernière est une conséquence de la pathologie. Ces pathologies peuvent être observées au cours du développement, de la vie adulte, du vieillissement et peuvent affecter différents organes (Manolescu *et al.* 2010).

#### **a) Homocystéine et maladies cardiovasculaires**

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés et développés. La concentration plasmatique élevée d'homocystéine (Hcy) est considérée comme un facteur de risque de maladie cardiovasculaire et peut également être associée à une hypertension. Les données recueillies à partir des études de population suggèrent qu'il y a une association de plasma plus élevé Hcy et risque de maladies cardiovasculaires (Guldener & Stehouwer 2003). L'homocystéine est également connue pour traiter les problèmes cardiovasculaires par ses effets indésirables sur l'endothélium cardiovasculaire et les cellules musculaires lisses avec des altérations résultantes de la structure et de la fonction artérielle subcliniques. Certains rapports décrivent une relation significative entre Hcy et la pression artérielle niveaux, ainsi que plus élevé Hcy dans les hypertendus par rapport aux normotensives.

Deux grandes méta-analyses des données épidémiologiques publiées en 2002 suggère qu'un abaissement de 25% de la concentration plasmatique d'homocystéine permet la réduction du risque des maladies cardiaques (11-16%) (Stanger *et al.* 2009).

## **b) Homocystéine et des maladies neurodégénératives**

L'hyperhomocystéinémie (Hhcy) est considérée comme un facteur de risque des maladies neurodégénératives. Toutefois, l'implication de l'homocystéine dans le mécanisme physiopathologique de ces affections, notamment dans la maladie d'Alzheimer, reste incertaine. Les alimentations pauvres en vitamines B9 et B12 et l'hyperhomocystéinémie ont été associées à des troubles neuropsychiatriques (Smach *et al.* 2013). De nombreuses études chez l'homme menées ces dernières années suggèrent que l'homocystéine joue un rôle dans les lésions cérébrales, le déclin cognitif et la mémoire. Des études épidémiologiques et longitudinales ont suggéré un lien de causalité entre Hcy et déficience cognitive (Abdessemed *et al.* 2009).

De nombreuses études ont confirmé que de faibles concentrations de folate, de vitamine B12 et / ou de B6 sont fréquentes chez les personnes âgées démentes. Les personnes pauvres en niveaux de vitamine B<sub>12</sub> seraient à risque deux ou trois fois- de maladie d'Alzheimer, atrophie cérébrale selon une étude suédoise portant sur 271 personnes en santé, âgées de 65 à 79 ans, et suivis pendant 7 ans (Lachner 2012).

Les doses élevées de compléments de vitamines B (B6, B9 et B12) pourraient réduire de 30 à 50% l'atrophie cérébrale chez les personnes atteintes d'une déficience cognitive légère (ou déclin cognitif modéré), retardant ainsi l'évolution vers la maladie d'Alzheimer. Des données épidémiologiques et cliniques récentes suggèrent que les personnes ayant un faible taux d'acide folique et un taux élevé d'homocystéine présentent un risque accru de maladie d'Alzheimer. L'augmentation du taux d'homocystéine plasmatique a été associée à l'apparition de la maladie d'Alzheimer (MA) (Smith *et al.* 2010).

Alors que l'homocystéine se révèle toxique dans des modèles de cellules en culture tels que les cultures primaires de neurones corticaux, les mécanismes de toxicité de l'homocystéine et son rôle dans la pathogénicité de la MA demeurent assez flous (Cacciapuoti 2013).

## CHAPITRE II : L'APPRENTISSAGE ET LA MEMOIRE

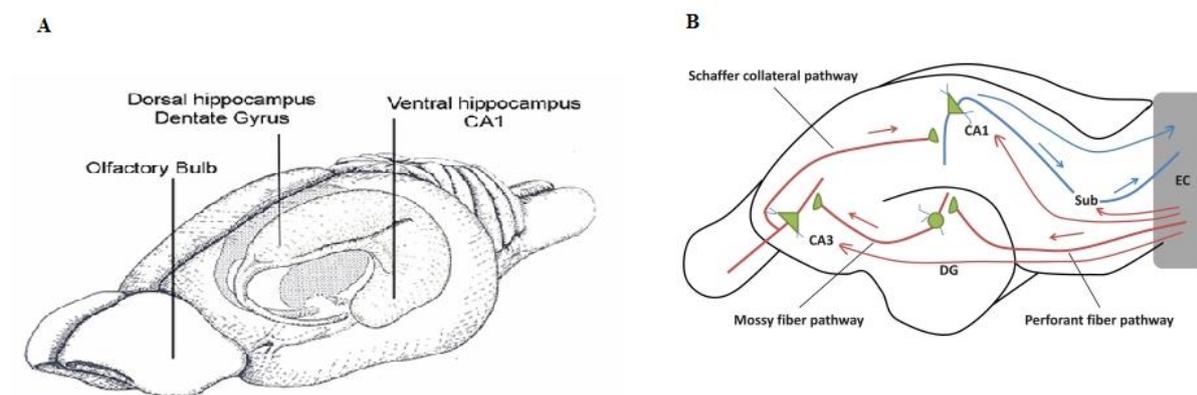
L'apprentissage et la mémoire sont deux processus cognitifs interconnectés fondamentaux, qui permettent d'acquérir de nouvelles connaissances ou des compétences pour les utiliser ensuite. De façon générale, l'apprentissage se réalise progressivement, en se basant sur la répétition des informations, une connexion des neurones permet à celles-ci de se placer dans la mémoire à long-terme. Cette mémoire rappelle des expériences passées ou des apprentissages acquis au cours de la vie pour nous permettre de les solliciter ultérieurement. Ainsi, nous ne nous contentons pas seulement des perceptions actuelles pour nous orienter vers nos choix futurs. En conséquence, le stockage des connaissances constitue un élément primordial de la mémoire (Sweatt 2003). La capacité de se souvenir et de réfléchir sur les expériences passées est un élément profond et puissant de l'être vivant. La perte de cette capacité est la caractéristique la plus dévastatrice d'Alzheimer et d'autres troubles neurodégénératifs (Morris & Monteggia 2014).

### II.1. Neuroanatomie de l'hippocampe

L'hippocampe (Hipp) est une structure cérébrale bilatérale, faisant partie du système limbique et qui joue un rôle central dans les processus cognitifs tels que la mémoire et la navigation spatiale. Cette partie du cerveau a été nommée ainsi en raison de sa ressemblance en apparence au cheval de mer, *Hippocampus leia*. Chez le rongeur, l'hippocampe est une structure rostro-caudale. On peut distinguer l'hippocampe dorsal et l'hippocampe ventral, correspondant à l'hippocampe antérieur et postérieur respectivement chez l'Homme (Fanselow & Dong 2010).

L'hippocampe se compose de deux structures : la corne d'Ammon (CA) et le gyrus denté (GD). La corne d'Ammon est subdivisée sur la base de différences morphologiques et de ses connexions synaptiques, en trois parties : CA1, CA2, CA3. Plusieurs types de cellules sont présents dans l'hippocampe. Le gyrus denté est constitué de cellules granulaires qui sont groupées en rangées, les unes contre les autres, et qui forment la couche granulaire alors que les CA sont principalement composés de neurones pyramidaux (neurones excitateurs glutamatergiques), groupés dans la couche pyramidale. Les deux dernières populations cellulaires représentent 88% des cellules hippocampiques. Environ 12% des neurones hippocampaux sont des cellules dites non-pyramidales (neurones GABAergiques) (Amaral & Witter 1989).

L'hippocampe est un site d'intégration d'informations qui proviennent de différents points d'origine sensorielle (Foerde *et al.* 2013; Amaral *et al.* 2014). Les axones de cellules pyramidales en provenance du cortex entorhinal (couche III) constituent la voie d'entrée (voie perforante) de l'information dans l'hippocampe. Ces axones passent à travers le *subiculum* et contactent les dendrites apicales des cellules granulaires dans le CA1 et le *subiculum* (Benito *et al.* 2016). Les axones des cellules granulaires, appelés « fibres moussues » contactent les cellules pyramidales de l'aire CA3. Ces cellules pyramidales se ramifient avec des axones, (collatérales de Schaeffer) qui établissent des contacts synaptiques avec les dendrites des neurones de l'aire CA1. Ces derniers envoient leurs projections vers le *subiculum* qui contacte en retour le cortex entorhinal. Cette série de voies unidirectionnelles du cortex entorhinal au gyrus denté vers CA3 à CA1 constitue la base du circuit trisynaptique classique de l'hippocampe (Villasana *et al.* 2015; Stepan *et al.* 2015; Van Haeften *et al.* 2000) (Figure 6).



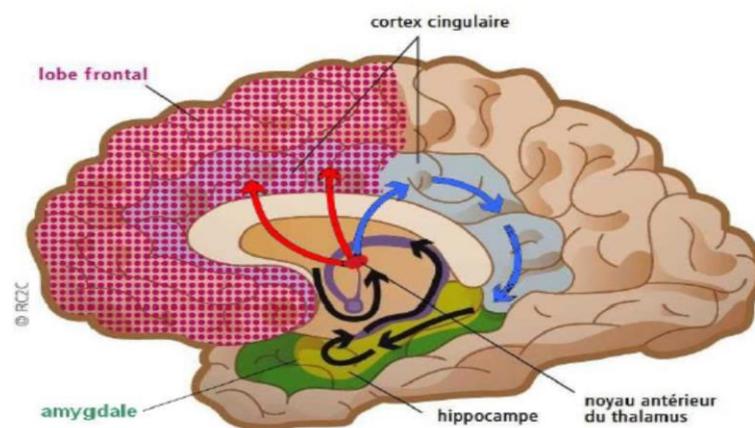
**Figure 6:** L'hippocampe de rat. **A.** localisation anatomique de la formation hippocampique dans un cerveau de rat (D'après [kaylab.uchicago.edu](http://kaylab.uchicago.edu)) **B.** Schéma de des connexions entre les structures de la formation hippocampique. Le cortex entorhinal (EC) contacte le gyrus denté (DG) via la voie perforante. Le gyrus denté projette vers la couche pyramidale CA3 via les fibres moussues. Les neurones du CA3 contactent alors le CA1 par les collatérales de Schaeffer. Les projections du CA1 vers le *subiculum* (sub) constituent la voie de sortie du circuit (Zhang *et al.* 2010).

En tentant d'expliquer les voies anatomiques jouant un rôle dans le traitement des informations émotionnelles, le neuroanatomiste américain James Papez a proposé un circuit dit « circuit de Papez » (Figure 7) qui comprend un certain nombre de structures nerveuses anciennes phylogénétiquement et entourant le tronc cérébral, nécessaire à l'expression et au contrôle des émotions (Papez 1937). Le circuit prédit par Papez s'est avéré effectif, non pas pour décrire la

voie des émotions mais pour expliquer les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendants (apprentissage spatial).

Le sujet (animal ou humain) recueille les différentes informations provenant de son environnement afin de construire sa mémoire. Les afférences sensorielles (tactiles, olfactives et visuelles) entrent dans le système limbique via l'amygdale ou via le gyrus denté de l'hippocampe.

Les messages nerveux sont transférés du gyrus denté aux couches CA3 et CA1 de l'hippocampe, puis passe de CA1 au cortex cingulaire. En effet, il réorientera les informations soit vers l'hippocampe dans le but de les réactiver et de les consolider, soit vers les lobes frontaux pour conserver à long terme les informations afin de garder en mémoire les données environnantes (par exemple les différents chemins d'un labyrinthe afin d'en trouver la sortie), (Vertes 2005).



**Figure 7:** Schéma présentant le circuit de Papez. (Modifiée d'après *lecerveau.mcgill.ca*)

- Circuit de mémorisation
- Stockage dans le cortex frontal
- Boucle rétrograde pour la consolidation du souvenir

L'hippocampe est également impliqué dans le comportement de peur au travers de ses connexions avec l'amygdale. L'hippocampe joue un rôle dans la régulation des taux de base de corticostérone ainsi que dans la fin de la réponse au stress (inhibition des taux circulants de corticostérone après la décharge induite par le stress) (Kirby *et al.* 2013).

L'amygdale est impliquée dans le conditionnement de peur, qui emploie des stimuli aversifs dans le but d'évaluer la mémoire et l'apprentissage « émotionnel » (Richter-Levin 2004). L'amygdale, comme l'hippocampe, est située dans le lobe temporal (chez l'Homme) et est constituée de plusieurs noyaux (basal, central et médian) (Roozendaal et al. 2009).

Plusieurs hormones influencent le fonctionnement amygdalien. L'une d'entre elles, la corticotropin-releasing hormone (CRH), facilite l'attention pour les événements externes et sous-tend les mécanismes de peur et d'anxiété (Adolphs 2010). L'amygdale est également sous l'influence des catécholamines dont la noradrénaline qui l'affecte (Lupien *et al.* 2007; Schwabe *et al.* 2012)

## **II.2. Neuroanatomie du Cortex Préfrontal**

La zone externe des hémisphères cérébraux que l'on nomme le néocortex comprend les lobes suivants : frontal, temporal, pariétal et occipital. Le cortex préfrontal (CPF) est la partie la plus évoluée du cerveau, située au pôle antérieur du lobe frontal devant les régions pré-motrices et motrices (Fuster 1989).

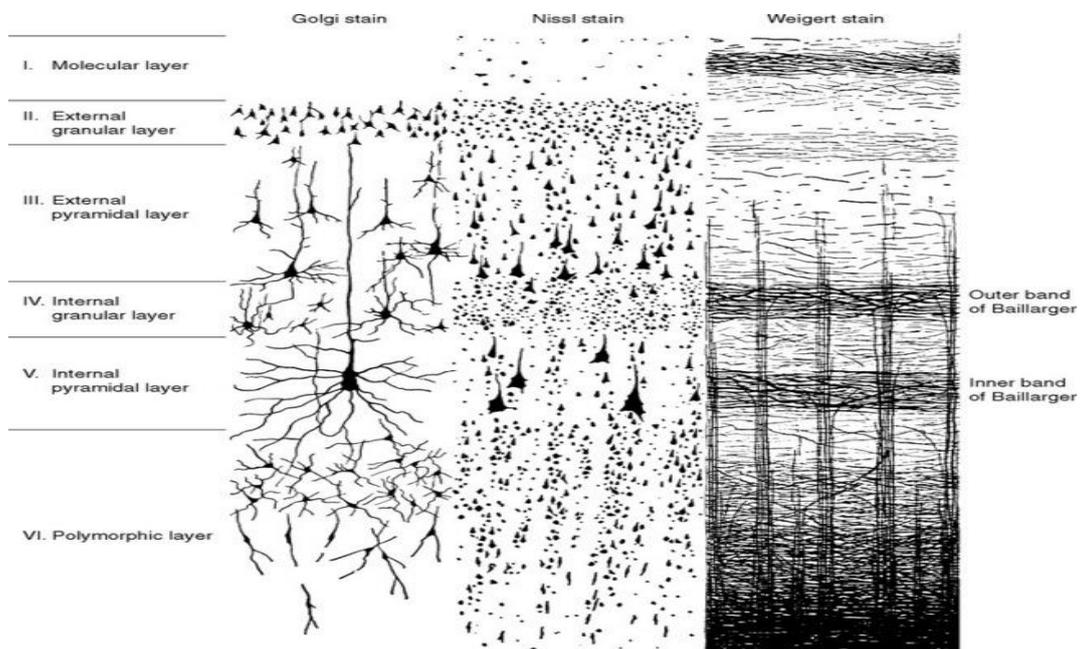
Le cortex préfrontal est localisé dans la partie antérieure du cerveau juste au-dessus de l'orbite des yeux. Il ne fait pas partie du système limbique mais dispose de connexions avec les structures limbiques. Le cortex préfrontal se subdivise en plusieurs zones (médiane, orbitale et latérale) qui ont des fonctions différentes. Au niveau du cortex préfrontal médian, il existe une subdivision en deux zones : les zones infra-limbique et pré-limbique (Goyal *et al.* 2008).

Chez le rongeur, le cortex préfrontal correspond aux structures se situant entre le bulbe olfactif et le cortex moteur primaire (M1). Au plan anatomique, il est défini comme un cortex possédant une couche granulaire IV recevant les innervations majoritaires du thalamus médiodorsal (Zséli *et al.* 2017; Hwang *et al.* 2017). Le CPF, comme l'ensemble du néocortex, se range en 6 couches cellulaires qui se distinguent les unes des autres par la taille relative de leurs couches (Figure 8).

La couche I, ou couche moléculaire, est composée d'axones orientés horizontalement, et d'extensions des dendrites des neurones des couches inférieures. La couche II, ou couche granulaire externe, est constituée de petits neurones pyramidaux ainsi que de nombreuses cellules étoilées, recevant les afférences des autres zones du cortex. La couche III, ou couche pyramidale externe, est constituée de neurones pyramidaux dont projettent la majorité des afférences cortico-corticales. La couche IV, ou couche granulaire interne, contient des cellules

étoilées et pyramidales. Elle reçoit des axones en provenance du noyau médiodorsal du thalamus. Cette couche est développée particulièrement chez l'Homme (Fuster 1989).

Chez le rongeur, cette couche serait de fait fusionnée avec la couche V. Cette dernière, ou la couche pyramidale, contient essentiellement un grand nombre des neurones pyramidaux. Ces derniers se projettent vers les zones sous-corticales. La couche VI, ou couche polymorphe, présente des cellules pyramidales. Ces cellules envoient leurs axones vers le thalamus médiodorsal en particulier (Diamond 2009).



**Figure 8:** Schéma présentant l'organisation histologique du néocortex. Coupe transversale du néocortex colorée par trois méthodes différentes : les six couches corticales sont indiquées. La coloration de Golgi révèle les formes des arborisations des neurones corticaux en colorant complètement un petit pourcentage. La méthode Nissl colore les corps cellulaires de tous les neurones, montrant leurs formes et leur densité. La méthode Weigert colore la myéline, révélant les bandes orientées horizontalement de Baillarger et les collections orientées verticalement d'afférences corticales et d'efférents (source: [www.learnneurosurgery.com](http://www.learnneurosurgery.com)).

Les neurones qui composent le cortex préfrontal sont majoritairement de deux types : des cellules pyramidales excitatrices glutamatergiques et des interneurons GABAergiques inhibiteurs (Lee *et al.* 2014). Les premières présentent des profils de taille variable selon la couche concernée, et projettent aussi bien localement que vers d'autres structures corticales et sous-corticales. Les interneurons projettent localement et permettent une régulation de l'activité des cellules glutamatergiques (Elston 2003).

Différentes classes d'interneurones peuvent être définies sur la base de critères morphologiques (cellules de Chandelier ou en « double bouquet »), électrophysiologiques (« fast-spiking »), moléculaires (cellules exprimant différentes protéines de liaison calcique comme la parvalbumine ou la calbindine) ou de leurs sites d'actions (axonal ou dendritique). Cette complexité traduit l'existence de microcircuits préfrontaux dont l'activité peut être régulée finement (Salkoff *et al.* 2015).

Le cortex préfrontal influence également les fonctions cognitives et émotionnelles. Il est impliqué dans la prise de décision, l'inhibition, la flexibilité comportementale et dans le comportement dirigé vers un but ou une nouveauté (Rock & Apicella 2015).

Les zones infra-limbique et pré-limbique semblent être associées aux processus émotionnels mis en jeu dans de nouvelles situations (Suzuki & Bekkers 2012). Au travers des connexions avec l'amygdale, ces sous-structures peuvent affecter le comportement lié à l'anxiété (Gold *et al.* 2015).

Le cas de Phineas Gage vers 1850 aux Etats-Unis, décrit des changements de personnalité et de comportement suite à une lésion du lobe frontal. En effet, lors d'un accident sur un chantier de chemin de fer, cet homme se retrouva avec une barre à mine qui avait traversé la partie frontale de sa tête. Après une période de convalescence suite à l'accident, Phineas présentait des perturbations dans ses prises de décision (elles étaient devenues irrationnelles) associées à un changement de personnalité (García-Molina 2012).

### **II.3. Les différents types de mémoire**

Plusieurs études cliniques, dont le cas du patient H.M.<sup>1</sup> (Scoville & Milner 1957) est le plus connu, indiquent l'importance de l'hippocampe dans la formation de la mémoire implicite et de la mémoire à long terme. Cependant, il n'intervient plus dans le rappel de souvenirs très anciens. Son rôle ne serait que temporaire dans le stockage des informations. De plus, ces études indiquent que d'autres structures anatomiques, différentes de la formation hippocampique, participent aux systèmes de mémoire, comme le démontre la capacité d'apprentissage d'habiletés motrices du patient H.M. Suite à ces études, les scientifiques ont jugé nécessaire de

---

<sup>1</sup> Le lobe temporal médian du patient H.M. avait subi une ablation bilatérale, incluant une grande part du complexe amygdaloïde : la partie antérieure de la formation hippocampique (CA1, CA3, gyrus dentelé, subiculum et cortex entorhinal) ainsi que la partie dorsale du cortex périrhinal avoisinant). Cette intervention réussit à guérir son épilepsie, mais provoqua chez le patient H.M. une amnésie antérograde sévère (incapacité à former des souvenirs nouveaux), sans toutefois avoir affecté ses fonctions cognitives, motrices et perceptuelles (Squire 2009).

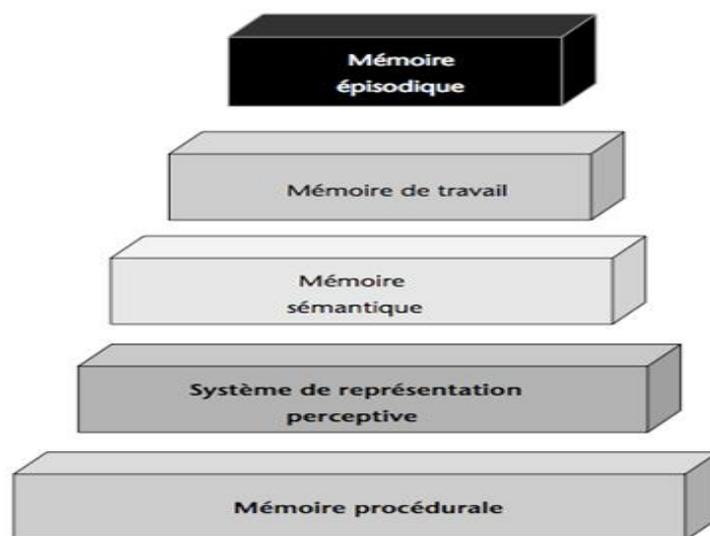
classer ces différents types de mémoire et d'expliquer leur fonctionnement.

Le scientifique Ebbinghaus a mis en relief, suite à un test portant sur la mémorisation et le rappel de syllabe que les souvenirs peuvent être de courte durée (quelques minutes) ou se maintenir pendant une longue durée (quelques jours ou quelques mois). Après ces études, est apparu le concept de mémoire à court terme et à long terme (Murre & Dros 2015).

D'autres recherches scientifiques ont ultérieurement appuyé cette hypothèse en parlant de mémoire primaire pour la mémoire à court terme et de mémoire secondaire pour la mémoire à long terme. Ces résultats furent mis en lien avec le cas de H.M., chez lequel la mémoire à long terme antérograde fut endommagée et la mémoire à court terme resta intacte. Tandis que la mémoire à court terme stocke les informations sur un temps limité (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes), la mémoire à long terme les conserve sur une large durée (de plusieurs secondes à toute une vie).

Dans cette dernière, on retrouve notamment la mémoire de travail qui joue un rôle dans le traitement cognitif d'éléments temporairement stockés. La mémoire de travail est organisée selon un administrateur central qui gère deux autres composantes, la boucle phonologique traitant les informations phonologiques et le calepin visuo-spatial traitant les informations visuo-spatiales (Schandler *et al.* 1996; Abramov *et al.* 2017). Chaque processus mental repose sur une structure cérébrale clé selon l'hypothèse de Squire (Shimamura & Squire 1991; Rickard *et al.* 2006). Il établit ainsi une classification qui sépare la mémoire accessible à la conscience (mémoire déclarative ou explicite) de celle impliquant des systèmes d'apprentissages inconscients (mémoire non déclarative ou implicite). En outre, le modèle de Squire s'appuie sur un traitement en série de l'épisodique au sémantique (Shimamura 1986), ce qui laisse supposer qu'aucune connaissance sémantique n'est possible sans mémoire épisodique. Le déficit de la mémoire épisodique n'entraîne pas forcément d'altération de la mémoire sémantique (Rosenbaum *et al.* 2005).

Endel Tulving organisa un modèle de façon hiérarchique basé sur un système de classification structural SPI (Sérial, Parallèle, Indépendant) composé de cinq systèmes de mémoire, que ce soit en termes phylogéniques ou en termes de prépondérance au sein du système cognitif. Selon ce système, l'encodage s'effectuerait en série du système le plus ancien au plus récent (par exemple, le codage en mémoire épisodique dépend d'abord du codage en mémoire sémantique) et le stockage s'effectuerait en parallèle dans les différents systèmes. La récupération des informations dans un système est indépendante de la récupération dans les autres systèmes (Vadis 1960; Tulving 1986).



**Figure 9:** Le Modèle serial-parallel-independent de l'organisation fonctionnelle des systèmes de mémoires selon Tulving (Martins *et al.* 2006).

#### II.4. Rôle des récepteurs glutamatergiques dans la mémorisation

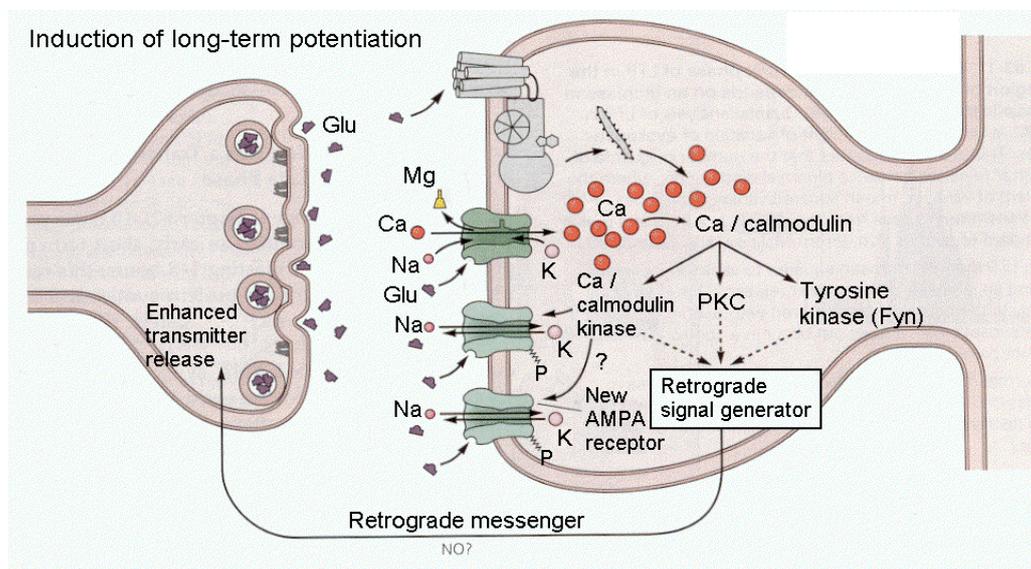
Dans le système nerveux central, le neurotransmetteur excitateur principal est l'acide aminé glutamate (Salkoff *et al.* 2015; Cawley *et al.* 2015). Ce dernier exerce une action excitatrice sur ses récepteurs et c'est lui qui est en action dans le circuit trisynaptique de la formation hippocampique. Plusieurs types de récepteurs du glutamate de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA (l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) ou encore Kainate interviennent dans le processus de mémorisation.

Afin de dépolariser le neurone post-synaptique, les récepteurs du glutamate de type NMDA sont couplés à des canaux calciques voltage-dépendants situés sur la membrane présynaptique (Fonnum *et al.* 1995). Les canaux calciques transportent un des principaux éléments de signalisation intracellulaire, l'ion calcique ( $\text{Ca}^{2+}$ ) qui intervient dans nombre de processus neuronaux comme la libération de neuromédiateurs, la modulation de conductances ioniques (Lapish *et al.* 2006), les réarrangements anatomiques, l'expression génique.

Les ions calcium entrent massivement dans la cellule grâce au glutamate qui se fixe sur ses récepteurs et permettent de lever le blocage du canal NMDA par un ion magnésium  $\text{Mg}^{2+}$  (fonctionnement principal du récepteur NMDA) (Gielen 2010). Le  $\text{Ca}^{2+}$  a alors pour cible des ensembles de protéines kinases telles que la calmodulin-dépendante protéine (CaM) kinase II,

Protéine Kinase C (PKC) et Protéine Kinase A (PKA) et MAP kinases (MAPK) (Attwell & Gibb 2005; Zhu *et al.* 2017) La conséquence de l'activation de ces protéines est la phosphorylation des récepteurs NMDA et AMPA, augmentant ainsi leur sensibilité à toute activation ultérieure. Dans le noyau des neurones, CamKII aura pour cible le facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein), qui se fixera sur l'ADN au niveau des promoteur de gènes cibles et déclenchera leur expression.

Plusieurs études montrent l'importance de cette voie dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, la neurogenèse et dans la plasticité synaptique (Pasternack *et al.* 2002; Chaudhry *et al.* 2009)



**Figure 10:** Mécanismes d'action de la LTP (long-term potentiation). Le récepteur NMDA du glutamate est associé à un canal ionique. Quand le glutamate s'y fixe, le canal, initialement bloqué par les ions magnésium, s'ouvre. Les ions  $Mg^{+2}$  sont rejetés dans l'espace intercellulaire, tandis que les ions calcium pénètrent dans le neurone postsynaptique. L'entrée massive des ions calcium déclenche des réactions moléculaires qui aboutissent au renforcement des connexions entre les neurones pré- et postsynaptiques. (Source, [www.seehint.com](http://www.seehint.com))

## II.5. La plasticité synaptique

La plasticité neurale est une caractéristique essentielle du cerveau en réponse à des stimuli extrinsèques et intrinsèques, y compris le stress et la dépression. L'implication de l'hippocampe et du cortex préfrontal dans les processus cognitifs et en particulier dans l'apprentissage et la mémoire est connue depuis longtemps (McEwen & Morrison 2013).

L'existence d'une voie monosynaptique directe de la région CA1 de l'hippocampe et du *subiculum* à des zones spécifiques du cortex préfrontal fournit un modèle utile pour conceptualiser les opérations fonctionnelles de la communication du cortex préfrontal-hippocampique dans l'apprentissage et la mémoire (Van den Oever *et al.* 2010). Les extraordinaires capacités de plasticité synaptique de l'hippocampe n'ont été découvertes que récemment par les neurophysiologistes (Bannerman *et al.* 2014). En 1973, Bliss et ses collègues ont montré qu'une stimulation à haute fréquence de la voie perforante entraînait une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté (Bliss & Lomo 1973). Cette augmentation, qui peut durer plusieurs jours *in vivo*, a été appelée la potentiation à long-terme ou LTP. La LTP a été mise en évidence au niveau des connexions entre les collatérales de Schaeffer et les épines dendritiques du CA1 (Leal *et al.* 2015; Bozdagi *et al.* 2000). La LTP possède différentes propriétés qui permettent d'expliquer les importantes capacités de stockage d'informations et d'apprentissage de l'hippocampe. La LTP peut persister plusieurs jours et les expériences ont montré des ressemblances entre l'activité synaptique *in vivo* et *in vitro* (Andersen & Figenschou Soleng 1998). Elle peut être initiée par une stimulation de fréquence équivalente à celle se déroulant naturellement dans l'hippocampe du rat lors de l'exploration spatiale, le rythme thêta, une onde de décharges brèves et synchrones de 5 à 7 Hertz (Vertes 2005; Leung *et al.* 1994).

Dans l'amygdale, une structure qui contribue à l'apprentissage lié à la peur, la mémorisation entraîne une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique équivalente à celle induite par la LTP (Manzanares 2005; Monsey *et al.* 2011). En effet, des études comportementales et pharmacologiques montrent qu'une inhibition de la LTP peut affecter différentes tâches de mémorisation impliquant l'hippocampe chez le rat, telles que retrouver une plate-forme dans une piscine d'eau opaque, ou discriminer différentes odeurs (Izquierdo *et al.* 2008). De plus, les chercheurs ont réussi, par de récentes manipulations génétiques, à augmenter l'expression de la LTP. La conséquence de cette augmentation fut presque toujours une amélioration des performances des souris dans différentes tâches d'apprentissage (Morris *et al.* 1986). Etant donné que la LTP est synapse-spécifique, seules les synapses ayant été stimulées à haute fréquence vont exprimer la LTP.

Le caractère coopératif de la LTP a été démontré par l'observation de l'augmentation de son expression avec le nombre de stimulations, qui peut être changé en variant l'intensité de la stimulation extracellulaire. Une stimulation de faible intensité ou de courte durée induira

rarement la LTP, alors qu'une stimulation plus forte induit la LTP de manière plus probable (Zhao *et al.* 2007).

L'induction de la LTP est associative car la stimulation d'un petit groupe de fibres afférentes peut être facilitée par la stimulation simultanée d'un autre groupe d'afférences convergentes. Cette propriété correspond au postulat proposé par Hebb selon lequel l'activité simultanée entre deux neurones couplés synaptiquement pourrait induire une augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique entre ces deux neurones. Cette modification était, selon Hebb, la base cellulaire de l'apprentissage (Vitureira & Goda 2013; Martens *et al.* 2015). Au vu de ces différentes propriétés, la LTP dans l'hippocampe et surtout dans la région du CA1 est devenue le modèle physiologique des processus d'apprentissage le plus étudié jusqu'à aujourd'hui. Plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'un phénomène opposé à la LTP : nommé « dépression à long terme » ou LTD, il joue un rôle dans le mécanisme synaptique d'oubli (Bliss & Cooke 2011). Dans ce processus, c'est une stimulation à basse fréquence qui induit la LTD, qui dépend d'une entrée plus faible de calcium, et qui fait intervenir des phosphatases (Mulkey *et al.* 1994; Cheng *et al.* 1995), ainsi qu'une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la surface de l'épine. Cependant, on ne connaît pas aussi bien le rôle dans l'apprentissage et les mécanismes responsables de la LTD que ceux de la LTP (Morishita *et al.* 2005; Antunes *et al.* 2016).

## II.6. La superfamille des récepteurs nucléaires

Parmi les récepteurs intracellulaires, on trouve une superfamille appelée récepteurs nucléaires (NRs), qui agissent comme des facteurs de transcription. Leur stimulation se fait au moyen de la liaison de ligands de nature lipophile et ils modulent l'expression de gènes cibles. Les récepteurs nucléaires jouent un rôle dans le contrôle de mécanismes cellulaires fondamentaux tels que la différenciation, la prolifération, l'apoptose, et l'homéostasie ainsi que dans la régulation de diverses fonctions biologiques telles que la croissance, la reproduction et le métabolisme énergétique (Novac & Heinzl 2005; Leader *et al.* 2006).

L'alignement de séquences et la construction d'arbres phylogénétiques ont abouti à une classification de la famille NRs humaine en six groupes évolutifs de taille inégale (Thornton & DeSalle 2000; Dągryte *et al.* 2009; McEwan 2009) **Groupe 1** : ce grand groupe contient les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs, Retinoic Acid Receptors), les récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), les récepteurs aux hormones thyroïdiennes

(TRs, Thyroid Receptors) et des récepteurs apparentés comme le récepteur à la vitamine D (VDR, Vitamin D Receptor).

**Groupe 2 :** inclut les récepteurs à l'acide rétinoïque RXRs (Retinoid X Receptors) et des récepteurs orphelins apparentés comme HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor-4), COUP-TF I et II (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor) et les récepteurs testiculaires (TRs, Testicular Receptors).

**Groupe 3 :** inclut les récepteurs aux hormones stéroïdes dont les récepteurs aux oestrogènes (ERs, Estrogen Receptors) et des récepteurs apparentés comme ERRs (Estrogen-Related Receptors), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR, Glucocorticoid Receptor), à la progestérone (PR, Progesterone Receptor) et aux androgènes (AR, Androgen Receptor).

**Groupe 4 :** inclut les récepteurs orphelins de type NGFIB (Nerve Growth Factor IB) et des récepteurs apparentés comme NURR1 (NUclear Receptor Related 1) et NOR1 (Neuron-derived Orphan Receptor 1).

**Groupe 5 :** inclut le récepteur SF1 (Steroidogenic Factor 1) et le récepteur apparenté LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1).

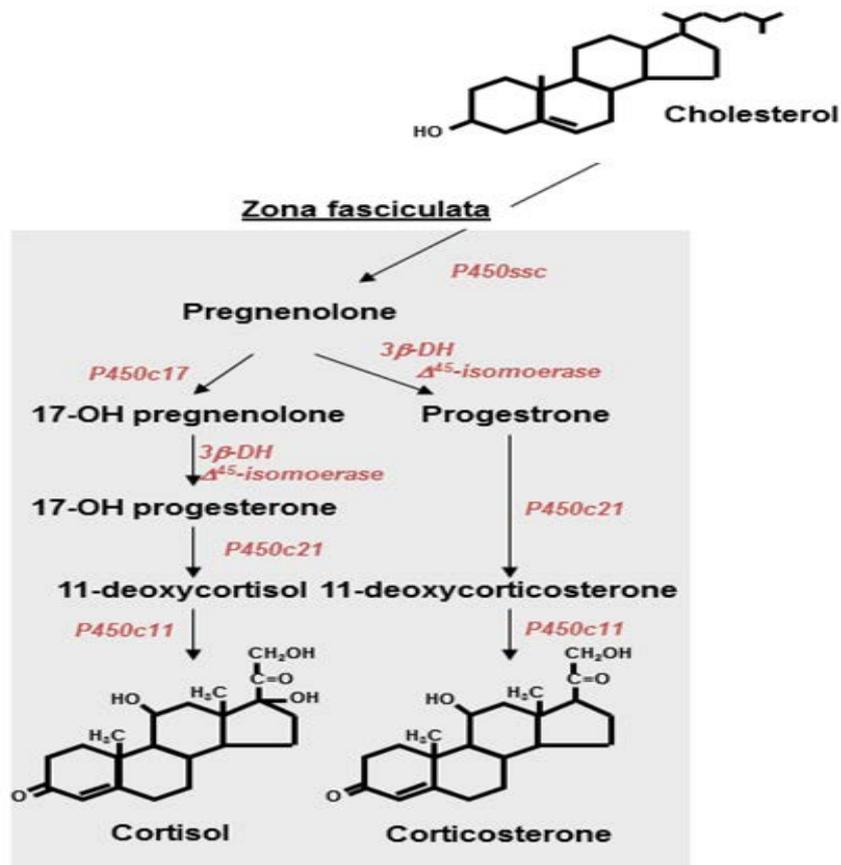
**Groupe 6 :** inclut les récepteurs orphelins de type GCNF (Germ Cell Nuclear Factor-like).

## II.7. Les Glucocorticoïdes

Les principaux glucocorticoïdes (GCs) d'origine endogène (le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez le rongeur) sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol et synthétisées par les glandes corticosurrénales (Adcock *et al.* 2002). Les glucocorticoïdes jouent un rôle primordial comme régulateur de la différenciation tissulaire. Chez l'adulte, ils sont impliqués dans le contrôle des processus physiologiques qui font office de réponse aux défis stressants (Oakley & Cidlowski 2013).

## II.7.1. Biosynthèse des glucocorticoides

Toutes les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol. La synthèse des glucocorticoïdes débute par l'hydrolyse d'esters de cholestérols stockés dans des adiposomes. Sous l'action de l'ACTH, le cholestérol entre dans la mitochondrie à l'aide de la Steroid Acute Regulatory Protein (StAR). L'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (*P450SCC*) catalyse la conversion du cholestérol en prégnénolone, molécule à la base de la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Il s'agit de l'étape limitante de la formation des hormones stéroïdiennes. La prégnénolone donne par la suite la progestérone et la 17-hydroxyprégnénolone. Ces deux précurseurs, ensuite transformés en 17-hydroxyprégnénolone, qui représente l'étape de clivage entre la biosynthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Il y a enfin conversion en cortisol, sous l'effet de l'ACTH, par une 21 $\beta$  hydroxylation puis une 11 $\alpha$  hydroxylation (Vella 1988).

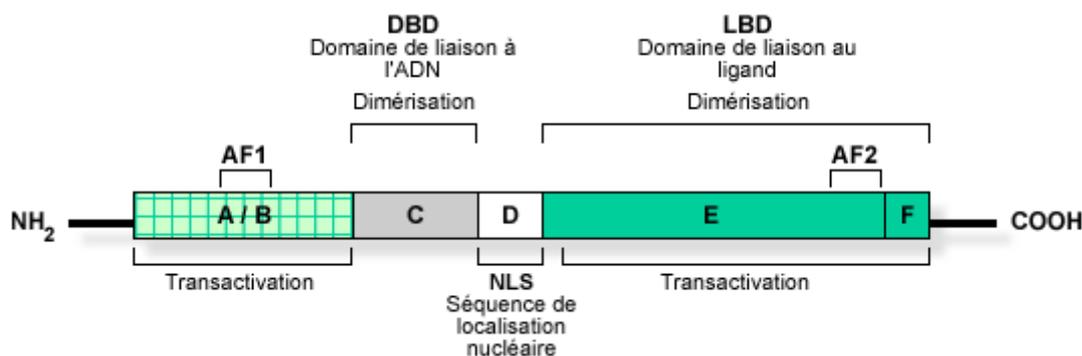


**Figure 11:** Biosynthèse des glucocorticoïdes. 3 $\beta$ HSD : 3 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase; 17 $\beta$ HSD : 17 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase ; CYP11A1 : Cytochrome P450sc ou cholestérol desmolase ; CYP11B1 : Cytochrome P450-11 $\beta$  ou 11 $\beta$ -hydroxylase ; CYP17 : Cytochrome P450c17 ou 17 $\alpha$ -hydroxylase ; CYP19 : Cytochrome P450 arom ou aromatasase ; CYP21 Cytochrome P450c21 ou 21-hydroxylase (Modifié auprès (Ortsäter *et al.* 2012) .

## II.7.2. Les récepteurs aux glucocorticoïdes :

L'effet des glucocorticoïdes résulte de leur liaison à deux types de récepteurs nucléaires : ceux spécifiques des glucocorticoïdes (GR) ou GR de type I (également appelé NR3C1) ou ceux communs avec les minéralocorticoïdes (MR) ou GR de type II (ou NR3C2) (Clark et Peck 1984). Les deux types de récepteur appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, famille des récepteurs des stéroïdes. Toutefois, l'affinité de ces deux récepteurs à leur ligand est différente. Les MR lient la corticostérone et l'aldostérone avec une forte affinité ( $K_d = 0,5$  nM) alors que GR présente une affinité pour les corticostéroïdes dix fois moins forte que celle des MR ( $K_d = 5$  nM) (Conrad 2005; Gomez-Sanchez 2014).

Le GR est une protéine monomérique de 776 acides aminés (90 kDa ; Figure 6). Il est composé de quatre régions protéiques distinctes, y compris une région N-terminale (NTD), activant les gènes cibles, un domaine central composé de « deux doigts de zinc », chacun composé de la séquence Cys-X2-Cys-X13-Cys-X2-Cys. Cette séquence responsable de la liaison à l'ADN (DBD) et participant à la dimérisation des récepteurs, a la liaison aux sites cibles, à l'activation ou l'inhibition de la transcription et une région de liaison hormonale C-terminale (LBD), contenant aussi des séquences de liaison aux coactivateurs et aux protéines de choc thermique (Heat shock protein ou Hsp (Schoneveld *et al.* 2004; Dejean & Richard 2013).



**Figure 12:** schéma de la structure générale des récepteurs des glucocorticoïdes. Le domaine modulateur (A/B) contient une fonction activatrice de la transcription AF-1 ; le domaine de liaison à l'ADN (C) (DBD, DNA Binding Domain) ; le domaine charnière (D) comporte un motif de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) ; le domaine de liaison du ligand (E) (LBD, Ligand Binding Domain ; le domaine (F) inconstant (Aranda & Pascual 2001).

En condition normale, à cause des affinités différentes du MR et du GR, les glucocorticoïdes sont liés aux MR. La saturation des GR ne se produit qu'en cas d'hypersécrétion de glucocorticoïdes. Des études de double marquages immunohistochimiques, d'hybridation *in*

*situ*, d'immunocytochimie et d'analyse par microscopie confocale menées sur le système nerveux central du rongeur ont permis de localiser les GR et les MR (Chantong *et al.* 2012).

Dans le cerveau, les MR sont exprimés au sein du système limbique notamment dans le cortex préfrontal, du septum latéral, de l'amygdale centrale et médiane et au sein des noyaux thalamiques et hypothalamiques. Par contre, les GR sont largement exprimés à travers tout le cerveau avec une forte densité dans l'hippocampe et le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (De Kloet *et al.* 1998; Zhe *et al.* 2008).

Dans l'hippocampe, les récepteurs MR et GR sont le plus co-localisés mais inégalement distribués. En effet, les GR seraient moins abondants que les MR dans l'hippocampe dorsal (régions du CA1, CA2, CA3 et le gyrus denté) (de Kloet *et al.* 2000).

Les GR quant à eux se limiteraient aux régions du CA1, CA2 (de l'HD et de l'HV) et du gyrus denté. Par ailleurs, ces études ont permis de mettre en évidence la colocalisation des MR et les GR dans les noyaux des neurones pyramidaux et des cellules granulaires (Johnson *et al.* 1996). Cependant, les MR sont également localisés dans la partie du cytoplasme des cellules granulaires et pyramidales (Han *et al.* 2005).

Des études ont montré que des récepteurs aux glucocorticoïdes sont localisés sur la membrane plasmique de nombreux types de cellules (Boncompagni *et al.* 2015). L'affinité du récepteur membranaire de type MR aux glucocorticoïdes est comparable à celles des GR intra-cellulaires (Karst & Joëls 2005). Ainsi, l'augmentation en concentration des glucocorticoïdes stimulent les récepteurs membranaires de type MR (Lim *et al.* 2007). De plus, les effets rapides non génomiques médiés par les récepteurs de type MR augmentent la neurotransmission glutamatergique, qui n'est plus observée chez des souris knock out MR (Groeneweg *et al.* 2011). Il a également été démontré que ces récepteurs membranaires de type MR régulent le trafic de surface des récepteurs glutamatergiques. Il a été montré que des récepteurs localisés sur la membrane plasmique, autres que les récepteurs MR et les GR, interviendraient dans les effets physiologiques du stress sur le cerveau (Haller *et al.* 2008).

### **II.7.3. Mécanismes d'action des glucocorticoïdes**

#### **a) Mécanisme génomique**

En l'absence de ligand (glucocorticoïdes), les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), sont présents dans le cytoplasme et complexés à des protéines de choc thermique Hsp 90 (Heat shock

protein 90) et différentes unités d'autres HSP (HSP 70, 56 et 26) (Grzanka *et al.* 2011). Ces protéines se fixent au niveau du domaine de liaison de glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes, grâce à leur nature lipophile, franchissent la membrane plasmique. La liaison du GR aux glucocorticoïdes induit un changement conformationnel et une phosphorylation du récepteur, provoquant la dissociation du complexe GR - protéines chaperonnes. Les récepteurs peuvent se complexer en homodimères (GR/GR ou MR/MR) ou en hétérodimères (GR/MR). Le dimère de récepteurs, lequel est toujours lié à l'hormone, est transloqué vers le noyau. Ensuite, le glucocorticoïde va permettre de moduler la transcription de gènes cibles, soit positivement par un processus de transactivation, soit négativement, par transrépression (Croxtall *et al.* 2002).

Dans le cas de la transactivation et du premier mode de transrépression, les récepteurs se lient sous forme d'homodimères directement à l'ADN au niveau des séquences spécifiques appelées élément de réponse (GRE), respectivement positif (GRE : Glucocorticoïd Responsive Elements) ou négatif (nGRE : negative Glucocorticoïd Responsive Elements). Le GRE, localisé dans la région régulatrice des gènes cibles, est constitué d'un site double où viennent se fixer deux récepteurs, qui sont susceptibles d'interagir avec différentes protéines participant aux processus de transcription. Les principaux cofacteurs sont la protéine CREB et la protéine EP300. Ce complexe transcriptionnel comprend aussi d'autres protéines, comme la GRIP-1 (GR interacting protein 1), le PCAF (P300/CBP associated factor), le SRC-1 (steroid receptor coactivator 1) et la HDAC (histone déacétylase) (Dejean & Richard 2013).

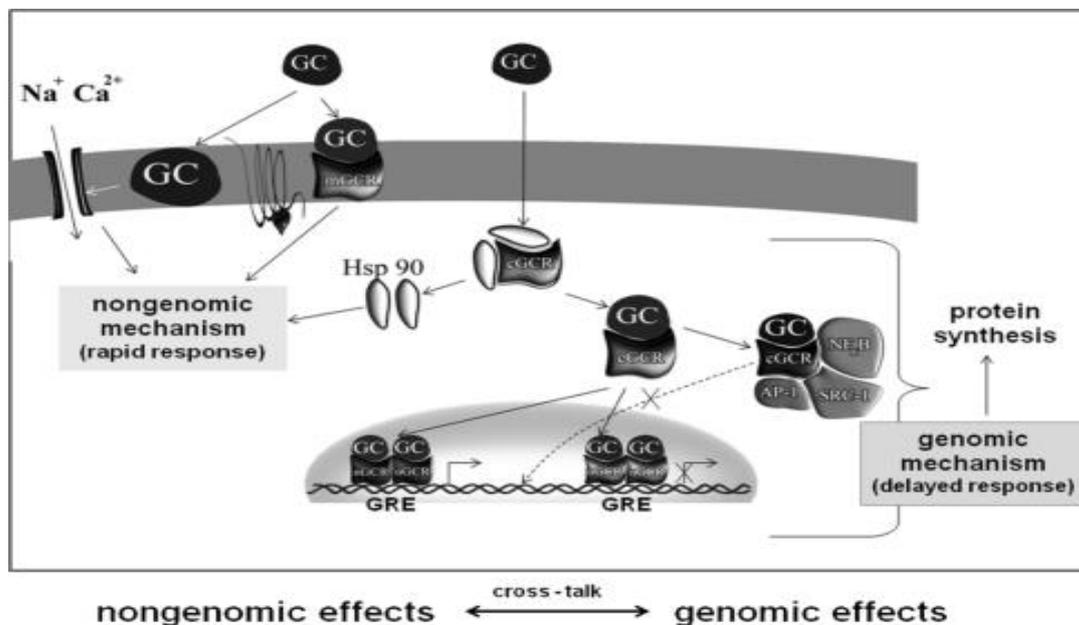
Il a également été montré que certaines actions des glucocorticoïdes ne passeraient pas nécessairement par une interaction directe avec l'ADN mais par des interactions protéine-protéine. Ainsi, les récepteurs actifs régulent, par ce type d'interaction, l'effet des complexes NF-KB (Nuclear Factor KB) et AP-1 (Activating Protein-1 (Croxtall *et al.* 2002; Roumestan *et al.* 2004; Payne & Freishtat 2012). D'autre part, dans les structures où les récepteurs MR et GR sont co-exprimés, comme l'hippocampe et l'hypothalamus, ils forment des homodimères MR/MR et GR/GR et des hétérodimères MR/GR (Stahn & Buttgerit 2008) qui peuvent activer les GRE (Trapp *et al.* 1994).

#### **b) Mécanisme non-génomique**

Les effets non génomiques des corticoïdes sont connus depuis peu (Figure 13). Ils se caractérisent par un début rapide et une courte durée (de quelques secondes à quelques minutes) (Groeneweg *et al.* 2011; Haller *et al.* 2008). En effet, les corticoïdes, qui sont des dérivés du

cholestérol, sont capables d'interagir directement avec la membrane cellulaire. Ces effets non génomiques, qui s'observent essentiellement avec de fortes doses, vont se traduire par un effet de stabilisation de membrane. Ainsi, ils peuvent réduire la libération d'enzymes lysosomiales et de granules préformés contenant en particulier des médiateurs de l'inflammation (histamine, sérotonine). Ces effets non génomiques ont aussi une action sur la régulation des échanges membranaires de calcium et de sodium et des flux d'AMP cyclique. Ces effets expliquent en partie l'inhibition de l'activité cellulaire observée avec les corticoïdes, en particulier pour les cellules de l'immunité comme les lymphocytes (Losel & Wehling 2003).

Il semble que les actions rapides des glucocorticoïdes soient médiées par des récepteurs membranaires de type MR et GR. De nombreux travaux, menés *in vitro et in vivo*, ont montré l'implication des MR membranaires en interaction avec des protéines G (Joëls *et al.* 2017).



**Figure 13:** Les mécanismes génomiques et non génomiques de base du GR. Après la liaison aux glucocorticoïdes dans le cytoplasme, les GR activés se dissocient de leurs protéines Hsp, et traversent la membrane nucléaire. Ils se dimérisent et régulent la transcription des gènes *via* l'interaction directe avec l'ADN via les GRE (Grzanka *et al.* 2011).

#### II.7.4. Régulation des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes jouent un rôle essentiel dans l'extinction du signal de stress pour maintenir l'homéostasie dans l'axe HPA. Des niveaux élevés de glucocorticoïdes réduisent la synthèse et la libération de CRH de l'hypothalamus et répriment la production de la pro-opiomélanocortine

(POMC), précurseur de l'ACTH et la libération d'ACTH dans l'hypophyse antérieure. Dans le NPV de l'hypothalamus, les glucocorticoïdes régulent l'expression de la CRH et de l'AVP (Dyck 2008). Le mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur l'axe HPA, agit sur différentes structures telles que l'hippocampe, le cortex préfrontal, l'hypophyse et l'amygdale. Ces structures expriment des récepteurs MR et GR dont l'activation module la sécrétion de la CRH et empêche la sécrétion d'ACTH. En effet, les glucocorticoïdes activent par le moyen de synapses glutamatergiques de neurones GABAergiques qui inhibent les neurones du NPV. Ce mécanisme d'inhibition existe également dans le cortex préfrontal médian (Smith & Vale 2006).

Au niveau basal, lorsque les niveaux de glucocorticoïdes sont diminués dans le plasma, les glucocorticoïdes occuperaient préférentiellement les MR. Alors que pendant le pic, les glucocorticoïdes occuperaient les MR et les GR. L'occupation différentielle des MR et GR est compatible avec les caractéristiques de liaison de ces récepteurs avec les glucocorticoïdes. L'activation des MR est indispensable à maintenir le rythme circadien basal puisqu'une administration d'un antagoniste MR, la spironolactone, augmente l'activité de l'axe HPA chez l'Homme (Deng *et al.* 2017; Slattery & Neumann 2008).

### **II.7.5. L'impact des glucocorticoïdes sur la mémoire**

Il est bien établi que les hormones glucocorticoïdes, sécrétées par le cortex surrénal après un événement stressant, influencent la performance cognitive. Certaines études ont révélé une amélioration de la mémoire induite par les glucocorticoïdes. Cependant, de nombreuses études ont signalé des effets néfastes des glucocorticoïdes sur la fonction mnésique (Lupien *et al.* 2007; Gomez-Sanchez 2014). Il semble que les conséquences de l'activation des glucocorticoïdes sur la cognition dépendent en grande partie des différentes phases de mémoire étudiées. L'activation post-entraînement des voies sensibles aux glucocorticoïdes impliquant des récepteurs glucocorticoïdes améliore la consolidation de la mémoire. De même, comme les effets de la catécholamine sur la consolidation de la mémoire, les influences des glucocorticoïdes sur ce processus dépendent de l'activation noradrénergique du complexe basolatéral de l'amygdale et des interactions avec d'autres régions du cerveau. En revanche, les processus de récupération de la mémoire sont généralement altérés par des niveaux circulants élevés de glucocorticoïdes ou après des infusions d'agonistes des récepteurs glucocorticoïdes dans l'hippocampe (Tsai *et al.* 2002).

Ces effets doubles des glucocorticoïdes sur la consolidation de la mémoire et la récupération de la mémoire pourraient être liés et le complexe basolatéral de l'amygdale est une structure clé dans un système de modulation de mémoire qui régule, de concert avec d'autres régions du cerveau, le stress et les effets des glucocorticoïdes sur la consolidation de la mémoire et la récupération de la mémoire (Kim *et al.* 2002).

En agissant sur l'amygdale, les glucocorticoïdes aident à améliorer la mémoire des événements émotionnellement pertinents grâce à ses liens avec l'hippocampe. Ce processus semble également dépendre de la dose : les niveaux intermédiaires de GC améliorent la consolidation de la mémoire, alors que les niveaux extrêmement bas ou élevés tendent à l'altérer (Roosendaal 2002).

### **II.7.6. Impact des Glucocorticoïdes sur la plasticité hippocampique:**

Dans l'hippocampe dorsal, l'induction de la LTP est diminuée chez les rongeurs exposés à un stress comportemental. De même, *in vivo* et *in vitro*, l'administration d'une forte dose de corticostérone produit des effets similaires (Conrad 2008). L'activation des glucocorticoïdes peut altérer la conductance calcique des neurones hippocampiques, modulant l'efficacité synaptique. La corticostérone entraîne une réduction de la LTP, qui serait liée à l'activation des GR intracellulaires. En contrepartie, la concentration modérée de corticostérone peut faciliter la LTP. Plusieurs études ont montré que l'activation rapide des MR cause une augmentation de la LTP, facilitant ainsi l'afflux d'informations liées au stress, de l'HV vers l'hypothalamus (Korz & Frey 2003). Dans l'amygdale, qui joue un rôle dans la formation du souvenir aversif, l'activation des GR augmente la conductance ionique des canaux calciques facilitant la LTP. Les GR pourraient avoir la même fonction au sein de l'HV, dans la formation de souvenirs d'évènements stressants (Whitlock 2006).

Dans la région CA, le stress peut favoriser la LTD par un mécanisme qui nécessite l'intervention des GR et leurs impacts sur les récepteurs NMDA. La corticostérone module la LTD de manière opposée dans l'hippocampe ventral et dorsal : alors que la LTD augmente dans l'HD, la LTP augmente dans l'HV (Gonzalez *et al.* 2016). Le stress et la corticostérone facilitent la LTD au sein de l'hippocampe dorsal au travers d'un mécanisme GR-dépendant. Le stress peut temporairement arrêter la voie cognitive de l'hippocampe pour faciliter la transmission de l'information émotionnelle vers l'amygdale, par le moyen de l'HV. Le stress facilite la manifestation de la LTD par l'intermédiaire des GR (Yang *et al.* 2003).

Les effets du stress sur la LTP et la LTD montrent que les glucocorticoïdes affectent l'excitabilité neuronale de l'HD et de l'HV de façon opposée. Par ailleurs, on observe que les récepteurs aux corticostéroïdes régulent autrement la LTP et la LTD dans l'hippocampe (Speksnijder *et al.* 2012). Cette régulation basée sur la concentration de corticostérone, est dépendante du temps et de la structure cérébrale (HD/HV). En condition normale, l'information prend la voie dorso-hippocampique, tandis que durant une expérience stressante, l'information prendrait la voie ventro-hippocampique (Kim *et al.* 2002).

## **II.8. La souris comme modèle génétique pour la carence en vitamine B12**

La souris est l'organisme modèle le plus utilisé dans la recherche biomédicale (Bond *et al.* 2013). Il est excellent pour les études génétiques parce qu'il est facile à entretenir, possède un génome bien caractérisé qui est similaire aux humains (99%) et permet de mimer plusieurs maladies humaines. Les modèles de souris génétiquement modifiés se sont révélés être un outil puissant dans l'étude de neuropathologies. La capacité de modifier génétiquement le génome de la souris en supprimant ou en remplaçant un gène spécifique a amélioré notre capacité à identifier et à valider les gènes cibles d'intérêt (Sacca *et al.* 2010).

Dans notre laboratoire, de nombreux travaux ont été réalisés ces dernières années, avec un accent particulier sur le manque de vitamines B9 et B12 et les résultats négatifs qui en résultent sur divers systèmes du corps. L'unité U954 a développé plusieurs modèles animaux. Le modèle le plus utilisé est le rat carencé en donneurs de méthyle : les rats femelles sont nourris avec un régime déficient en vitamines B9 et B12, un mois avant l'accouplement, pendant la grossesse puis la période d'allaitement.

Nous utilisons également un modèle de souris transgénique invalidée au niveau du gène *CD320*, (codant pour le récepteur membranaire TCblR / *CD320* du complexe cobalamine/transcobalamine), a été générée à l'aide du système *gene-trap*. Chez ce modèle de souris, une carence sévère en vitamine B12 est observée spécifiquement dans le cerveau. Le TCblR / *CD320* est nécessaire pour l'absorption de la Cbl liée à la transcobalamine (TC) dans les cellules (Quadros *et al.* 2008). Ces souris transgéniques ont un développement normal. Les études menées sur ce modèle ont montré que la carence en cobalamine provoque des taux élevés de HCY et d'acide méthylmalonique (MMA) dans le sérum et dans le cerveau. La maladie du système nerveux central résultant d'une carence en vitamine B12 chez les humains peut ne pas apparaître dans ce modèle de souris (Lai *et al.* 2013).

## CHAPITRE III : OBJECTIFS DE TRAVAIL

Le développement normal du cerveau nécessite la disponibilité de certains nutriments importants tels que les vitamines B9 et B12. Ces vitamines jouent un rôle dans la production de produits chimiques du cerveau qui affectent l'humeur et d'autres fonctions cérébrales. Par conséquent, de faibles niveaux de B12 et d'autres vitamines B telles que la vitamine B6 et l'acide folique peuvent affecter négativement la fonction cérébrale (de Jager 2014). La carence en donneur de méthyle a un impact sur le cerveau ainsi que sur le métabolisme révélé par les marqueurs du foie et du cœur (Obeid 2013). Les données antérieures sur le fonctionnement du cerveau ont été attestées par des modifications comportementales (Blaise *et al.* 2007). Ainsi, afin d'étudier davantage les mécanismes pathophysiologiques liés à une carence en vitamine B12, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique impliquant une ablation du gène CD320 (exprimer le récepteur membranaire TCbIR / CD320 pour la cobalamine transcobalamin (TC) (Cbl) développé par L'équipe du Pr. Edward Quadros (SUNNY downstate institute, New York).

Dans ce modèle de souris, une carence sévère en vitamine B12 est observée spécifiquement dans le cerveau, accompagnée d'une accumulation d'homocystéine et d'une diminution de l'indice de méthylation (Lai *et al.* 2013). Nous proposons d'utiliser ce nouveau modèle de souris, spécifiquement affecté par la déficience du cerveau pour répondre aux questions suivantes :

1) Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la carence en vitamine B12 au niveau cérébral ? Pour cela, la performance comportementale, y compris les fonctions d'apprentissage et de mémoire, a été évaluée à l'aide de différents tests spécifiques en conformité avec une approche structure / fonction

2- Quelles sont les conséquences épigénomiques de la carence en vitamine B12 du cerveau ? L'expression de divers récepteurs et voies nucléaires a été déterminée par des techniques classiques (c'est-à-dire Western blot et immunohistochimie) par rapport aux données antérieures obtenues dans un modèle de rat nutritionnel.

En fin, pouvons-nous déterminer les gènes, les protéines et les voies affectées par la carence en vitamine B12 du cerveau, donc établir une relation entre ces acteurs moléculaires et les fonctions comportementales médiatisées par le cerveau ? L'étude de ces mécanismes pourrait fournir des cibles moléculaires pour des traitements putatifs dans certains troubles neurologiques dans les populations touchées par la carence en B12.

## CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

## **IV.1. Modèle animal**

### **IV.1.1. Les animaux**

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé des souris génétiquement modifiées (*CD320*) mâles et femelles jeunes (âge :  $10.37 \pm 2.6$  semaines) qui sont nées dans notre propre élevage au laboratoire.

Les cellules souches embryonnaires de ces souris ont été générées par la technologie dite du « gene trap » au Sanger Institute et les souris mutantes ont été générées au Mouse Genome Center, University of California–Davis (Davis, CA, USA).

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) de souris TCb1R-KO (+/-) générées au Welcome Trust Sanger Institute (Londres, Royaume-Uni) ont été obtenues auprès du Mouse Genome Center, de l'Université de Californie-Davis (Davis, CA, ETATS-UNIS). Le vecteur pGT01xft2 contenait le squelette pUC et la séquence de ciblage insérée en amont du gène  $\beta$ -geo codant pour une protéine de fusion non fonctionnelle et une queue poly (A). L'insertion de la cassette piège dans l'intron1 entre les exons 1 et 2 du gène *CD320* a été confirmée par une analyse de séquence. Six clones de cellules souches, sélectionnés par un antibiotique spécifique, ont été injectés dans des blastocystes de souris C57BL/6 (albinos), injectés dans l'utérus de mères porteuses. Ceci a donné naissance à des souriceaux dits "chimériques", qui ont été croisés avec des souris sauvages pour déterminer si ces chimères transmettaient efficacement le transgène à la descendance. Les descendants hétérozygotes (*CD320 +/-*) résultants ont été croisés pour produire des *CD320 -/-* embryons. Ces souris sont déficientes pour le gène *CD320* qui code pour une protéine membranaire qui est un récepteur du transporteur Transcobalamine II, lié à la vitamine B12.

### **IV.1.2. Conditions d'élevage**

Les souris sont élevées dans une animalerie à une température contrôlée de 22-23°C avec un cycle lumière/obscurité de 12h-12h, avec une humidité contrôlée. Les souris disposent d'un accès illimité à l'eau et à la nourriture. Toutes les manipulations ont été effectuées conformément aux lignes directrices et aux règles du Comité National de Réflexion d'Ethique sur l'Expérimentation (décrites dans le « Guide for care and use of laboratory animals » NIH, MD, 1985).

Le numéro d'agrément de notre établissement utilisateur d'animaux à des fins scientifiques est n°B54-547-26, renouvelé le 17/11/2016 par l'arrêté préfectoral n° 16-DDPP-152, la Direction départementale de la protection des populations, Meurthe et Moselle, France.

### IV.1.3. Prélèvement et traitement d'organes (Fiche 1)

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (B506, Forane®, Abbott). Dès qu'elles n'ont plus de réflexe, les souris sont décapitées à la guillotine et le sang ainsi que le cerveau sont recueillis afin d'effectuer les analyses biochimiques ainsi que les études immunohistochimiques.

### IV.2. Génotypage par PCR (Fiche 2)

Afin d'établir les génotypes exacts des souris, l'ADN génomique peut être obtenu à partir de souris utilisant un morceau de queue et l'extraction est réalisée à l'aide d'un kit (KAPA Mouse genotyping kit) (Biosystem, KB7101).

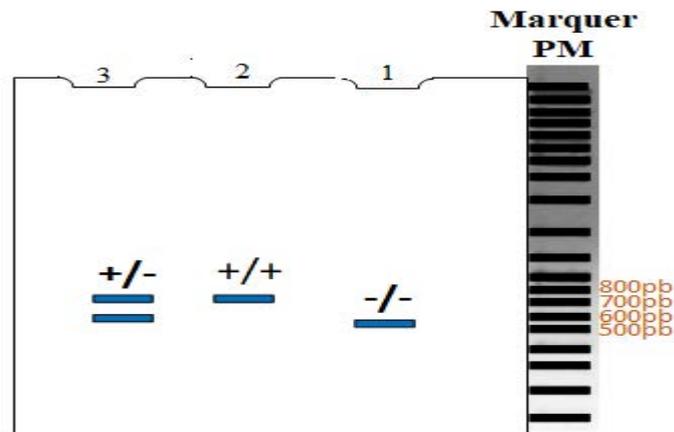
La PCR est réalisée selon les recommandations du fabricant, à l'aide du kit KAPA mouse genotyping kit (KAPA BiosysteMTR, KK7302). Ce kit est constitué d'une polymérase, de dNTP à 0,2 mM chacun, du cofacteur de l'enzyme : MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) et d'un stabilisateur. Ensuite, on ajoute les amorces adéquates (0,5 μM), l'eau et 1 μL d'ADN extrait. L'amplification est effectuée dans un thermocycler (Icycler, Biorad) selon le programme suivant :

**Nombre de cycles = 35**

<b>Conditions :</b>	Dénaturation Initiale	94°C	3 min	} X 35
	Dénaturation	94°C	22 sec	
	Hybridation	60°C	22 sec	
	Elongation	72°C	33 sec	
	Elongation finale	72°C	3 min	
		10 °C	Infini	

La migration est réalisée par électrophorèse à 110V pendant 50 minutes dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE).

La révélation s'effectue ensuite sous lampe UV (Imagemaster VDS) qui va révéler la présence de Bromure d'éthidium (BET) (Eurobio, GEPBET000M), agent intercalant de l'ADN incorporé dans le gel lors de sa polymérisation. Les fragments PCR amplifiés ont une taille de 736 pb (WT), et 549 pb (KO).



**Figure 14:** schéma représentant le génotypage des souris. La taille des fragments attendus pour les souris CD320. +/- (hétérozygote), +/+ (Wild type), -/- (Knock out).

### IV.3. Profile biochimique

#### IV.3.1. Mesure de la concentration en protéines (Fiches 3 &4)

Avant de procéder à toute mesure, il est impératif de connaître la concentration en protéines de l'homogénat. Ce dosage est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA protein Reagent.

##### Principe :

La concentration en protéines dans les essais a été mesurée par la méthode colorimétrique à l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode combine la réduction des ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en ions cuivreux ( $\text{Cu}^{+}$ ) en présence de liaisons peptidiques des protéines en milieu alcalin, à une détection colorimétrique d'une grande sensibilité de l'ion  $\text{Cu}^{+}$  en présence de BCA. La coloration violette est obtenue par l'interaction de 2 molécules de BCA avec un ion cuivreux. Cette coloration est proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon. La réaction est linéaire jusqu'à 2mg/ml. L'absorbance est lue à 570 nm.

### **IV.3.2. Electrophorèse et immunoblot (Fiche 5 &6)**

Pour étudier l'expression des protéines GR, EGR1, PGC1, SYN I & II, PRMT1, nous avons réalisé des Western blot.

#### **Principe :**

C'est une technique reconnue qui est utilisée pour identifier une protéine contenue dans un échantillon contenant plusieurs protéines. Cette technique est basée sur une méthode de séparation des protéines selon leur taille dans un gel de polyacrylamide. Nous avons réalisé des électrophorèses discontinues en conditions dénaturantes, c'est-à-dire en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui confère à toutes les protéines une charge négative permettant ainsi leur séparation en fonction d'un seul critère : le poids moléculaire. Nous avons utilisé la GAPDH comme protéine de référence pour normaliser l'expression des protéines d'intérêt à l'aide du logiciel Image J. Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaires et secondaires peuvent être réincubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées.

### **IV.3.3. Marqueurs nutritionnels et métabolites**

Les marqueurs nutritionnels concernant notre étude sont les vitamines B9 et B12 ainsi que d'autres métabolites du cycle de la méthionine comme l'Hcy, la SAM et la SAH.

#### **I. Dosage de la vitamine B12 et les folates (Fiche 8)**

##### **Principe :**

La vitamine B12 et les folates de l'échantillon (non marqués) entrent en compétition avec leurs homologues marqués (vitamine B12 [57Co] et folates [125I]) vis-à-vis d'un nombre restreint et constant de sites de fixation. Par conséquent, le taux de radioactivité liée est inversement proportionnel à la concentration de l'échantillon. Grâce à cette technique, les taux de vitamine B12 et de folates sont déterminés simultanément dans un seul tube.

#### **II. Dosage de l'homocystéine, acide méthylmalonique et acide succinique (Fiche 9)**

##### **Principe :**

La concentration de l'Hcy est mesurée par une technique de chromatographie liquide à ultra-haute performance (HPLC) couplée à la détection par spectrométrie de masse en mode *multi reaction monitoring* (MRM) positif. L'Hcy liée aux protéines est libérée par ajout d'un

réducteur (DTT). Les protéines sont précipitées au méthanol. Les standards internes deutérés sont ajoutés et quelques  $\mu\text{L}$  sont injectés dans l'HPLC. La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage en plasma et à ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante. Le dosage des autres métabolites a été réalisé par Chromatographie Liquide à Haute Performance en collaboration avec le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU de Nancy-Brabois.

### **III. Marquage d'immunohistofluorescence (Fiche 10)**

#### **Principe :**

Après perméabilisation des cellules et blocage des sites aspécifiques, les coupes de tissus sont incubées en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine recherchée. Ensuite on utilise un deuxième anticorps (secondaire) conjugué à une sonde fluorescente, reconnaissant les immunoglobulines de l'espèce productrice de l'anticorps primaire.

### **IV. Duolink (Fiche 11)**

#### **Principe :**

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

## IV.4. Analyses comportementales

### IV.4.1. LABYRINTHE AQUATIQUE MULTI-T (Fiche 12)

#### Principe :

Ce dispositif combine les caractéristiques du labyrinthe aquatique de Morris et du labyrinthe multiple T. Ce test permet d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes chez l'animal dans une situation aversive (l'eau d'un bassin). Il est basé sur les aptitudes des individus à mémoriser un parcours dans lequel ils naviguent en fonction de repères environnementaux (non contrôlés par l'expérimentateur).

Le dispositif expérimental de ce test est constitué d'une piscine en verre de forme quadrant (1 x 1m), rempli sur 25cm de hauteur d'eau rendue opaque par l'ajout de 50 ml de lait concentré. La température de l'eau est maintenue à 22°C. Le Point de sortie est une échelle en plastique gris opaque installé à l'extrémité du labyrinthe. La piscine se situe dans une pièce maintenue à 21-22°C et comprenant des indices visuels accrochés sur le mur entourant la piscine à 0,5 m de la piscine. Le trajet effectué par l'animal dans la piscine est filmé à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur qui numérise ce trajet et l'enregistre grâce à un logiciel. Les différentes variables mesurées sont : Le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un bras impasse ou dans un bras déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »), La latence d'atteinte de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans le bras d'arrivée), La distance parcourue et La vitesse de nage.

Le test est un succès lorsque les souris rejoignent la sortie sans avoir visité de voies sans issue ou sans être revenu en arrière.

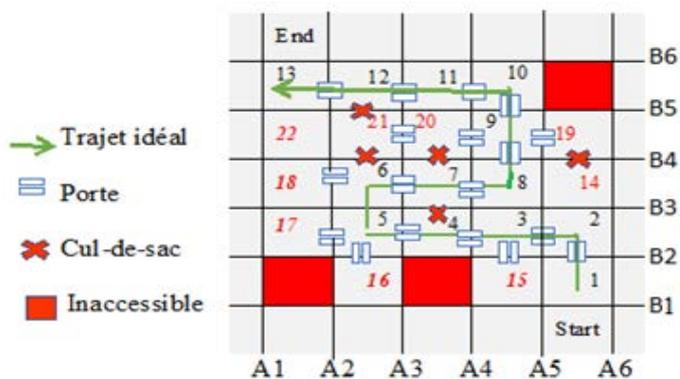
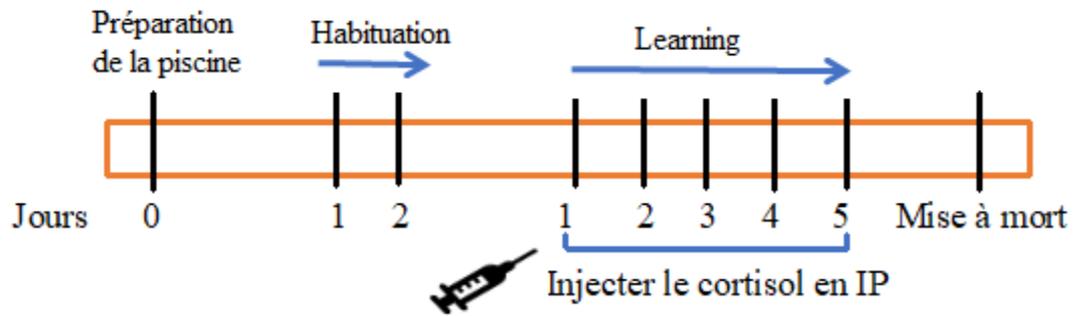


Figure 15 : Schéma du labyrinthe aquatique multi-t (Learning protocole 1)

La souris est déposée dans la case "start", elle ne peut aller dans les cases ■, mais peut nager dans les cases "cul-de-sac" ✘ (sources d'erreurs), ce qui l'éloigne de son trajet idéal → et rallonge son temps de sortie ("End").

Le protocole expérimental mis en place dans le cadre de l'étude *in vivo* est présenté figure ci-dessous :



**Figure 16 :** Représentation schématique du Protocole CD320/cortisol. Ce protocole se compose de deux étapes, l'habitation pour deux jours consécutifs suivie par la deuxième étape (Learning), dans laquelle les animaux sont injectés avec de la cortisol pendant cinq jours consécutifs

#### IV.4.2. Le test de l'open field (L'espace ouvert) (Fiche 13)

##### Principe :

Ce test analyse le comportement exploratoire du rongeur dans une enceinte close. Traditionnellement, On l'utilise pour évaluer de comportement d'un animale vis-à-vis d'un environnement nouveau, son fonctions motrices, mais aussi son l'état émotionnel.

Un animal anxieux évite le centre ouvert, et reste près la périphérie de l'appareil. Les variables mesurées sont l'activité ambulatoire totale, le nombre d'entrées et le temps passé dans l'aire centrale, Le nombre de fèces est aussi relevé.

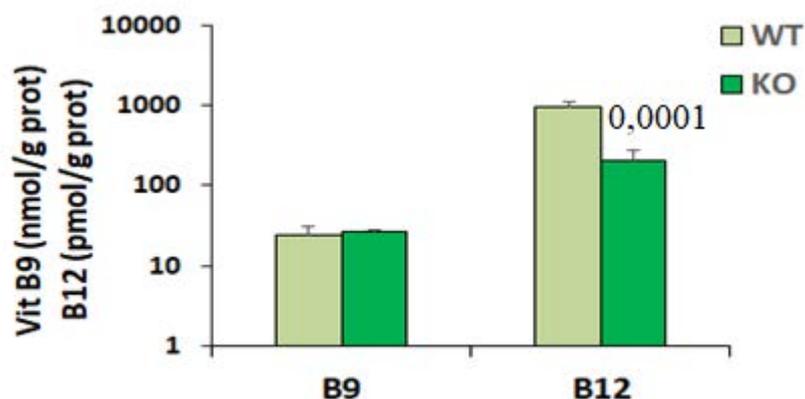
L'appareil constitués d'une arène circulaire de 1 m de diamètre avec une hauteur 35 cm. Le sol est constitué d'une plaque en verre sur laquelle a été dessiné au centre un cercle dit central de 50 cm laissant apparaitre entre ce cercle et les murs du dispositif un cercle dit périphérique de 100 cm. Plusieurs lignes radiales traversent les deux zones divisant l'arène en 8 quartiers périphériques et 8 quartiers centraux.

## CHAPITRE V : RESULTATS

## V.1. Caractérisation biochimique du modèle : concentrations en vitamines B9, B12, de l'homocystéine et des déterminants de son métabolisme dans l'hippocampe.

Les souris TCbIR / CD320 KO (notées KO) n'expriment pas le récepteur de la transcobalamine fonctionnel, donc l'absorption cellulaire de la vitamine B12 par cette voie n'est pas possible. En conséquence, l'appauvrissement de la vitamine B12 se produit dans le cerveau des souris TCbIR / CD320 KO contrairement au cerveau des souris Wild Type (notées WT) qui présentent une expression normale de TCbIR (Quadros *et al.* 2008).

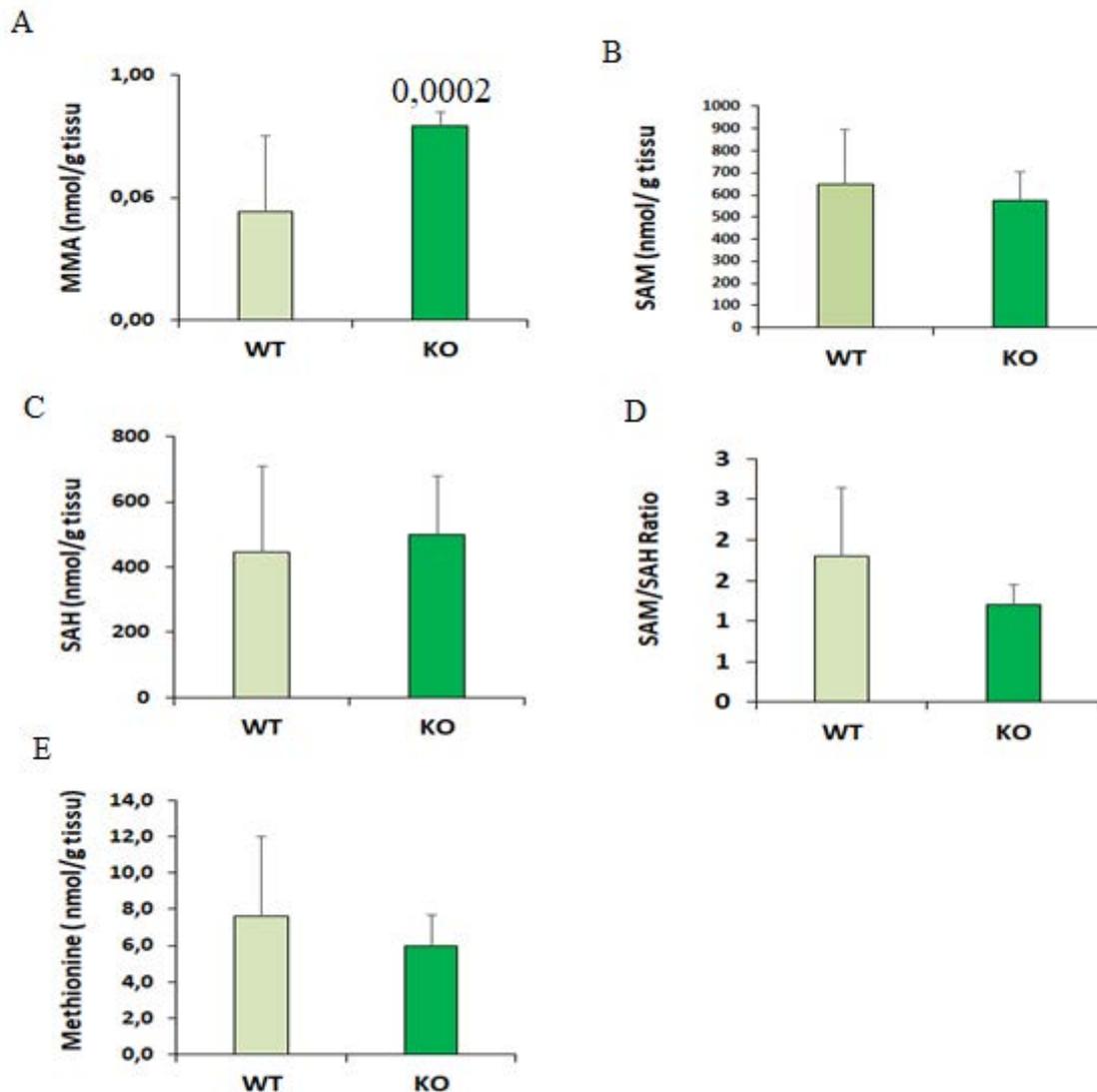
Les niveaux de folate, de vitamine B12 et d'homocystéine ont été mesurés dans les extraits de l'hippocampe des souris TCbIR / CD320 KO et comparés à ceux des souris témoins. Comme prévu, la concentration de vitamine B12 chez les souris TCbIR / CD320 KO est significativement réduite par rapport aux souris WT (respectivement  $207,70 \pm 64,01$  pmol / g et  $954,16 \pm 150,196$  pmol / g ( $p < 0,0001$ )). En revanche, il n'y a aucune différence au niveau de la concentration en vitamine B9 ( $24,41 \pm 6,02$  nmol/g tissu pour les WT et  $26,61 \pm 1,84$  nmol/g tissu pour les souris KO), (Figure 17).



**Figure 17** : Concentrations en vitamines B9 et B12 dans l'hippocampe. Sur ce graphique, on constate une diminution significative de la concentration en vitamine B12 chez les souris KO par rapport aux souris WT, cependant les niveaux de vitamine B9 sont équivalents chez les deux types de souris. Les données représentent les moyennes  $\pm$  écart-types. Test ANOVA, ( $***p < 0,0001$ ).

Les concentrations des déterminants du métabolisme de l'homocystéine (noté HCY) ont également été mesurées dans les hippocampes. Pour l'acide aminé HCY, nous ne sommes pas en mesure d'obtenir des valeurs, pour des raisons techniques propres à l'extraction difficile de

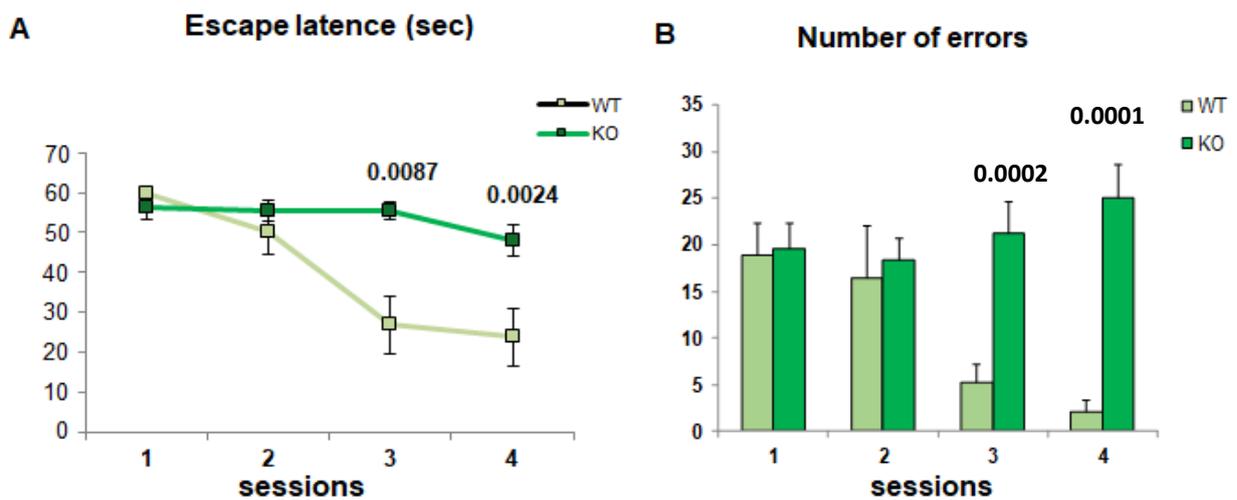
ce composé au sein des tissus. Cependant, nous observons une augmentation significative du niveau d'Acide Méthyl-Malonique (noté MMA) dans les hippocampes de souris KO (Fig. 18A,  $p < 0.0002$ ). Les niveaux de S-Adénosine Méthionine (notée SAM), de méthionine ont tendance à diminuer (Figure 18 B, E), comme le rapport S-Adénosine Méthionine / S-Adénosine Homocystéine (noté SAM / SAH) (Figure 18 D), Le taux de SAH a tendance lui à augmenter sans pour autant présenter de significativité.



**Figure 18** : Analyse des principaux métabolites dans les tissus de l'hippocampe. Les niveaux d'Acide Méthyl-Malonique MMA (A), de S-Adésonyl Méthionine SAM (B), S-Adésonyl Homocystéine SAH (C) le rapport SAM / SAH (D), méthionine (E) et sont représentés. Parmi les métabolites cités précédemment, seuls les niveaux de MMA augmentent significativement chez les souris KO par rapport aux souris WT. Les données représentent les moyennes  $\pm$  écart-type. Test ANOVA, ( $*p < 0,05$ ), ( $**p < 0,01$ ).

## V.2. Les souris KO enregistrent des performances cognitives inférieures aux contrôles, mais un stress modéré normalise les performances.

Afin d'étudier les performances dépendantes de l'hippocampe, nous avons effectué un test de labyrinthe aquatique. Les données comportementales sont représentées sur la figure 19. L'analyse des résultats après 4 sessions consécutives d'apprentissage a montré que les souris KO (déficientes en B12 dans le cerveau) avaient une latence de sortie du labyrinthe plus longue et un nombre d'erreurs commises plus élevé que les souris WT témoins (figure 19A et B).

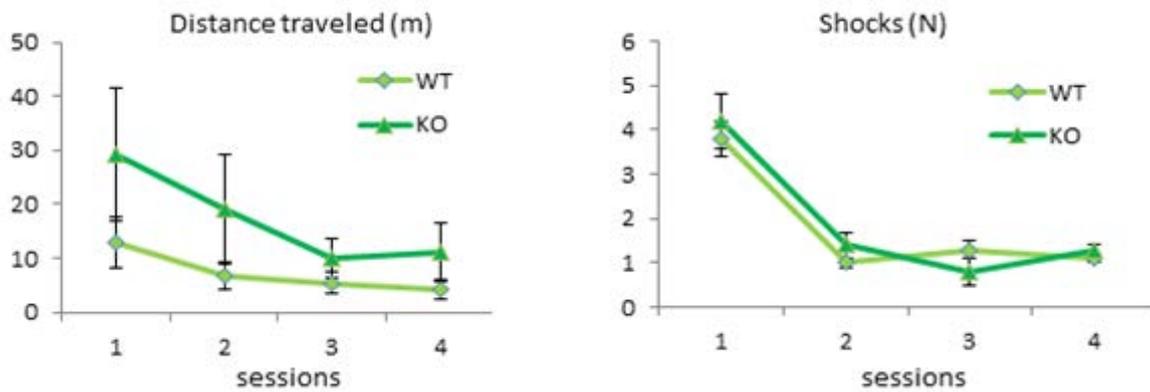


**Figure 19** : Principaux paramètres obtenus dans le test du labyrinthe aquatique pour les souris wild-type (WT) et knock-out CD320 (KO) (A, B). Aucune différence n'a été enregistrée entre les mâles et les femelles dans chaque groupe. Donc, les données ont été regroupées pour chaque sexe. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. ; N = 6 à 9/ groupe. Test ANOVA, différence entre animaux wild-type et knock-out.

Les résultats décroissants, obtenus pour chaque paramètre chez les souris WT selon les sessions, montrent des capacités croissantes pour apprendre à échapper au labyrinthe, au contraire des souris KO.

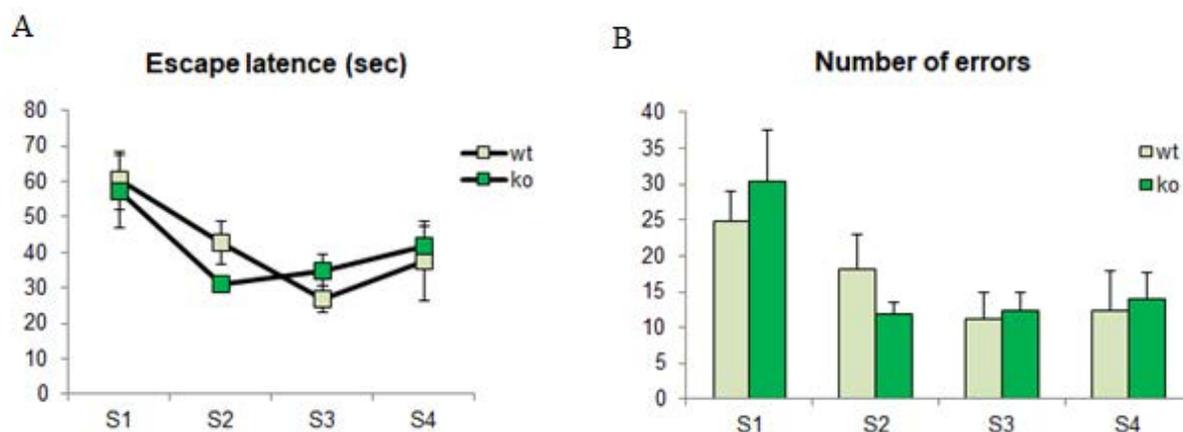
Nos résultats cognitifs d'apprentissage se démarquaient de ceux obtenus par nos collaborateurs sur ce modèle ; l'équipe du Professeur Edward Quados (SUNNY Downstate Institut, New-York). En effet, un test cognitif différent a été utilisé par nos collègues américains, pour étudier les mêmes performances d'apprentissage dépendantes de l'hippocampe (test d'évitement passif). Ce test utilise un stimulus consistant en un choc électrique au niveau des pieds comme motivation pour apprendre à échapper au stimulus. A la différence de celui réalisé dans le labyrinthe aquatique, ici, les souris KO étaient capables de rejoindre les capacités cognitives

des souris témoins. (Figure 20). Cette différence de résultat entre les deux tests cognitifs nous a amené à l'hypothèse de l'influence de l'axe du stress dans la modulation de la fonction d'apprentissage hippocampo-dépendente.



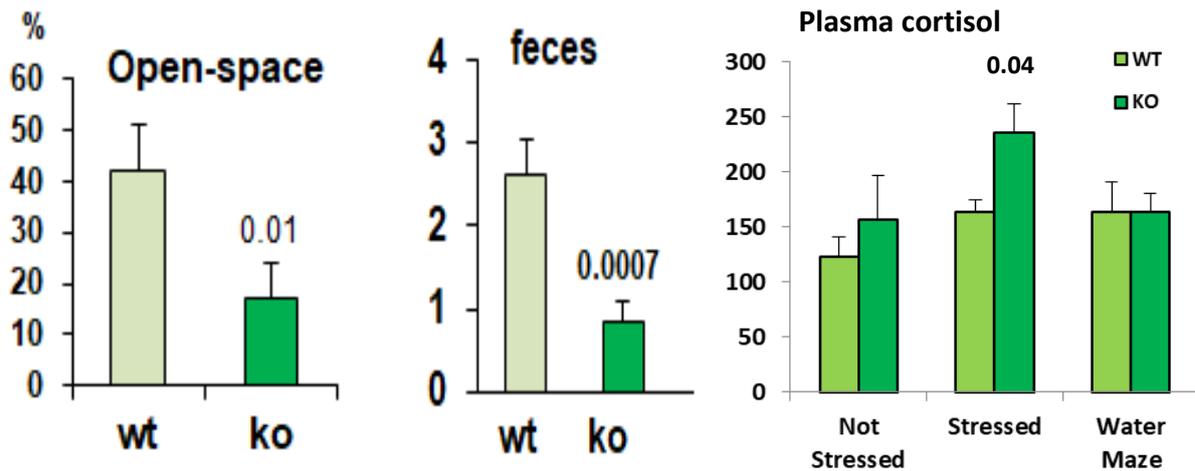
**Figure 20** : Principaux paramètres obtenus dans le test d'évitement passif des chocs électriques pour les souris sauvages (WT) et knock-out CD320 (KO). Ces données ont été obtenues par l'équipe du Prof. Edward Quadros (New-York, USA). Aucune différence n'a été enregistrée entre les mâles et les femelles dans chaque groupe. Donc, les données ont été regroupées pour chaque sexe. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. ; N=10/groupe. Aucune significativité statistique n'a été obtenue Test ANOVA

Afin de tester le rôle putatif du stress et des corticoïdes dans la régulation de l'apprentissage dépendant de l'hippocampe, nous avons injecté des doses physiologiques d'hydrocortisone (8 mg / kg / jour I.P.) dans les souris WT et les souris KO juste avant d'effectuer à nouveau le labyrinthe aquatique. Les résultats ont montré une normalisation des performances puisque les latences d'évasion et le nombre d'erreurs obtenues par les deux groupes de souris n'étaient pas significativement différents. En outre, les deux groupes ont montré une diminution de chaque paramètre mesuré indiquant un apprentissage efficace selon des sessions successives (figures 21A et B).



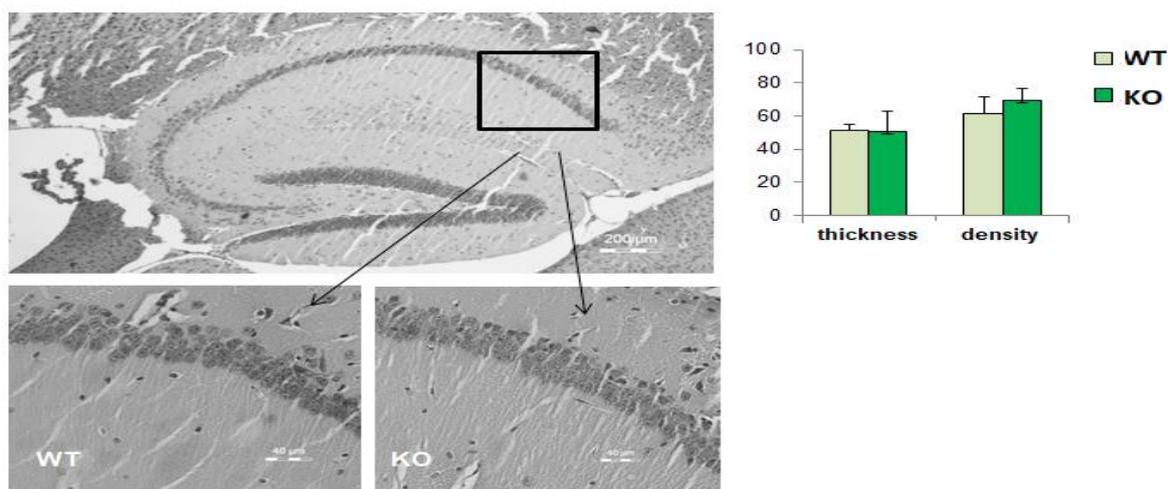
**Figure 21** : Les paramètres principaux obtenus dans le test du labyrinthe aquatique pour les souris de type sauvage (WT) et knock-out CD320 (KO) après l'injection d'hydroxycortisone. Aucune différence n'a été enregistrée entre les mâles et les femelles dans chaque groupe. Donc, les données ont été regroupées pour chaque sexe. Les données représentent la moyenne  $\pm$  S.D. ; N = 6/ groupe. Aucune significativité statistique n'a été obtenue (Test ANOVA)

L'hypothèse de l'implication de l'axe du stress et plus particulièrement des corticoïdes semble être confirmée à la fois par des résultats comportementaux et histopathologiques. En effet, en utilisant un test de champs ouvert, nous avons montré que les souris KO présentait essentiellement (c'est-à-dire sans stimulation) un niveau de stress plus faible puisqu'elles ont passé une partie significativement moins importante du temps à rester dans les zones non protégées par rapport aux souris témoins WT (figure 22). De plus, les souris KO produisent significativement moins de fèces dans les situations comportementales que les souris WT; ce qui représente également un indice de niveau de stress basal plus faible chez les KO. Enfin, un dosage plasmatique du cortisol circulant montre que les souris WT et KO produisent le même niveau de cortisol en situation non-stressante (prélèvement réalisé dans leur boîte d'élevage). Un dosage réalisé immédiatement après la 5eme session du test du labyrinthe aquatique montre également que les niveaux de cortisol sont équivalents entre WT et KO; et que ce labyrinthe n'engendre pas plus de stress qu'une situation en boîte d'élevage. Mais lors d'une situation de stress, comme par exemple la stimulation par choc électrique, les souris KO produisent significativement plus de cortisol que les souris WT (figure 22).



**Figure 22 :** L'évaluation des indicateurs de stress. Le paramètre présence dans la zone la plus protégée (près des parois) du test de l'Open-field est présenté (panneau de gauche). Le nombre de fécès produits pendant les 5min du test est présenté (panneau du milieu). Les dosages du cortisol plasmatique dans 3 situations sont présentés (panneau de droite: "not stressed" = prélèvement sanguin par anesthésie douce dans la boîte d'élevage; "stressed" = prélèvement sanguin 15min après un choc électrique aux pattes des souris; "Water maze" = prélèvement sanguin 15min après la 5eme session dans le labyrinthe aquatique).

Ce résultat montre que les souris KO ne répondent pas au stress environnemental de la même façon que les souris témoins. Cependant, il nous fallait vérifier que la réduction des performances cognitives chez les KO n'était pas en relation avec des différences d'intégrité tissulaire, comme un nombre plus faible de neurones hippocampique par exemple. Mais une étude histologique sur des coupes d'hippocampe a montré que la zone CA1 de l'hippocampe notamment ne présentait aucun changement structurel, ni en épaisseur de couche cellulaire, ni en densité de cellules, entre les souris KO et les souris témoins WT (figure 23).



**Figure 23 :** La forme générale de la zone CA1 ne peut pas expliquer la différence des performances cognitives en l'absence d'injection de cortisol (épaisseur en  $\mu\text{m}$ , densité dans la cellule /  $104\mu\text{m}^2$ ). Les données représentent des moyennes  $\pm$  S.D. Test ANOVA, différence entre animaux wild-type (WT) et knock-out (KO).

### V.3. L'expression du récepteur des glucocorticoïdes (GR) est légèrement réduite chez les KO

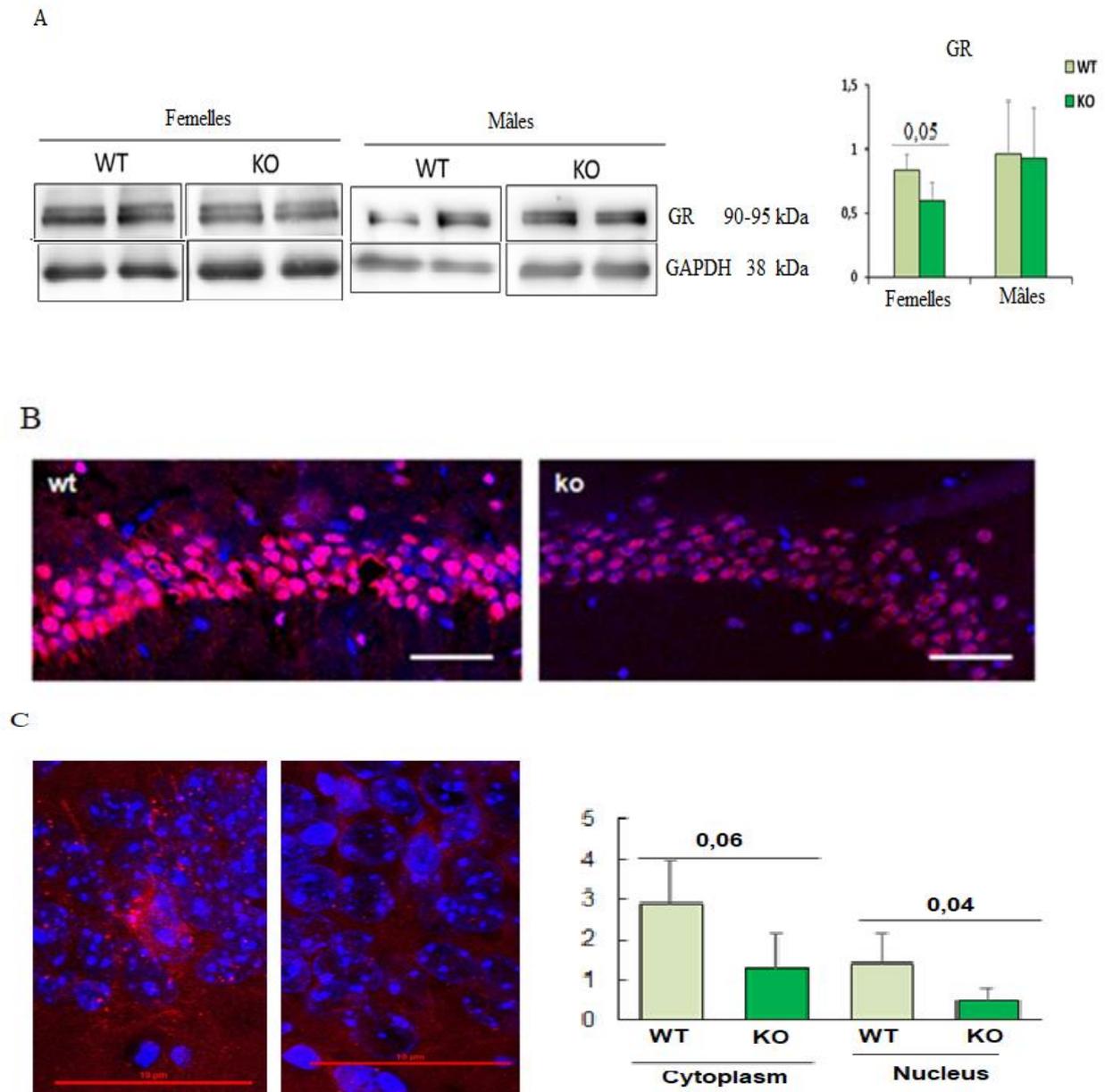
#### Analyse par western-blot

En utilisant la technique du western-blot, nous avons étudié le niveau d'expression de GR dans l'hippocampe. Chez les femelles KO, le profil électrophorétique (Figure 24A) montre une légère diminution (significative) par rapport aux témoins WT. Alors que chez les souris mâles, aucune différence significative entre WT et KO n'a été mesurée pour GR.

#### Analyse par immunofluorescence

Chez les souris KO, l'immunomarquage de GR sur les coupes d'hippocampe a révélé que la protéine est moins présente dans les noyaux (figure 24B). Ceci est confirmé par l'expérimentation en Duo-link, une technique plus spécifique, dans laquelle une interaction fermée (inférieure à  $9,10^{-4} \mu\text{m}$ ) entre deux protéines peut être quantifiée sous fluorescence. Ainsi, la quantité de dimérisation GR-GR est légèrement mais significativement réduite dans

les noyaux des cellules hippocampiques des souris KO par rapport aux souris témoins WT. (Figure 24 C).



**Figure 24** : Expression et localisation du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans les extraits et les coupes d'hippocampes de souris. A) Western blots de GR dans des extraits d'hippocampe avec une analyse densitométrique (panneau droit, WT (wild-type, + / +) et KO (knock-out, - / -)). B) immunomarquage de GR dans les coupes hippocampiques (la zone CA1 est représentée au grossissement x 60, la barre représente 50 µm) N = 4 à 5 par groupe. C) Quantification de la dimérisation des GR dans les cellules CA1 de l'hippocampe par la technique Duo-link (unités = points de dimérisation moyens). Les données représentent les moyennes ± S.D. Les valeurs *P* sont indiquées (ANOVA suivies de l'analyse post-hoc de Fischer).

#### **V.4. La plasticité neuronale implique des protéines clés conduisant à des effecteurs en aval au niveau de la synapse**

Comme déjà montré dans notre laboratoire et par d'autres équipes REF, nous avons étudié dans l'extrait d'hippocampe le niveau d'expression des protéines clés connues pour être impliquées dans l'activité synaptique. Nos résultats montrent que l'expression du co-activateur PGC1 $\alpha$  est significativement inférieure chez les souris KO. Cette expression réduite est associée à un marquage plus faible des noyaux et à un marquage plus important à l'extérieur des noyaux dans les neurones CA1 de l'hippocampe des souris KO (figures 25A et B).

Les mécanismes sous-jacents aux anomalies neuro-comportementales ont été examinés plus avant en étudiant les changements dans l'expression des protéines synaptiques. Parmi les protéines mises en évidence par une analyse protéomique sur un autre modèle animal utilisé au laboratoire (modèle de carence nutritionnel chez le rat (Pourié *et al.* 2015)), le changement majeur a été observé pour la synapsine I et la synapsine II, des protéines qui jouent un rôle central dans la neuroplasticité fonctionnelle.

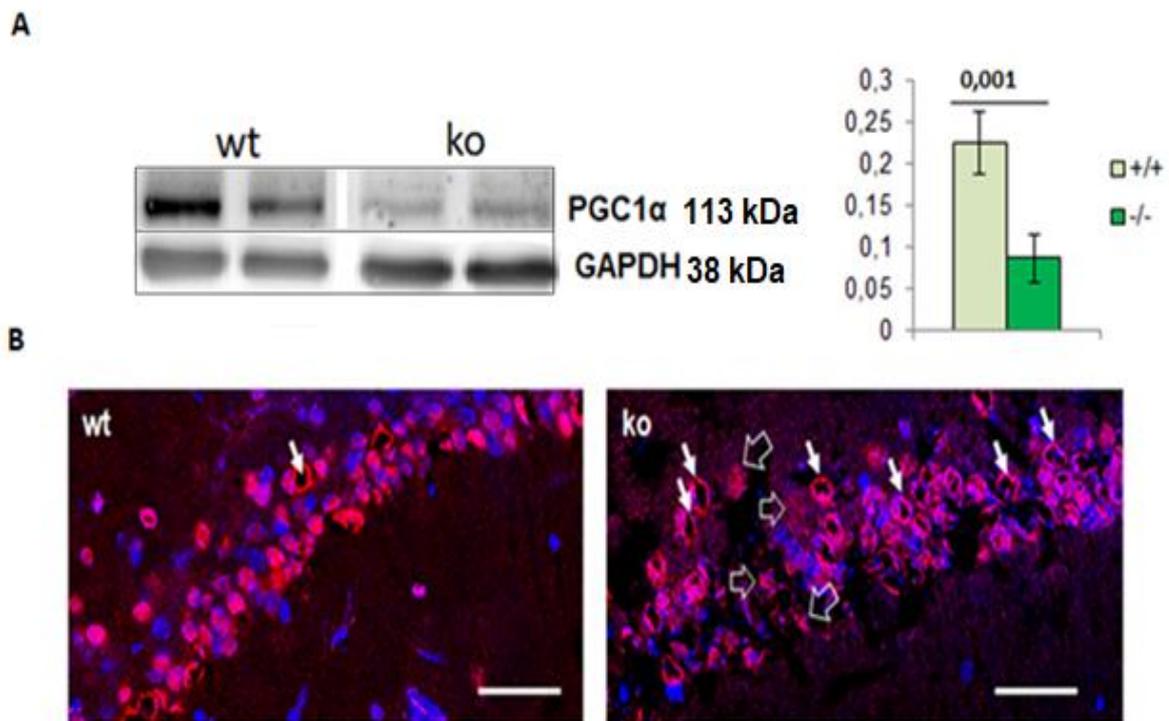
En utilisant la technique du Western Blot, nous avons comparé l'expression des synapsines (Syn I, Syn II 55 et 75-kDa) dans l'extrait d'hippocampe. Nous avons trouvé que les intensités des bandes diminuent de manière significative ( $0,699 \pm 0,095$ ) et ( $0,167 \pm 0,053$ ) pour Syn I et Syn II 55 respectivement dans les échantillons issus des souris femelles KO par rapport aux WT ( $1,573 \pm 0,202$ ) et ( $0,275 \pm 0,065$ ) respectivement. Alors que pour la syn II 75, aucune différence significative n'a été observée entre les souris KO et WT.

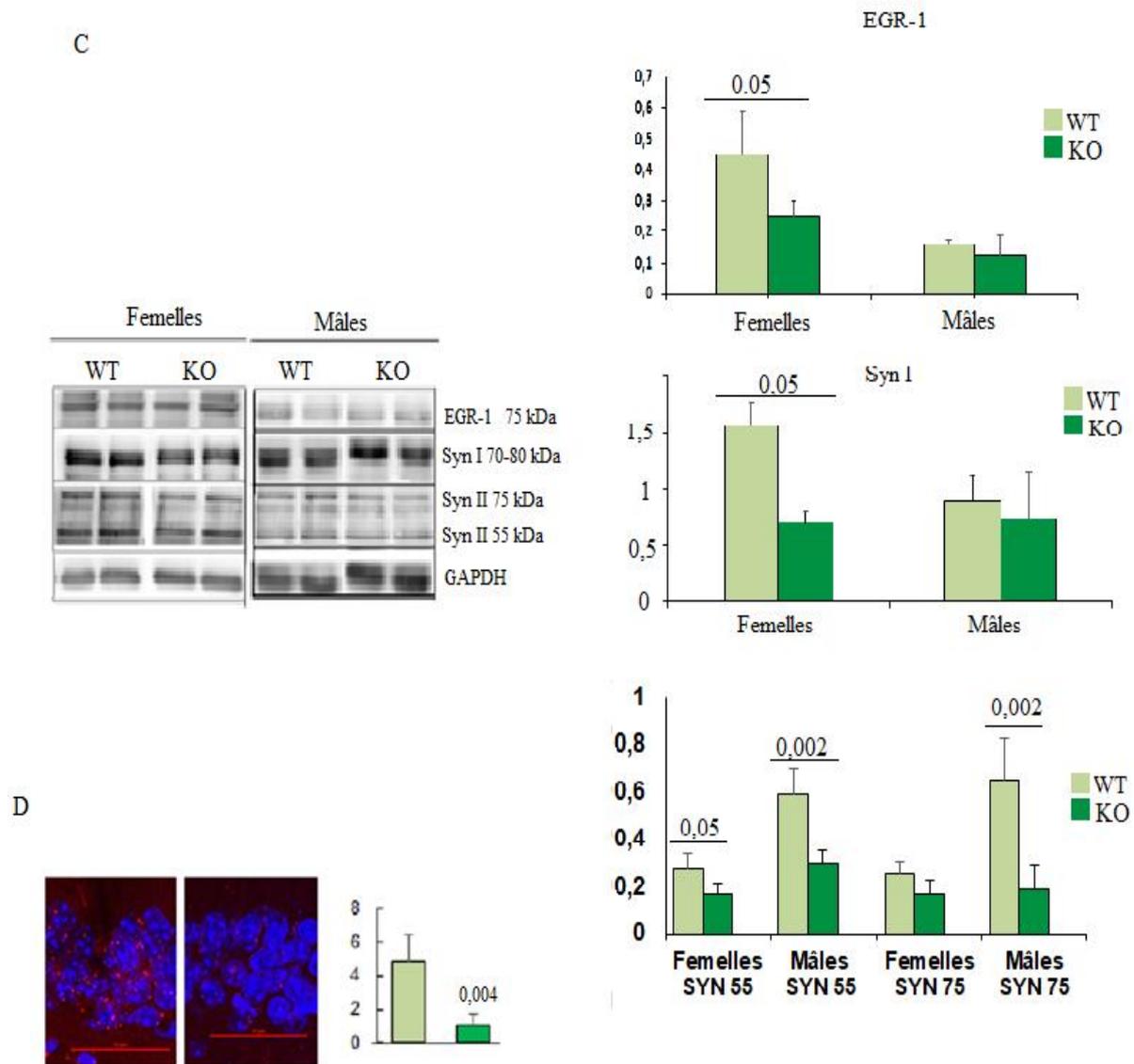
Chez les souris mâles, une différence significative entre KO et WT a été mesurée pour la Syn II 55 ( $0,298 \pm 0,054$ ) ( $0,589 \pm 0,113$ ) respectivement mais ni dans le cas de Syn I ni de Syn II 75 (figure 25 C).

La protéine EGR-1/Zif- 268 est le seul facteur de transcription connu capable de contrôler l'expression des deux synapsines I et II. Nous avons également quantifié son expression dans l'hippocampe. Nos résultats ont révélé une diminution significative chez les femelles KO ( $0,254 \pm 0,043$ ) par rapport aux WT ( $0,454 \pm 1,336$ ). Mais la différence n'était pas significative chez les mâles (figure 25C).

Afin d'avoir une analyse plus globale de la plasticité synaptique, nous avons étudié la dynamique d'un des récepteurs post-synaptiques les plus importants au sein des synapses

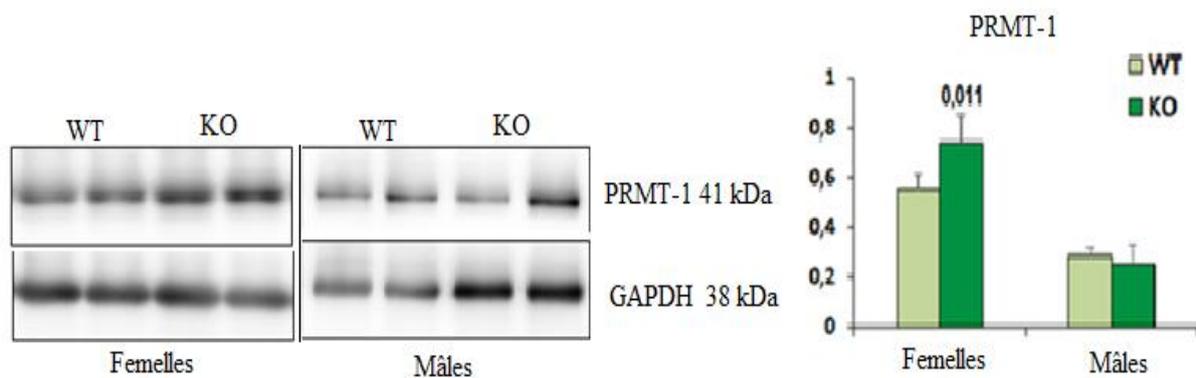
glutamatergiques en termes de cognition ; le récepteur NMDA et son partenaire stabilisant à la membrane la protéine PSD-95 (Post-Synaptic Density-95). Le taux de dimérisation de ces deux protéines étant un marqueur de la plasticité synaptique, nous l'avons évalué dans la zone CA1 de l'hippocampe. Ce taux de dimérisation est significativement réduit chez les femelles KO (figure 25D). Nous n'avons obtenu aucune différence significative chez les mâles.





**Figure 25 :** Expression et localisation des protéines clés de la voie des GR dans les extraits et les tranches d'hippocampes de souris. (A) Western blots de PGC1 $\alpha$  avec analyse densitométrique (panneau droit, WT (wild-type, +/+) et KO (knock-out, -/-). (B) immunomarquage de PGC1 $\alpha$  (la zone CA1 est représentée au grossissement x60, la barre représente 50  $\mu$ m). Voir le manque du marquage dans certains noyaux (flèches blanches) et la présence d'un marquage important en dehors des noyaux (flèches vides). (C) Western blots d'Egr1 et des synapsines (SynI et SynII) avec analyse densitométrique (panneau droit, WT (Wild type, +/+) et KO (knock-out, -/-). N = 4 à 5 par groupe. (D) Quantification de la dimérisation des protéines NMDA et PSD95 dans l'hippocampe CA1 par la technique Duo-link (unités = points de dimérisation moyens). Les données représentent des moyennes  $\pm$  S.D. Les valeurs *P* sont indiquées (ANOVA suivies de l'analyse post-hoc de Fischer).

Dans notre modèle comme dans d'autres sur le même sujet (Blaise *et al.* 2007; Pourié *et al.* 2015), il nous a paru important de s'intéresser aux réactions de trans-méthylations car une carence en donneurs de méthyles devrait conduire à une diminution de la disponibilité cellulaire en groupements méthyles (Blaise *et al.* 2007). Cependant, nos dosages effectués dans l'hippocampe ne montrent que des diminutions non significatives de SAM et SAH. Néanmoins, nous avons analysé l'une des protéines majeure impliquée dans les réactions de trans-méthylation; la protéine méthyltransférase-1 (PRMT-1) Dans le cas des femelles KO, l'analyse densitométrique du profil électrophorétique s'est traduite par e élévation de l'intensité de la bande de migration de PRMT-1 ( $0,743 \pm 0,107$ ) par rapport aux WT ( $0,555 \pm 0,055$ ). Chez les mâles, aucune variation n'a été mise en évidence entre les animaux WT et KO (figure 26).

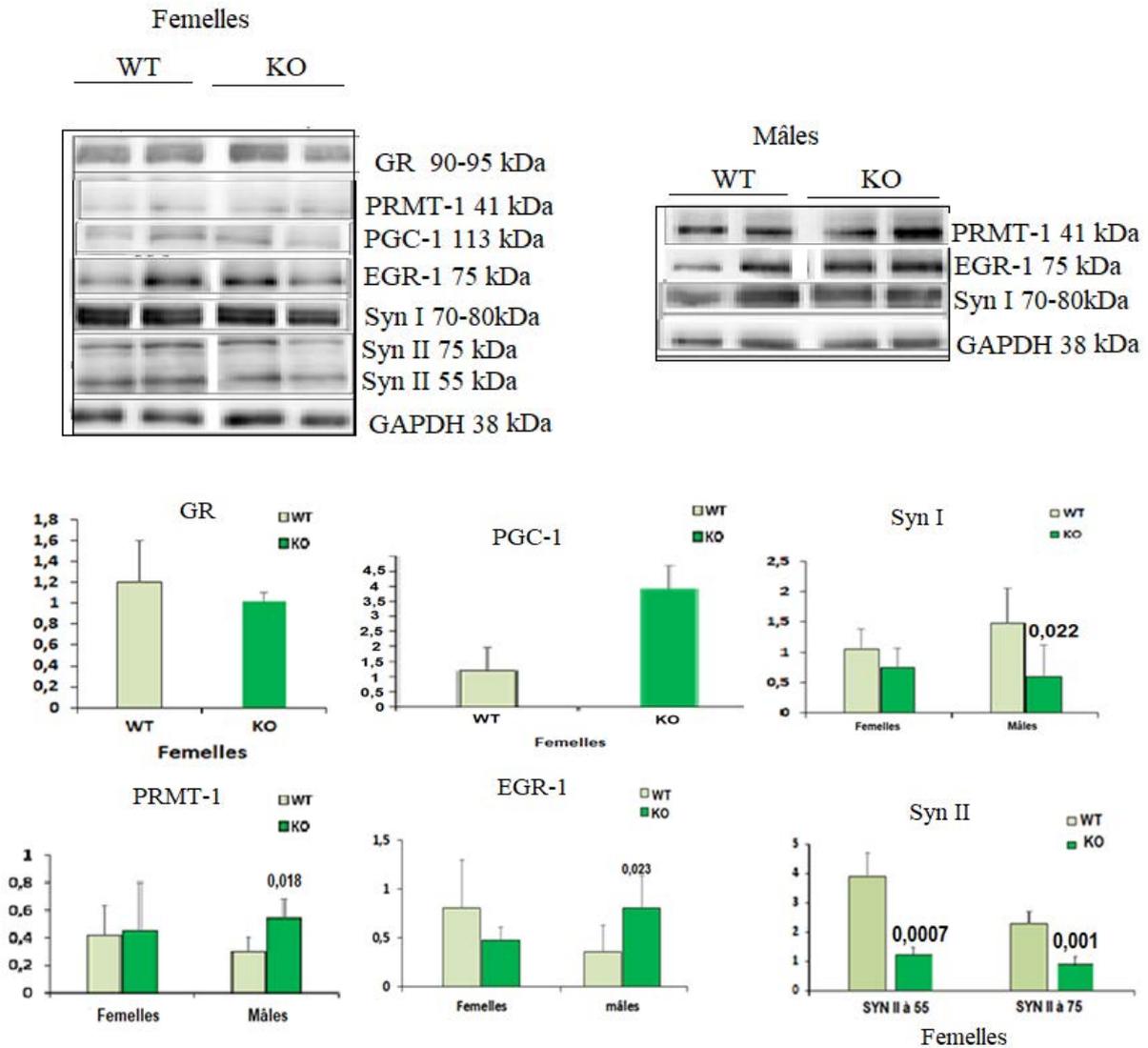


**Figure 26 :** Analyse par western-blot de l'expression des protéines PRMT-1 dans l'hippocampe des souris femelles et mâles. L'expression de PRMT-1 normalisée par rapport à la GAPDH. Moyennes  $\pm$  écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux WT et KO pour chaque sexe ( $*p < 0,05$ ).

### V.5. Mesure de l'expression des protéines clés de la synapse dans le cortex préfrontal

Du fait qu'il y ait un lien fort entre l'hippocampe et le cortex notamment frontal et pré-frontal en terme de cognition (circuit de Papez), nous avons vérifié les niveaux d'expression des protéines clés de la plasticité (les protéines GR, PGC-1 $\alpha$ , Syn I $\alpha$ , II, EGR-1 $\alpha$ ) par la technique de Western blot, afin de contrôler s'il existait une correspondance entre hippocampe et cortex. La figure 27 représente les résultats de l'analyse par western blot des extraits de cortex préfrontal de souris KO-CD320 et WT. L'analyse densitométrique montre une augmentation

significative de l'intensité des Syn II 55 et Syn II 75 dans les préparations de cortex préfrontal issues des femelles KO, par rapport aux WT. Tandis que pour le reste des protéines, les différences n'étaient pas significatives. Concernant les mâles, les résultats ont montré une augmentation significative de PRMT-1 et EGR-1 chez les souris KO par rapport aux WT.



**Figure 27 :** Analyse par western blot de l'expression des protéines impliquées dans la plasticité neuronale dans le cortex préfrontal des souris CD320 (Femelles et mâles). L'expression de chaque protéine d'intérêt est normalisée par rapport à celle de GAPDH. Moyennes  $\pm$  écart-type. Test ANOVA, différence entre animaux WT et KO pour chaque sexe.

## CHAPITRES VI : DISCUSSION

Le cerveau est particulièrement sensible aux carences en donneurs de groupements méthyles puisque les groupes méthyles sont essentiels à sa fonction (Kirsch *et al.* 2013). Des études épidémiologiques ont montré que des déficiences dans le métabolisme de la vitamine B12, soit alimentaires, soit génétiques, sont associées à des troubles neurologiques (Wei *et al.* 2011). En effet, une déficience en vitamine B12 est associée à une accélération du déclin cognitif, un vieillissement anormal des structures cérébrales et à la démence (Clarke 2006; Miller 2006; Sudha seshadri *et al.* 2002; Scalabrino 2009); et la diminution cellulaire du potentiel de méthylation en est un marqueur fort (Pourié *et al.* 2015). Malgré ce lien métabolique entre les constats physiopathologiques et la carence en donneurs de méthyles, assez peu d'études se sont intéressées aux mécanismes épigénétiques et épigénomiques à l'origine des troubles fonctionnels du cerveau (Reynolds 2006). Plus précisément, il apparaît important d'étudier les sous-parties du cerveau entier dans une approche structure-fonction, tant celui-ci présente une sensibilité différentielle à la carence en donneurs de méthyles avec des zones extrêmement sensibles comme l'hippocampe (Blaise *et al.* 2007) ou le cervelet (Pourié *et al.* 2015). La plupart des études se sont focalisées sur les effets cellulaires au sein de l'hippocampe selon les modèles, avec des effets tels que l'apoptose, l'inflammation, le stress cellulaire ou les modifications de la microvascularisation capillaire (Reynolds 2006; Blaise *et al.* 2007; Scalabrino 2009). Dans ces études sur ces effets négatifs, l'implication de la carence en vitamine B12 est souvent associée également à une carence en folate. En effet, une "double" déficience en B12 et en folate perturbe le développement du cerveau lors de l'organogenèse, notamment via la dérégulation de la prolifération et la différenciation neuronale (Battaglia-Hsu *et al.* 2009) (Scalabrino 2009). Ainsi, une carence précoce en vitamine B12 et folate chez des ratons a été associée à une atrophie de la couche CA1 de l'hippocampe et à des déficits mémoriels persistants même après un rétablissement des taux de vitamines jusqu'à l'âge jeune-adultes (Troen, Shea-Budgell, et al. 2008; Daval et al. 2009).

Finalement, parmi les différents modèles portant sur les déficiences en divers micronutriments, il a été montré que les différentes zones du tissu cérébral présentent une grande variabilité de réponses biologiques. Et même si des effets délétères ont clairement été révélés en réponse à une déficience stricte en vitamine B12 dans certaines zones du système nerveux central (Magnaghi *et al.* 2002), les mécanismes moléculaires pouvant expliquer directement les effets fonctionnels ne sont pas encore bien élucidés (Kerek *et al.* 2013; Zhuo & Praticò 2010).

Des modèles de souris modifiées génétiquement ont été développés pour appréhender *in vivo* les effets de niveaux diminués de vitamine B12 sur les composants du système nerveux.

### **VI.1. Le récepteur de la transcobalamine dans le cerveau et les conséquences sur le métabolisme des monocarbone tissulaire :**

Dans cette thèse, nous avons utilisé un modèle de souris génétique TCblR / CD320 KO pour évaluer les effets de la carence en vitamine B12 sur une fonction cérébrale majeure impliquée dans les processus cognitifs ; l'apprentissage hippocampo-dépendant.

Le TCblR a un rôle essentiel pour assurer la biodisponibilité de la vitamine B12. La Transcobalamine, transporteur de vitamine B12 plasmatique, saturé de vitamine B12 se lie au TCblR puis est assimilée par endocytose (Jiang *et al.* 2010).

Les souris TCblR / CD320 KO n'expriment pas le TCblR fonctionnel, donc l'absorption cellulaire de cobalamine par cette voie n'est pas possible. En conséquence, l'appauvrissement de la vitamine B12 se produit dans le cerveau des souris TCblR / CD320 KO mais pas dans le cerveau des souris contrôles qui présentent une expression TCblR normale. Cependant, cette invalidation du gène est viable. La mégaline, un récepteur multiligand, est fortement exprimée sur les cellules épithéliales au cours du développement embryonnaire. Ces récepteurs peuvent se lier avec TC-Cbl et peuvent agir comme un récepteur alternatif en l'absence de TCblR fœtal (Verroust & Hammond 2000). Ainsi, les souris KO peuvent présenter des taux de cobalamine supérieurs à zéro et non négligeables dans les tissus nerveux.

Nous avons choisi une étude centrée sur l'hippocampe puisque cette région est importante dans l'apprentissage et la mémoire. L'hippocampe est une structure centrale particulièrement sensible à la carence en donneurs de méthyles comme il avait été démontré précédemment dans notre laboratoire (Blaise *et al.* 2007; Daval *et al.* 2009).

Les résultats de notre étude ont montré que les niveaux de vitamine B12 dans l'hippocampe dans le groupe des souris KO étaient significativement inférieurs au groupe de souris WT. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Fernández-Roig *et al.* (2012) qui a constaté que la concentration de vitamine B12 dans le cerveau était inférieure de 92% dans le cerveau de souris TCblR / CD320 KO par rapport aux témoins. Nous constatons donc une diminution

significative de la disponibilité intracellulaire en cobalamine, sans pour autant que ce taux n'atteigne zéro comme on pourrait le supposer pour un modèle Knock-out.

Malgré tout et en lien avec cette diminution de la cobalamine intracellulaire, nous nous sommes demandés s'il existait une réduction concomitante significative des niveaux de SAM associés à une augmentation des taux de SAH dans le cerveau des souris KO. Les résultats montrent que le cycle de reméthylation SAM-dépendant est néanmoins touché, malgré des diminutions (notamment de SAM et de méthionine) non significatives. En effet en tenant compte de l'augmentation significative du marqueur MMA chez les souris KO, il apparaît que les réactions de reméthylation soient perturbées chez les souris KO par rapport aux WT. De plus, il est à souligner que le taux de méthylation révélé par le rapport SAM / SAH présente une tendance à être plus faible chez les souris KO que chez les souris WT (1,20 contre 1,81 respectivement,  $P = 0,085$ ).

Dans le cerveau, la SAM joue un rôle dans la génération de neurotransmetteurs ainsi que dans le métabolisme lipidique. De plus, il a été montré que des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN étaient importantes pour réguler la neurogenèse dans l'hippocampe (Jadavji *et al.* 2015).

Nous n'avons pas été en mesure de révéler des différences significatives dans les niveaux de SAM, de SAH et d'homocystéine puisque l'utilisation de la technique de spectrométrie de masse (c'est-à-dire LC / MS-MS) est difficile avec des extraits de tissus par rapport aux liquides tels que le plasma. En effet, cette technique est pertinente avec de très petites quantités de tissus comme nous l'avons eu avec des microdissections d'hippocampe, mais la solubilité des molécules dépend de la nature acide du tampon. Ainsi, la variabilité obtenue dans nos mesures était probablement due à cet aspect.

Dans cette étude, nous avons observé que les souris KO présentent des altérations comportementales comparables à celles observées dans les troubles, syndromes et pathologies humaines liés aux donneurs de méthyles ; c'est-à-dire des perturbations des fonctions cognitives).

## **VI.2. Certains marqueurs comportementaux sont affectés par la diminution du taux de vitamine B12 tissulaire :**

Les souris TCblR / CD320 KO et témoins WT ont subi une batterie de tests comportementaux afin d'évaluer les comportements relatifs au stress, et aux capacités d'apprentissage hippocampo-dépendant. Ces mêmes comportements sont connus pour être altérés chez les humains présentant une déficience en Cbl.

Les tests comportementaux relatifs aux capacités d'apprentissage ont été réalisés conjointement entre notre équipe (INSERM U954, Nancy) et l'équipe du Pr. Ed Quadros (New-York, USA), équipe qui est à l'origine de la production des souris KO TCblR / CD320. La collaboration entre nos deux laboratoires s'est mise en place après que nos collègues américains n'aient trouvé aucune différence significative entre les souris KO et les WT dans leur test d'apprentissage d'évitement passif effectué sur plusieurs sessions successives (basé sur l'évitement de chocs électriques sous les pattes). Ainsi, les souris KO "américaines", même si elles parcouraient un peu plus de distance avant d'éviter un choc électrique - ce qui pouvait laisser penser que leur capacité d'apprentissage de session en session était peut-être moins performante (différence non significative) - ces souris KO ne subissaient malgré tout pas plus de chocs électriques que les souris contrôles WT.

En utilisant un test "a priori" moins anxiogène, pour évaluer les performances d'apprentissage; le labyrinthe aquatique, nous avons pu montrer que les souris KO - que nos collègues américains nous avaient confiées - présentaient bien des performances d'apprentissage moins élevées de session en session, que les souris contrôles WT. En effet, les latences de sortie du labyrinthe et le nombre d'erreurs commises étaient systématiquement supérieurs à celles des souris contrôles. Ces résultats obtenus par nos soins, sont en accord avec d'autres auteurs qui montrent également des effets sur l'apprentissage spatial et la mémoire dans le test du labyrinthe de type "Morris Water Maze" après la carence en vitamine B (Troen *et al.* 2008).

Ainsi, le fait d'obtenir des résultats diamétralement différents entre les tests "américains" et les nôtres, nous a permis de poser l'hypothèse de l'effet du stress dans la modulation de la plasticité synaptique en lien avec les aspects fonctionnels révélés dans les tests comportementaux. D'autres études ont par ailleurs souligné les mécanismes mis en jeu entre l'effet du stress cortico-dépendant, la plasticité synaptique et les fonctions comportementales sous-jacentes (Revest *et al.* 2010; Pourié *et al.* 2015). En comparant les deux tests cognitifs, il semble que le facteur stress pourrait jouer un rôle important dans la modulation des capacités d'apprentissage des souris (Galliot *et al.* 2010). D'autre part, une autre approche sur le modèle souris a également montré des altérations dans l'apprentissage de l'évitement des déficits de la mémoire et de la flexibilité comportementale. Malgré tout, si les souris TCblR / CD320KO sont soumises à un apprentissage prolongé, celles-ci peuvent présenter une rétention de mémoire normale par rapport aux contrôles, suggérant que les déficits fonctionnels cognitifs peuvent être restaurés par un entraînement approfondi (Lopatina *et al.* 2014).

### **VI.3. Un stress modéré peu influencer positivement l'apprentissage hippocampo-dépendant :**

Avant d'évaluer notre hypothèse de modulation de la plasticité synaptique hippocampique par le stress, il nous a paru indispensable de mesurer le niveau de stress basal dans notre modèle. Ainsi, le test de l'Open-field nous a apporté des marqueurs significatifs. En effet et de façon surprenante, les souris KO présentent des indices de stress moins importants que les souris contrôle WT, puisqu'elles restent significativement moins de temps dans la zone la plus protégée de l'Open-field (près de parois verticales) et émettent moins de fèces lorsqu'elles sont testées dans cet environnement nouveau. De plus des prélèvements de sang non-invasifs *in vivo* (dans la veine sous-mandibulaire) ont permis de montrer que les souris KO et WT présentaient des taux de cortisol circulant identiques en conditions non-stressantes dites "normales" d'élevage. Toutefois, les souris KO présentent des taux de cortisol qui s'élèvent significativement plus en conditions stressantes par rapport aux souris WT ; ce qui pourrait avoir une influence sur certaines voies de signalisation, et notamment les voies qui conduisent à la plasticité synaptique. Par ailleurs, ces dosages nous ont également permis de vérifier que le test d'apprentissage du labyrinthe aquatique que nous utilisons ne provoque apparemment pas de stress très significatif chez les souris que ce soient les KO ou le WT. Ce dernier point apporte d'ailleurs un crédit supplémentaire à notre hypothèse de la modulation positive de la fonction d'apprentissage hippocampo-dépendant par un stress modéré chez les KO par rapport aux WT. En effet, si il est connu que le test d'évitement passif utilisant des chocs électriques, même légers, engendre une élévation des marqueurs de stress (Handa *et al.* 1994; Morgese *et al.* 2014), nos dosages plasmatiques attestent que le test de navigation dans le labyrinthe aquatique n'engendre lui pas de stress notable puisque les taux de cortisol circulant chez les souris en fin d'expérimentation ne sont pas plus élevés que les taux relevés en condition standard d'élevage sans manipulation.

Afin de tester notre hypothèse stress, nous avons utilisé une approche pharmacologique pour mimer l'activation putative d'un stress modéré dans notre modèle KO. Des injections intra-péritonéales d'hydrocortisone (8 mg / kg) chez les souris témoins et KO avant chaque session du labyrinthe aquatique ont été réalisées. Le choix de cette dose a été fait afin de rester dans des taux physiologiques chez les souris, alors que des taux supérieurs à 20 mg / kg correspondent à des stress expérimentaux bien plus élevés sans réel lien physiologique (Ide *et al.* 2010; Kainuma *et al.* 2017) Les résultats montrent que les performances d'apprentissage inférieures des souris

CD320 KO par rapport aux WT sont restaurées après une injection d'hydroxycortisone. En effet, que ce soit en latence de sortie du labyrinthe ou en nombre d'erreurs, les souris KO expriment à chaque session des valeurs comparables à celles des souris WT ; et montrent donc un apprentissage performant de session en session. Les doses physiologiques utilisées pourraient produire un effet de facilitation de la "Potentialisation à long terme" (LTP) à l'origine d'un mécanisme d'apprentissage solide dans l'hippocampe comme démontré précédemment (Tse *et al.* 2011).

Par ailleurs, la question de la plasticité synaptique semble être centrale dans notre modèle d'étude, car nous avons vérifié que les déficits d'apprentissage des souris KO sans hydroxycortisone n'étaient pas dus à des facteurs histopathologiques comme un nombre moins important de cellules dans l'hippocampe ou une épaisseur de couche pyramidale inférieure aux WT. L'imagerie histologique que nous avons pu réaliser montre clairement que les couches de l'hippocampe, dont la Corne d'Ammon 1 (CA1) présentent des structures identiques à celles des souris WT.

La plasticité synaptique joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire (Tartar *et al.* 2006; Howland & Wang 2008). Le système limbique est le principal domaine du cerveau impliqué dans l'apprentissage et la formation de la mémoire, et l'hippocampe prend une part importante de ces mécanismes cognitifs (Eichenbaum 1997). L'amygdale également présente dans le système limbique est connue pour moduler l'hippocampe, en particulier dans les modifications liées au stress. Des injections de cortisol ont été utilisées pour attester l'implication de l'axe du stress dans notre modèle, ce qui pourrait réguler les performances cognitives comme déjà montré (Borsellino 2016).

La question émerge d'une activation de plusieurs protéines clés impliquées dans la plasticité neuronale telles que le récepteur des glucocorticoïdes et le récepteur des œstrogènes, comme indiqué précédemment dans un modèle de carence en donneurs de méthyles nutritionnel chez le rat (Pourié *et al.* 2015). Les recherches plus moléculaires utilisant le Western Blot et l'immunohistochimie ont été utilisées pour tester les protéines candidates afin d'élucider les conséquences mécanistiques dans notre modèle carencé en vitamine B12. Ainsi, il a été montré que l'expression des gènes immédiats et précoces (IEG) était induite par une plasticité synaptique dépendant de l'activité des individus où un comportement joue un rôle important dans la mémoire à long terme (Mokin & Keifer 2005).

En fonction de notre hypothèse et des études précédentes dans le laboratoire (Pourié *et al.* 2015) nous avons dans un premier temps étudié les protéines régulatrices connues que sont le récepteur des estrogène (ER alpha et beta), et le récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans l'hippocampe. Alors que ER alpha ne semble pas être exprimé en des niveaux suffisants - non détectable en western blot - le niveau d'expression de ER beta semble être le même que ce soit chez les souris KO ou WT (données non présentées). Néanmoins, nos résultats montrent que le niveau d'expression de GR est légèrement diminué chez les souris KO femelles par rapport aux WT. Le fait que les mâles ne présentent pas cette différence peut être dû au fait qu'ils utilisent plus de voies d'activation que les femelles comme par exemple les récepteurs aux androgènes et oestrogènes (Pourié *et al.* 2015). Ce résultat est cohérent avec le fait que les souris KO semblent exprimer légèrement moins de stress basique que les souris WT en étude comportementale (open-field). Dans la même idée, nous avons obtenu une élévation de la production de cortisol supérieur chez les KO par rapport aux WT lors d'un stress ponctuel ; ce qui tendrait à prouver que les souris KO compenseraient l'expression plus faible de GR par une surproduction de cortisol afin d'obtenir une activation de la voie GR. Par ailleurs nos données immunohistologiques indiquent que l'expression de GR chez les souris KO est moins représentée à la fois dans le cytoplasme et le noyau dans la couche CA1 de l'hippocampe.

En ce qui concerne les autres protéines impliquées dans la plasticité, dans le gyrus denté de l'hippocampe, l'induction de la potentialisation à long terme (LTP) est associée à une transcription rapide et robuste du IEG, Zif268 / EGR-1, ce qui est essentiel pour la transition de la plasticité synaptique de courte à longue durée et pour l'expression de souvenirs à long terme (Jones *et al.* 2001).

Des études menées sur des souris knock-out EGR-1 présentent des déficits de mémoire à long terme dans différentes tâches, y compris l'alternance spontanée, la transmission sociale de la préférence alimentaire et ces résultats ont soutenu que l'EGR-1 est essentiel pour la formation de la mémoire. L'activation de Egr-1 par les glucocorticoïdes augmente le niveau de synapsine-I et l'activation de la voie MAPK induit la phosphorylation de cette protéine (Liu *et al.* 2013). Les protéines synapsines sont surtout connues et étudiées pour leur capacité à moduler l'exocytose des neurotransmetteurs aux terminaisons pré-synaptiques. Il devient donc évident que les synapsines jouent un rôle majeur dans la modulation des mécanismes moléculaires sous-jacents à la formation de la mémoire cognitive et émotionnelle. Les synapsines non phosphorylées lient fortement les vésicules de neurotransmetteurs (SV) à l'actine du cytosquelette. Ces SV liées à la synapsine-actine constituent la réserve de vésicules facilement

libérable qui est positivement régulée par les niveaux de la protéine synapsine-I. De plus, les mutations dans les gènes de la synapsine ont été liées aux dysfonctionnements neurologiques touchant les processus de comportement et d'apprentissage, et provoquent certaines psychopathologies telles que l'épilepsie et la schizophrénie (Cesca *et al.* 2010). La synapsine-Ia / Ib semble être notamment l'un des effecteurs par lesquels la cascade GR / Egr -1 / MAPK améliore la mémoire liée au stress. La phosphorylation de la synapsine-I libère ensuite les SV de leur lien à la synapsine-actine qui, à leur tour, permet leur transport vers les sites d'exocytose et la libération des neurotransmetteurs. Par conséquent, l'augmentation du niveau de synapsine-I induite par l'Egr-1 induite par le GR augmentera le stock de neurotransmetteurs facilement libérable et sa phosphorylation par le MAPK activé par GR déclenchera sa libération réelle. Dans l'hippocampe, la synapsine-I est exclusivement exprimée dans les neurones pyramidaux glutamatergiques, mais est absente des interneurons GABA. Deuxièmement, l'administration intra-péritonéale de corticostérone augmente le glutamate, mais pas la libération de GABA dans l'hippocampe. Cet effet dépend de l'activation du GR, car il peut être évité par un prétraitement avec l'antagoniste des GR mifepristone.

Tenant compte de la littérature et des résultats antérieurs au laboratoire (Pourié *et al.* 2015), nous avons étudié la cascade moléculaire mise en jeu entre les protéines activatrice dont GR et les synapsines, effectrices de la plasticité.

Nous avons pu montrer qu'en réponse à une moindre activation de GR chez les souris KO femelles, le co-régulateur PGC1 alpha et le facteur de transcription des synapsines EGR1 étaient eux aussi sous-exprimés chez les KO femelles. Une fois de plus les mâles semblent être épargnés par ces déficits.

Enfin, chez les femelles KO essentiellement, le niveau d'expression des synapsines est significativement inférieur par rapport aux souris WT. Ces résultats sont une nouvelle fois en correspondance avec (1) le niveau d'expression plus faible de GR et (2) le niveau de production plus faible de cortisol basique et le niveau de production plus élevé de ce cortisol en situation de stress.

En ce sens, nos résultats comportementaux et moléculaires montrent que la plasticité synaptique dans l'hippocampe en lien avec un apprentissage peut être affectée et régulée par la voie du récepteur aux glucocorticoïdes.

En outre, une autre étude a déjà montré que les glucocorticoïdes peuvent affecter les processus d'apprentissage et de mémoire en interagissant avec des mécanismes glutamatergiques. Le

modèle utilisé alors suggère que la modulation directe des voies glutamatergiques par les glucocorticoïdes pourrait constituer un mécanisme important pour ces hormones pour moduler directement les fonctions cognitives. Les hormones stéroïdes surrénales affectent les processus d'apprentissage et de mémoire en interagissant avec des récepteurs spécifiques des glucocorticoïdes dans différentes zones du cerveau (Sandi 1998).

En ce qui concerne nos résultats et la littérature, nous proposons le résultat mécanistique suivant (figure 28). En lien avec l'étude sur la plasticité de Revest et collaborateurs (2010), nous avons montré qu'une réduction du statut de méthylation cellulaire due à la carence en vitamine B12, conduit à déréguler la voie des principaux acteurs GR et PGC-1 et synapsines (flèches rouges sur la figure 28). Cependant, une légère augmentation de l'activation de la voie du GR-EGR-1 par une élévation du cortisol pourrait être capable de restaurer l'effet délétère dû au statut de méthylation réduit (carence en B12).

De ce fait, il est possible d'envisager une voie thérapeutique par la voie cortisol / GR dans les cas de patients présentant un statut en vitamine B12 anormalement diminué, comme par exemple les mutations cobalamine G qui présentent une mutation dans le gène du transporteur de la cobalamine.

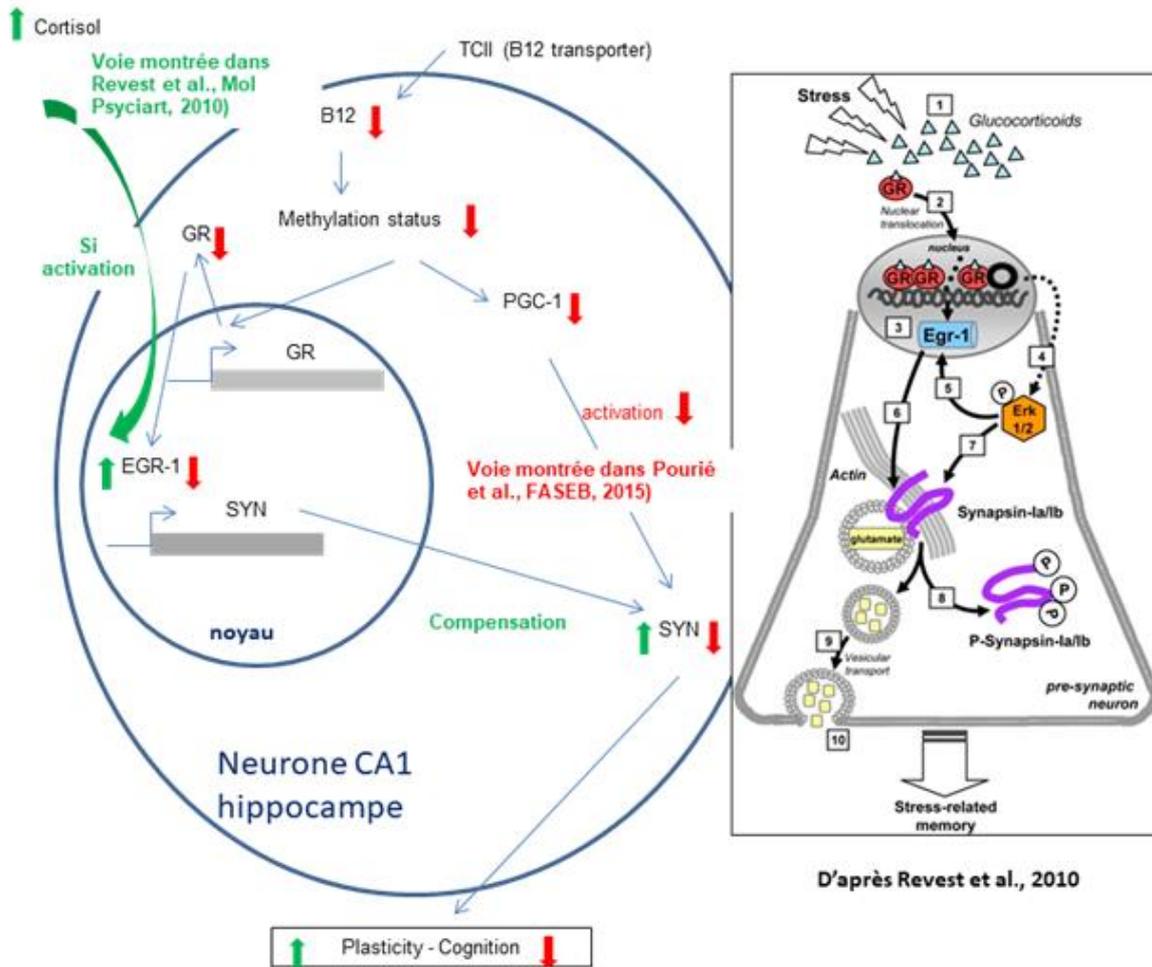


Figure28 : Modèle schématique de la régulation mécanistique de la plasticité synaptique en cas de carence en B12 dans le cerveau

## REFERENCES

- Abdessemed, S. et al., 2009. Contribution des facteurs génétiques et nutritionnels dans les hyperhomocystéinémies dans la population algérienne saine. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 23(2), pp.50–54. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0985056209000417>.
- Abramov, D.M. et al., 2017. Visuospatial information processing load and the ratio between parietal cue and target P3 amplitudes in the Attentional Network Test. *Neuroscience Letters*, 647(Supplement C), pp.91–96. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394017302513>.
- Adcock, I.M., Maneechotesuwan, K. & Usmani, O., 2002. Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting  $\beta$ 2-agonists. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(6 SUPPL.), pp.S261–S268. Available at: <http://dx.doi.org/10.1067/mai.2002.129705>.
- Adolphs, R., 2010. What does the amygdala contribute to social cognition? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1191(1), pp.42–61. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2010.05445.x> [Accessed September 16, 2017].
- Alam, A. et al., 2016. Structural basis of transcobalamin recognition by human CD320 receptor. *Nature communications*, 7(May), p.12100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27411955> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4947154>.
- Altay, C. et al., 1995. Familial Selective Vitamin B12 Malabsorption (Imerslund-Grasbeck Syndrome) in a Pool of Turkish Patients. *Pediatric Hematology and Oncology*, 12(1), pp.19–28. Available at: <http://dx.doi.org/10.3109/08880019509029524>.
- Amaral, D.G., Kondo, H. & Lavenex, P., 2014. An analysis of entorhinal cortex projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subiculum of the neonatal macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 522(7), pp.1485–1505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384686/>.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), pp.571–591. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0306452289904247>.
- Andersen, P. & Figenschou Soleng, A., 1998. Long-term potentiation and spatial training are both associated with the generation of new excitatory synapses | Published on the World Wide Web on 4 November 1997.1. *Brain Research Reviews*, 26(2–3), pp.353–359. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017397000428>.
- Andrès, E. et al., 2004. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Cmaj*, 171(3), pp.251–259. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289425> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC490077>.
- Antoniades, C. et al., 2009. Homocysteine and coronary atherosclerosis: From folate fortification to the recent clinical trials. *European Heart Journal*, 30(1), pp.6–15.
- Antunes, G., Roque, A.C. & Simoes-de-Souza, F.M., 2016. Stochastic Induction of Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *Scientific Reports*, 6(1), p.30899. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep30899>.
- Aranda, A. & Pascual, A., 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*, 81(3), pp.1269–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427696> [Accessed September 20, 2017].
- Attwell, D. & Gibb, A., 2005. Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Re. Nature reviews. Neuroscience*, 6, pp.841–849.
- Ball, G., 1998. Vitamin B12. In G. F. M. Ball, ed. *Bioavailability and Analysis of Vitamins in*

- Foods*. Boston, MA: Springer US, pp. 497–515. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3414-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3414-7_14).
- Bannerman, D.M. et al., 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat Rev Neurosci*, 15(3), pp.181–192. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3677>.
- Battaglia-Hsu, S. -f. et al., 2009. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(51), pp.21930–21935. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0811794106>.
- Benito, N. et al., 2016. The right hippocampus leads the bilateral integration of gamma-parsed lateralized information M. Bartos, ed. *eLife*, 5, p.e16658. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5050016/>.
- Blaise, S.A. et al., 2007. Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats. *The American Journal of Pathology*, 170(2), pp.667–679. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010608899>.
- Bliss, T.V.P. & Cooke, S.F., 2011. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics*, 66(Suppl 1), pp.3–17. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1807-59322011001300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1807-59322011001300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Bliss, T.V.P. & Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), pp.331–356. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1350458/>.
- Boncompagni, S. et al., 2015. *Membrane glucocorticoid receptors are localised in the extracellular matrix and signal through the MAPK pathway in mammalian skeletal muscle fibres*, Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/JP270502>.
- Bond, M. et al., 2013. Use of model organisms for the study of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(11), pp.1842–1865. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443913000136>.
- Borsellino, M., 2016. Effects of stress and anxiety on creativity. *Literature Survey*.
- Boulat, O., Rey, F. & Mooser, V., 2012. Marqueurs biologiques des statuts vitaminiques B12 et D: Aspects analytiques d'importance clinique. *Revue Medicale Suisse*, 8(360), pp.2052–2058.
- Boyle, J., 2005. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(1), pp.74–75. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.2005.494033010419>.
- Bozdagi, O. et al., 2000. Increasing Numbers of Synaptic Puncta during Late-Phase LTP. *Neuron*, 28(1), pp.245–259. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300001008>.
- Brattström, L. et al., 1990. Impaired homocysteine metabolism in early-onset cerebral and peripheral occlusive arterial disease Effects of pyridoxine and folic acid treatment. *Atherosclerosis*, 81(1), pp.51–60. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002191509090058Q>.
- Brown, K.L., 2005. Chemistry and enzymology of vitamin B12. *Chemical Reviews*, 105(6), pp.2075–2149.
- Butz LW, du V. V., 1932. The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid. *J Biol Chem* 1932;99:135-142., 99, pp.135–142.

- Cacciapuoti, F., 2013. Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 36(3), pp.258–262. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11239-012-0856-x>.
- Castellanos-Sinco, H.B. et al., 2015. Megaloblastic anaemia: Folic acid and vitamin B12 metabolism. *Revista Médica Del Hospital General De México*, 78(3), pp.135–143. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0185106315000426>.
- Cattaneo, M., 1999. Hyperhomocysteinemia, Atherosclerosis and Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 81(2), pp.165–176. Available at: <http://www.schattauer.de/t3page/1214.html?manuscript=4746&L=1>.
- Cawley, N. et al., 2015. Reduced gamma-aminobutyric acid concentration is associated with physical disability in progressive multiple sclerosis. *Brain*, 138(9), pp.2584–2595. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awv209>.
- Cesca, F. et al., 2010. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Progress in Neurobiology*, 91(4), pp.313–348. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008210000961>.
- Chantong, B. et al., 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), p.260. Available at: <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-260>.
- Chaudhry, C. et al., 2009. Stability of ligand-binding domain dimer assembly controls kainate receptor desensitization. *The EMBO Journal*, 28(10), p.1518 LP-1530. Available at: <http://emboj.embopress.org/content/28/10/1518.abstract>.
- Cheng, G., Sandkuhler, J. & Randic, M., 1995. Involvement of protein phosphatases in long-term depression of primary afferent neurotransmission. *Society for Neuroscience Abstracts*, 21 (Part 1(1)), pp.73–82. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165380603001615>.
- Clarke, R. et al., 2008. Folate and vitamin B12 status in relation to cognitive impairment and anaemia in the setting of voluntary fortification in the UK. *The British journal of nutrition*, 100(5), pp.1054–1059. Available at: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med6&NEWS=N&AN=18341758>.
- Clarke, R., 2006. Vitamin B12, Folic Acid, and the Prevention of Dementia. *New England Journal of Medicine*, 354(26), pp.2817–2819. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMe068086>.
- Conrad, C.D., 2008. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Reviews in the neurosciences*, 19(6), pp.395–411. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2746750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Conrad, C.D., 2005. the Relationship Between Acute Glucocorticoid Levels and Hippocampal Function Depends Upon Task Aversiveness and Memory Processing Stage. *Nonlinearity in biology, toxicology, medicine*, 3(1), pp.57–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601824%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1431575>.
- Coşar, A. et al., 2014. Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 44(1), pp.1–9.
- Croxtall, J.D. et al., 2002. Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic

- mechanism of action in A549 cells. *British journal of pharmacology*, 135(2), pp.511–519.
- Dagyte, G. et al., 2009. Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience*, 162(4), pp.904–913.
- Daval, J.L., Blaise, S. & Gueant, J.L., 2009. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(1), p.E1; author reply E2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19106288>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2629222/pdf/zpqE1.pdf>.
- Dejean, C. & Richard, D., 2013. [Mechanisms of action of glucocorticoids]. *La Revue de médecine interne / fondée ... par la Société nationale française de médecine interne*, 34(5), pp.264–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498716>.
- Deng, Q., Zhang, Z. & Wu, Y., 2017. The Pulsatility of ACTH Secretion in the Rat Anterior Pituitary Cell Perfusion System. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(1), pp.154–162. Available at: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000455984>.
- Diamond, A., 2009. *Normal Development of Prefrontal Cortex from Birth to Young Adulthood: Cognitive Functions, Anatomy, and Biochemistry*,
- Dominguez-Salas, P. et al., 2012. Maternal nutritional status, C1 metabolism and offspring DNA methylation: a review of current evidence in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(1), pp.154–165. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0029665111003338](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665111003338).
- Dyck, B., 2008. HPA axis. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(6).
- EFSA, 2006. *Tolerable Upper Intake Levels for Vitamins and Minerals*,
- Eichenbaum, H., 1997. How Does the Brain Organize Memories? *Science*, 277(5324), p.330 LP-332. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/277/5324/330.abstract>.
- Elston, G.N., 2003. Cortex, Cognition and the Cell: New Insights into the Pyramidal Neuron and Prefrontal Function. *Cerebral Cortex*, 13(11), pp.1124–1138. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhg093>.
- Ermens, A.A.M., Vlasveld, L.T. & Lindemans, J., 2003. Significance of elevated cobalamin (vitamin B12) levels in blood. *Clinical Biochemistry*, 36(8), pp.585–590.
- Fanselow, M.S. & Dong, H.-W., 2010. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), p.7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2822727/>.
- Federici, L. et al., 2007. Manifestations hématologiques de la carence en vitamine B12: données personnelles et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 28(4), pp.225–231. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S024886630600751X>.
- Fernández-Roig, S. et al., 2012. Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCblR/CD320 knockout mouse. *Nutrition & metabolism*, 9(1), p.41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3433370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Field, M.S. et al., 2013. Reduced MTHFD1 activity in male mice perturbs folate- and choline-dependent one-carbon metabolism as well as transsulfuration. *The Journal of nutrition*, 143(1), pp.41–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3521460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Finkelstein, J.D., 1998. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation.

- European Journal of Pediatrics*, 157(2), pp.S40–S44. Available at: <https://doi.org/10.1007/PL00014300>.
- Foerde, K. et al., 2013. A Role for the Medial Temporal Lobe in Feedback-Driven Learning: Evidence from Amnesia. *The Journal of Neuroscience*, 33(13), pp.5698–5704. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3865542/>.
- Fonnum, F. et al., 1995. Role of Glutamate and Glutamate Receptors in Memory Function and Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 757(1), pp.475–486. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1995.tb17507.x> [Accessed September 16, 2017].
- Forges, T. et al., 2008. Les folates : quel impact sur la fertilité ? *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 36(9), pp.930–939. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297958908003184>.
- Fuster, J., 1989. The prefrontal cortex: Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe. *The Quarterly Review of Biology*, 39(Volume 56, Number 4), p.1008. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1167899/>.
- Galliot, E. et al., 2010. Enhancement of spatial learning by predator odor in mice: Involvement of amygdala and hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(2), pp.196–202. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742709002019>.
- García-Molina, A., 2012. Phineas Gage and the enigma of the prefrontal cortex. *Neurología (English Edition)*, 27(6), pp.370–375. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2173580812001198> [Accessed September 16, 2017].
- García Jiménez, M. <sup>a</sup>C. et al., 2008. Déficit de cobalamina hereditario juvenil causado por mutaciones en el gen GIF. *Anales de Pediatría*, 69(1), pp.56–58. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1695403308702406>.
- Gielen, M., 2010. Des Récepteurs-Canaux Du Glutamate. *Medicine/Sciences*, 26(1), pp.65–72. Available at: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/201026165>.
- Gold, A.L., Morey, R.A. & McCarthy, G., 2015. Amygdala-prefrontal cortex functional connectivity during threat-induced anxiety and goal distraction. *Biological Psychiatry*, 77(4), pp.394–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4349396/>.
- Gomez-Sanchez, E., 2014. Brain mineralocorticoid receptors in cognition and cardiovascular homeostasis. *Steroids*, 91, pp.20–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302001/>.
- Gonzalez, J. et al., 2016. Long-term Potentiation at Temporoammonic Path-CA1 Synapses in Freely Moving Rats. *Frontiers in Neural Circuits*, 10(February), pp.1–13. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncir.2016.00002/abstract>.
- Goyal, N. et al., 2008. Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian Journal of Psychiatry*, 50(3), p.202. Available at: <http://www.indianjpsychiatry.org/text.asp?2008/50/3/202/43634>.
- Gräsbeck, R., 2006. *Imerslund-Gräsbeck Syndrome (Selective Vitamin B12 Malabsorption with Proteinuria)*.
- Gray, E.G., 1955. An Asymmetrical Response of Teleost Melanophores. *Nature*, 175(4458), pp.642–643. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/175642b0>.
- Groeneweg, F.L. et al., 2011. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *Journal of Endocrinology*, 209(2), pp.153–167.
- Grzanka, A. et al., 2011. Molecular mechanisms of glucocorticoids action: Implications for

- treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 268(2), pp.247–253. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00405-010-1330-z>.
- Guéant, J.-L. et al., 1995. Decreased activity of intestinal and urinary intrinsic factor in Gräsbeck-Imerslund disease. *Gastroenterology*, 108(6), pp.1622–1628. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0016508595901221>.
- Gueant, J.L. et al., 2014. Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(5), pp.833–850.
- Guéant, J.L. et al., 2013. Folate and fetal programming: A play in epigenomics? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(6), pp.279–289.
- Guldener, C. Van & Stehouwer, D.A., 2003. Homocystéine et complications cardiovasculaires du diabète. *Diabetes voice*, 48(3), pp.31–33.
- Haberle, J. et al., 2009. TC II deficiency: avoidance of false-negative molecular genetics by RNA-based investigations. *J Hum Genet*, 54(6), pp.331–334. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2009.34>.
- Van Haeften, T., Wouterlood, F.G. & Witter, M.P., 2000. Presubicular input to the dendrites of layer-V entorhinal neurons in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.*, 911, pp.471–473.
- Hakami, N. et al., 1971. Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings. *The New England journal of medicine*, 285(21), pp.1163–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5096637>.
- Haller, J., Mikics, É. & Makara, G.B., 2008. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), pp.273–291. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302207000593>.
- Han, F. et al., 2005. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neuroscience Research*, 51(4), pp.371–381. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010204003116>.
- Handa, R.J. et al., 1994. Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiology & Behavior*, 55(1), pp.117–124. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031938494900183>.
- Hankey, G.J. et al., 2004. Clinical usefulness of plasma homocysteine in vascular disease. *Med J Aust*, 181(6), pp.314–318.
- Herbert, V., 1994. Staging vitamin status in vegetarians13. *Am J Clin Nutr*, 59((suppl)), p.1213S–1222S.
- Howland, J.G. & Wang, Y.T., 2008. Synaptic plasticity in learning and memory: Stress effects in the hippocampus. *Progress in Brain Research*, 169(7), pp.145–158.
- Hubner, R.A. et al., 2007. Thymidylate synthase polymorphisms, folate and B-vitamin intake, and risk of colorectal adenoma. *British Journal of Cancer*, 97(10), pp.1449–56.
- Hwang, E., Willis, B.S. & Burwell, R.D., 2017. Prefrontal connections of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *Behavioural Brain Research*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432816313316> [Accessed September 16, 2017].
- Ide, S. et al., 2010. Reduced emotional and corticosterone responses to stress in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 58(1), pp.241–247. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19596019](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19596019).

- Izquierdo, I. et al., 2008. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 80(1), pp.115–127. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652008000100007&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652008000100007&lng=en&tlng=en) [Accessed September 17, 2017].
- Jadavji, N.M. et al., 2015. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency alters levels of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid in brain tissue. *Ymgmr*, 3, pp.1–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4750636/>.
- de Jager, C.A., 2014. Critical levels of brain atrophy associated with homocysteine and cognitive decline. *Neurobiology of aging*, 35(SUPPL.2), p.S39. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458014003583>.
- Jiang, W. et al., 2010. Characterization of the promoter region of TCblR/CD320 gene, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Gene*, 466(1–2), pp.49–55.
- Joëls, M. et al., 2017. Learning under stress: how does it work? *Trends in Cognitive Sciences*, 10(4), pp.152–158. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2006.02.002>.
- Johnson, E.O. et al., 1996. Distribution of hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA in a glucocorticoid resistant nonhuman primate. *Steroids*, 61(2), pp.69–73. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0039128X9500195V>.
- Jones, M.W. et al., 2001. *A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories.*
- Joseph, J. & Loscalzo, J., 2013. Methoxistasis: Integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients*, 5(8), pp.3235–3256.
- Kainuma, E. et al., 2017. Association of glucocorticoid with stress-induced modulation of body temperature, blood glucose and innate immunity. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10), pp.1459–1468. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.04.021>.
- Karst, H. & Joëls, M., 2005. Corticosterone Slowly Enhances Miniature Excitatory Postsynaptic Current Amplitude in Mice CA1 Hippocampal Cells. *Journal of Neurophysiology*, 94, pp.3479–3486.
- Kerek, R. et al., 2013. Early methyl donor deficiency may induce persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death and Disease*, 4(8), p.e755. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cddis.2013.278>.
- Kim, J.J. et al., 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(6), pp.453–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042880>.
- Kirby, E.D. et al., 2013. Acute stress enhances adult rat hippocampal neurogenesis and activation of newborn neurons via secreted astrocytic FGF2. *eLife*, 2013(2), pp.1–23.
- Kirsch, S.H., Herrmann, W. & Obeid, R., 2013. Genetic defects in folate and cobalamin pathways affecting the brain. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(1), pp.139–155.
- de Kloet, E.R. et al., 2000. Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int*, 57. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00971.x>.
- De Kloet, E.R. et al., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*, 19.
- Korz, V. & Frey, J.U., 2003. Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(19), pp.7281–7287.
- Kräutler, B. & Kr, B., 2005. Vitamin B 12 : chemistry and biochemistry 1<sup>o</sup>. *Biochemical*

- Society Transactions*, 33(Pt 4), pp.806–810.
- Lachner, C., 2012. The Neuropsychiatry of Vitamin B12 Deficiency in Elderly Patients. *Journal of Neuropsychiatry*, 24(1), p.5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450609>.
- Lai, S.-C. et al., 2011. *Down-Regulation of Transcobalamin Receptor TCblR/CD320 by siRNA Inhibits Cobalamin Uptake and Proliferation of Cells in Culture*,
- Lai, S.-C. et al., 2013. The transcobalamin receptor knockout mouse: a model for vitamin B12 deficiency in the central nervous system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(6), pp.2468–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3659357&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Langan, R.C. & Zawistoski, K.J., 2011. Update on vitamin B12 deficiency. *American Family Physician*, 83(12), pp.1425–1430.
- Lapish, C.C., Seamans, J.K. & Judson Chandler, L., 2006. Glutamate-Dopamine Cotransmission and Reward Processing in Addiction. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 30(9), pp.1451–1465. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1530-0277.2006.00176.x> [Accessed September 16, 2017].
- Leader, J.E. et al., 2006. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), pp.1589–1596. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295206003285>.
- Leal, G. et al., 2015. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Research*, 1621, pp.82–101. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899314014218> [Accessed September 17, 2017].
- Lee, A.T. et al., 2014. A Class of GABAergic Neurons in the Prefrontal Cortex Sends Long-Range Projections to the Nucleus Accumbens and Elicits Acute Avoidance Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 34(35), p.11519 LP-11525. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/34/35/11519.abstract>.
- Leung, L.S., Martin, L.-A. & Stewart, D.J., 1994. Hippocampal theta rhythm in behaving rats following ibotenic acid lesion of the septum. *Hippocampus*, 4(2), pp.136–147. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/hipo.450040204> [Accessed September 17, 2017].
- Li, Y.-J. et al., 2017. Dietary Supplement for Core Symptoms of Autism Spectrum Disorder: Where Are We Now and Where Should We Go? *Frontiers in Psychiatry*, 8, p.155. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5572332/>.
- Lim, H.-Y. et al., 2007. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology*, 122(1), pp.47–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2265978/>.
- Liu, X., Ramirez, S. & Tonegawa, S., 2013. Inception of a false memory by optogenetic manipulation of a hippocampal memory engram. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633), pp.20130142–20130142. Available at: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2013.0142>.
- Lopatina, O. et al., 2014. Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8(April), p.133. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4001052&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Losel, R. & Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell*

- Biol*, 4(1), pp.46–55. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1009>.
- Lupien, S.J. et al., 2007. The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and Cognition*, 65(3), pp.209–237.
- mabrouk, E. El et al., 2015. Troubles neurologiques par carence en vitamine B12 : étude rétrospective de 29 cas. *Revue Neurologique*, 171(Supplement 1), p.A107. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0035378715002672>.
- Magnaghi, V. et al., 2002. *Decreased GFAP-mRNA expression in spinal cord of cobalamin-deficient rats.*,
- Manolescu, B.N. et al., 2010. Homocysteine and vitamin therapy in stroke prevention and treatment: A review. *Acta Biochimica Polonica*, 57(4), pp.467–477.
- Manzanares, P.A.R., 2005. Previous Stress Facilitates Fear Memory, Attenuates GABAergic Inhibition, and Increases Synaptic Plasticity in the Rat Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience*, 25(38), pp.8725–8734. Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2260-05.2005>.
- Marsh, E.N., 1999. Coenzyme B12 (cobalamin)-dependent enzymes. *Essays in biochemistry*, 34, pp.139–54. Available at: <http://essays.biochemistry.org/content/34/139.abstract>.
- Martens, M.B., Celikel, T. & Tiesinga, P.H.E., 2015. A Developmental Switch for Hebbian Plasticity A. Morrison, ed. *PLoS Computational Biology*, 11(7), p.e1004386. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4501799/>.
- Martins, S., Guillery-girard, B. & Eustache, F., 2006. Modèles de la mémoire humaine : concepts et modèles en neuropsychologie de l'adulte et de l'enfant. *Epilepsies*, 18(Numéro spécial), pp.4–14.
- McCully, K., 2005. *Hyperhomocysteinemia and arteriosclerosis: Historical perspectives*,
- McEwan, I.J., 2009. Nuclear receptors: one big family. In I. J. McEwan, ed. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 3–18. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-575-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-575-0_1).
- McEwen, B.S. & Morrison, J.H., 2013. The Brain on Stress: Vulnerability and Plasticity of the Prefrontal Cortex over the Life Course. *Neuron*, 79(1), pp.16–29. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.028>.
- Michael Whitehead, V., 2006. Acquired and inherited disorders of cobalamin and folate in children. *British Journal of Haematology*, 134(2), pp.125–136.
- Miller, J.W., 2006. Assessing the association between vitamin B-12 status and cognitive function in older adults. *The American journal of clinical nutrition*, 84(6), pp.1259–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158405>.
- Mills, J.L. et al., 1995. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. *The Lancet*, 345(8943), pp.149–151. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673695901655>.
- Mokin, M. & Keifer, J., 2005. Expression of the immediate-early gene-encoded protein Egr-1 (zif268) during in vitro classical conditioning. *Learning & Memory*, 12(2), pp.144–149. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1074332/>.
- Monsey, M.S. et al., 2011. Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PLoS One*, 6(5), p.e19958. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21625500>.
- Moreno-Garcia, M.A., Rosenblatt, D.S. & Jerome-Majewska, L.A., 2013. Vitamin B12 metabolism during pregnancy and in embryonic mouse models. *Nutrients*, 5(9), pp.3531–3550.
- Morgese, M.G. et al., 2014. Modulatory Activity of Soluble Beta Amyloid on HPA Axis

- Function in Rats. *Current Pharmaceutical Design*, 20(15), pp.2539–2546. Available at: <http://www.eurekaselect.com/node/112916/article>.
- Morishita, W., Marie, H. & Malenka, R.C., 2005. Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nature Neuroscience*, 8(8), pp.1043–1050. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn1506>.
- Morris, M.J. & Monteggia, L.M., 2014. Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), pp.359–371.
- Morris, R.G.M. et al., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319(6056), pp.774–776. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/319774a0>.
- Mota, A. et al., 2016. Neuropsychiatric manifestations of vitamin B12 and folate deficiencies: Data from an inpatient psychiatric department. *European Psychiatry*, 33(Supplement), p.S371. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924933816013377>.
- Mulkey, R. et al., 1994. Involvement of a calcineurin/ inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*, 369(June 1994), pp.486–488. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/369486a0>.
- Murre, J.M.J. & Dros, J., 2015. Replication and Analysis of Ebbinghaus' Forgetting Curve D. R. Chialvo, ed. *PLoS ONE*, 10(7), p.e0120644. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492928/>.
- NA, C., 1967. Homocystinuria. Trial treatment of a 5-year old severely retarded child with a natural diet low in methionine. *Am J Dis Child*, 113(1), pp.95–7.
- Namour, F. et al., 2011. Luminal expression of cubilin is impaired in imerslund-gräsbeck syndrome with compound AMN mutations in intron 3 and exon 7. *Haematologica*, 96(11), pp.1715–1719.
- Navarra, T., 2004. *The Encyclopedia of Vitamins , Minerals and Supplememts*, Available at: [http://cdiac.esd.ornl.gov/oceans/GLODAP/glodap\\_pdfs/Thermohaline.web.pdf%5Cnhttp://books.google.com/books?id=upI55jwytpQC&pg=PA155](http://cdiac.esd.ornl.gov/oceans/GLODAP/glodap_pdfs/Thermohaline.web.pdf%5Cnhttp://books.google.com/books?id=upI55jwytpQC&pg=PA155).
- Novac, N. & Heinzl, T., 2005. Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 3, pp.335–346.
- O'Leary, F. & Samman, S., 2010. Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*, 2(3), pp.299–316.
- Oakley, R.H. & Cidlowski, J.A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), pp.1033–1044. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4084612/>.
- Obeid, R., 2013. The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients*, 5(9), pp.3481–3495. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798916/>.
- Van den Oever, M.C. et al., 2010. Prefrontal cortex plasticity mechanisms in drug seeking and relapse. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(2), pp.276–284. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763409001821>.
- Orozco-Barrios, C.E. et al., 2009. Vitamin B12-impaired metabolism produces apoptosis and Parkinson phenotype in rats expressing the transcobalamin-oleosin chimera in substantia nigra. *PLoS ONE*, 4(12).
- Ortsäter, H., Sjöholm, Å. & Rafacho, A., 2012. Regulation of Glucocorticoid Receptor

- Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. In S. B. T.-S. of the A. of T. E. Magdeldin, ed. *State of the Art of Therapeutic Endocrinology*. Rijeka: InTech, pp. 1–28. Available at: [http://www.researchgate.net/publication/231614936\\_Regulation\\_of\\_Glucocorticoid\\_Receptor\\_Signaling\\_and\\_the\\_Diabetogenic\\_Effects\\_of\\_Glucocorticoid\\_Excess/file/d912f507a404edd766.pdf](http://www.researchgate.net/publication/231614936_Regulation_of_Glucocorticoid_Receptor_Signaling_and_the_Diabetogenic_Effects_of_Glucocorticoid_Excess/file/d912f507a404edd766.pdf).
- Papez, J.W., 1937. A Proposed Mechanism of Emotion. *Archives of Neurology And Psychiatry*, 38(4), p.725. Available at: <http://archneurpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurpsyc.1937.02260220069003>.
- Pasternack, A. et al., 2002.  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptor Channels Lacking the N-terminal Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), pp.49662–49667. Available at: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M208349200> [Accessed September 17, 2017].
- Payne, A.S. & Freishtat, R.J., 2012. Conserved steroid hormone homology converges on NF $\kappa$ B to modulate inflammation in asthma. *Journal of Investigative Medicine*, 60(1), pp.13–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335887/>.
- Pedersen, G.A. et al., 2010. AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B12 receptor cubam by engaging ARH or Dab2. *Traffic*, 11(5), pp.706–720.
- Pétavy-Catala, C. et al., 2003. Signes buccaux révélateurs d'une carence en vitamine B12 avant l'apparition d'une anémie. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 1342(2), p.157 YP-249.
- PM, R., MJ, S. & Rifai, N., 2001. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: A comparison of c-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*, 285(19), pp.2481–2485. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.19.2481>.
- Pourié, G. et al., 2015. Folate- and Vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor  $\alpha$ . *FASEB Journal*, 29(9), pp.3713–3725.
- Quadros, E. V et al., 1999. Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *The American Journal of Physiology*, 277, pp.G161–G166. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10409163>.
- Quadros, E. V., 2010. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *British Journal of Haematology*, 148(2), pp.195–204.
- Quadros, E. V. et al., 2010. Positive newborn screen for methylmalonic aciduria identifies the first mutation in TCblR/CD320, the gene for cellular uptake of transcobalamin-bound vitamin B12. *Human Mutation*, 31(8), pp.924–929. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2909035/>.
- Quadros, E. V., Nakayama, Y. & Sequeira, J.M., 2009. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood*, 113(1), pp.186–192.
- Quadros, E. V, Nakayama, Y. & Sequeira, J.M., 2008. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin bound cobalamin The Protein and the Gene Encoding the Receptor for the Cellular Uptake of E Mail : Edward.Quadros@downstate.edu. *October*, 113(1), pp.186–193.
- Ralapanawa, D.M.P.U.K. et al., 2015. B(12) deficiency with neurological manifestations in the absence of anaemia. *BMC Research Notes*, 8, p.458. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4575440/>.
- Revest, J.-M. et al., 2010. The enhancement of stress-related memory by glucocorticoids depends on synapsin-Ia/Ib. *Molecular Psychiatry*, 15(12), pp.1140–1151. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2010.40>.
- Reynolds, E., 2006. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet. Neurology*, 5(11), pp.949–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052662>.
- Richter-Levin, G., 2004. The Amygdala, the Hippocampus, and Emotional Modulation of Memory. *The Neuroscientist*, 10(1), pp.31–39. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1073858403259955>.
- Rickard, T.C., Verfaellie, M. & Grafman, J., 2006. Transverse patterning and human amnesia. *Journal of cognitive neuroscience*, 18(10), pp.1723–33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1698463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Rock, C. & Apicella, A. junior, 2015. Callosal Projections Drive Neuronal-Specific Responses in the Mouse Auditory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 35(17), p.6703 LP-6713. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/35/17/6703.abstract>.
- Roozendaal, B., 2002. Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 78(3), pp.578–595. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742702940803>.
- Roozendaal, B., McEwen, B.S. & Chattarji, S., 2009. Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), pp.423–433. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2651>.
- Rosenbaum, R.S. et al., 2005. The case of K.C.: contributions of a memory-impaired person to memory theory. *Neuropsychologia*, 43(7), pp.989–1021. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028393204002696>.
- Roumestan, C. et al., 2004. *Les glucocorticoïdes et leur récepteur : mécanismes d'action et conséquences cliniques*,
- Sacca, R. et al., 2010. Genetically engineered mouse models in drug discovery research. In G. Proetzel & M. V Wiles, eds. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 37–54. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-058-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-058-8_3).
- Sahoo, M.K., Avasthi, A. & Singh, P., 2011. Negative symptoms presenting as neuropsychiatric manifestation of vitamin B12 deficiency. *Indian Journal of Psychiatry*, 53(4), pp.370–371. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267352/>.
- Salkoff, D.B. et al., 2015. Synaptic Mechanisms of Tight Spike Synchrony at Gamma Frequency in Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 35(28), p.10236 LP-10251. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/35/28/10236.abstract>.
- Sandi, C., 1998. The Role and Mechanisms of Action of Glucocorticoid \rInvolvement in Memory Storage. *Neural Plasticity*, 6(3), pp.41–52.
- Scalabrino, G., 2009. The multi-faceted basis of vitamin B12 (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. *Progress in Neurobiology*, 88(3), pp.203–220. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008209000586>.
- Schandler, S.L. et al., 1996. Visuospatial information processing in intoxicated, recently detoxified, and long-term abstinent alcoholics. *Journal of Substance Abuse*, 8(3), pp.321–333. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899328996901790>.

- Scherer, K., 2003. Neurologic Manifestations of Vitamin B12 Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 348(22), p.2208. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMicm020588>.
- Schoneveld, O.J.L.M., Gaemers, I.C. & Lamers, W.H., 2004. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1680(2), pp.114–128. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478104001794>.
- Schwabe, L. et al., 2012. Stress effects on memory: An update and integration. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(7), pp.1740–1749. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.002>.
- Scott, C.R. et al., 1972. Hereditary transcobalamin II deficiency: The role of transcobalamin II in vitamin B12-mediated reactions. *The Journal of Pediatrics*, 81(6), pp.1106–1110. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347672802397>.
- Scoville, W.B. & Milner, B., 1957. Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 20(1), pp.11–21. Available at: <http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.20.1.11>.
- Seshadri, S. et al., 2002. Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 346(7), pp.476–483. Available at: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa011613>.
- Shimamura, A.P. & Squire, L.R., 1991. The relationship between fact and source memory: Findings from amnesic patients and normal subjects. *Psychobiology*, 19(1), pp.1–10. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF03337951>.
- Shimamura AP, S.L., 1986. Memory and metamemory: a study of the feeling-of-knowing phenomenon in amnesic patients. *Cogn., J Exp Psychol Learn Mem*, 12(3), pp.452–60.
- Shinton, N.K., 1972. Vitamin B 12 and folate metabolism. *British Medical Journal*, 1(5799), pp.556–559. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1787440/>.
- Da Silva, V.C. et al., 2014. Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring. *PLoS ONE*, 9(4), pp.1–8.
- Skovby, F., Gaustadnes, M. & Mudd, S.H., 2010. A revisit to the natural history of homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99(1), pp.1–3.
- Slattery, D.A. & Neumann, I.D., 2008. No stress please! Mechanisms of stress hyporesponsiveness of the maternal brain. *The Journal of Physiology*, 586(2), pp.377–385. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2007.145896>.
- Smach, M.A. et al., 2013. Homocystéine, vitamine B12 et acide folique dans le déclin cognitif chez les personnes âgées. *Pathologie Biologie*, 61(5), pp.184–192. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0369811412000508>.
- Smith, A.D. et al., 2010. Homocysteine-Lowering by B Vitamins Slows the Rate of Accelerated Brain Atrophy in Mild Cognitive Impairment: A Randomized Controlled Trial. *PLOS ONE*, 5(9), p.e12244. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012244>.
- Smith, S.M. & Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), pp.383–395. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3181830/>.
- Solomon, L.R., 2007. Disorders of cobalamin (Vitamin B12) metabolism: Emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews*, 21(3), pp.113–130.
- Speksnijder, N. et al., 2012. Glucocorticoid receptor and myocyte enhancer factor 2 cooperate

- to regulate the expression of c-JUN in a neuronal context. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(1), pp.209–218.
- Squire, L.R., 2009. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron*, 61(1), pp.6–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649674/>.
- Stabler, S.P., 2013. Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency. *New England Journal of Medicine*, 368(2), pp.149–160. Available at: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1113996>.
- Stahn, C. & Buttgereit, F., 2008. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheum*, 4(10), pp.525–533. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ncprheum0898>.
- Stanger, O. et al., 2009. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert review of neurotherapeutics*, 9(9), pp.1393–1412. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ern.09.75>.
- Stepan, J., Dine, J. & Eder, M., 2015. Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP. *Frontiers in Neuroscience*, 9, p.160. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422028/>.
- Stover, B.S.P., 2008. Folate and vitamin B12 deficiencies. Proceedings of a WHO technical consultation held 18-21 October, 2005, in Geneva, Switzerland. *Food and nutrition bulletin*, 29(2 Suppl).
- Sudha seshadri et al., 2002. Plasma Homocysteine As a Risk Factor for Dementia and Alzheimer ' S Disease. *The New England Journal of Medicine PLASMA*, 346(7), pp.476–483.
- Suzuki, N. & Bekkers, J.M., 2012. Microcircuits Mediating Feedforward and Feedback Synaptic Inhibition in the Piriform Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 32(3), p.919 LP-931. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/32/3/919.abstract>.
- Sweatt, J.D., 2003. Introduction. In *Mechanisms of Memory*. pp. 3–28. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780126789577500037> [Accessed September 16, 2017].
- Takahashi-Iñiguez, T. et al., 2012. Role of vitamin B12 on methylmalonyl-CoA mutase activity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(6), pp.423–437. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1631/jzus.B1100329>.
- Tanner, S.M. et al., 2012. Inherited cobalamin malabsorption. Mutations in three genes reveal functional and ethnic patterns. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), p.56. Available at: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-7-56>.
- Tartar, J.L. et al., 2006. Hippocampal synaptic plasticity and spatial learning are impaired in a rat model of sleep fragmentation. *The European journal of neuroscience*, 23(10), pp.2739–2748. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607950/>.
- Teplitsky, V. et al., 2004. *Hereditary partial transcobalamin II deficiency with neurologic, mental and hematologic abnormalities in children and adults*,
- Thakkar, K. & Billa, G., 2015. Treatment of vitamin B12 deficiency- Methylcobalamine[quest] Cyanocobalamine[quest] Hydroxocobalamine[quest][mdash]clearing the confusion. *Eur J Clin Nutr*, 69(1), pp.1–2. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2014.165>.
- Thornton, J.W. & DeSalle, R., 2000. A new method to localize and test the significance of incongruence: detecting domain shuffling in the nuclear receptor superfamily. *Syst Biol*, 49(2), pp.183–201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118404%5Cnhttp://www.jstor.org/stable/pdfplus/2585216.pdf?acceptTC=true>.

- Trapp, T. et al., 1994. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: A new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*, 13(6), pp.1457–1462. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0896627394904316>.
- Troen, A.M., Shea-Budgell, M., et al., 2008. B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), pp.12474–12479. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2517600/>.
- Troen, A.M., Chao, W.-H., et al., 2008. Cognitive impairment in folate-deficient rats corresponds to depleted brain phosphatidylcholine and is prevented by dietary methionine without lowering plasma homocysteine. *The Journal of nutrition*, 138(12), pp.2502–2509.
- Tsai, K.J. et al., 2002. Sgk, a Primary Glucocorticoid-Induced Gene, Facilitates Memory Consolidation of Spatial Learning in Rats. *Pnas*, 99(6), pp.3990–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tse, Y.C. et al., 2011. Modulation of Synaptic Plasticity by Stress Hormone Associates with Plastic Alteration of Synaptic NMDA Receptor in the Adult Hippocampus. *PLOS ONE*, 6(11), p.e27215. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027215>.
- Tulving, E., 1986. Episodic and semantic memory: Where should we go from here? *Behavioral and Brain Sciences*, 9(3), p.573. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0140525X00047257](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0140525X00047257).
- Vadis, Q., 1960. Organization of Memory : *Memory*, pp.839–847.
- Vella, F., 1988. *Harper's Biochemistry (21st Edition)*, Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0307441288900295>.
- Verroust, P.J. & Hammond, T.G., 2000. Rôle physiopathologique de la cubiline et de la mégaline. , 2000.
- Vertes, R., 2005. Hippocampal theta rhythm: a tag for short-term memory. *hippocampus*, 7(15), pp.923–35.
- Vesin, C. et al., 2007. Homocystéine et risque cardiovasculaire. , 19, pp.143–149.
- Villasana, L.E. et al., 2015. Functional Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons after Traumatic Brain Injury. *eNeuro*, 2(5), p.ENEURO.0056-15.2015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4603252/>.
- Vitureira, N. & Goda, Y., 2013. The interplay between hebbian and homeostatic synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*, 203(2), pp.175–186. Available at: <http://jcb.rupress.org/content/203/2/175> [Accessed September 17, 2017].
- Watanabe, F., 2007. Vitamin B<sub>12</sub> Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), pp.1266–1274. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3181/0703-MR-67>.
- Watkins, D. et al., 2011. Novel inborn error of folate metabolism: identification by exome capture and sequencing of mutations in the <em>MTHFD1</em> gene in a single proband. *Journal of Medical Genetics*, 48(9), p.590 LP-592. Available at: <http://jmg.bmj.com/content/48/9/590.abstract>.
- Wei, W. et al., 2011. Folate/vitamin-B12 prevents chronic hyperhomocysteinemia-Induced tau hyperphosphorylation and memory deficits in aged rats. *Journal of Alzheimer's Disease*, 27(3), pp.639–650.
- Whitlock, J.R., 2006. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science*, 313(5790), pp.1093–1097. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1128134>.

- Wilcken, D.E. & Wilcken, B., 1976. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 57(4), pp.1079–1082. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC436752/>.
- Yang, Y. et al., 2003. Both stress experience and age determine the impairment or enhancement effect of stress on spatial memory retrieval. *Journal of Endocrinology*, 178(1), pp.45–54.
- Zhang, J. et al., 2010. Neuronal Nitric Oxide Synthase Alteration Accounts for the Role of 5-HT. *The Journal of Neuroscience*, 30(7), pp.2433–2441. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/30/7/2433.abstract>.
- Zhao, M. et al., 2007. Synaptic Plasticity (and the Lack Thereof) in Hippocampal CA2 Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27(44), p.12025 LP-12032. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/27/44/12025.abstract>.
- Zhe, D., Fang, H. & Yuxiu, S., 2008. Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats. *Acta histochemica et cytochemica*, 41(4), pp.89–95.
- Zhu, S. et al., 2017. Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell*, 165(3), pp.704–714. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.028>.
- Zhuo, J.M. & Praticò, D., 2010. Acceleration of brain amyloidosis in an Alzheimer's disease mouse model by a folate, vitamin B6 and B12-deficient diet. *Experimental Gerontology*, 45(3), pp.195–201. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556509002988>.
- Zséli, G. et al., 2017. Neuronal connections of the central amygdalar nucleus with refeeding-activated brain areas in rats. *Brain Structure and Function*. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1501-4>.
- Zulfiqar, A.A. et al., 2012. Maladie de Biermer: De la physiopathologie à la clinique. *Medecine Therapeutique*, 18(1), pp.21–29.

## **FICHES TECHNIQUES**

## **Fiche 1**

- **Mise à mort**

- Mise à mort des animaux par excès d'isoflurane et décapitation

- **Prélèvements sanguins**

- Prélèvement dans des tubes héparinés et centrifugation 3500g, 10 minutes, 4°C
- Traitement d'une fraction du plasma avec 10% d'acide acétique 1N. Conservation de la seconde fraction de plasma sous forme non traitée. Stocker à -80°C.

- **Prélèvements tissulaires**

- Le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne et les hémisphères sont dissociés selon l'axe sagittal.
- Le demi-cerveau droit est déposé dans du PFA 4%.
- Le demi-cerveau gauche est micro-disséqué (hippocampe et cortex) et congelé dans de l'azote liquide.
- Les organes prélevés en PFA 4% sont fixés dans la solution pendant 24h, rincés 3x5 min au PBS1X.
- Les cerveaux sont traités selon un gradient de sucrose (10%, 20%, 30%) avant d'être congelés à -25°C dans du méthylbutane
- Couper les demi-cerveaux droits congelés à 12 µm d'épaisseur au cryostat.

## Fiche 2

### **PCR POUR GENOTYPAGE (TEST KAPA)**

#### **Extraction d'ADN**

- L'extraction est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction (KAPA Mouse genotyping kit <sup>(1)</sup>) selon les recommandations du fabriquant
- Le morceau de queue est placé dans un Eppendorf de 200µL dans lequel sont ajoutés 10 µL de tampon KAPA 10X, 2 µL d'enzyme (1 U/µL) et 88 µL d'eau.
- Les échantillons sont incubés à 75°C pendant 10 min puis à 95°C pendant 5 min (Biosystem).
- Les échantillons d'ADN ainsi obtenus sont stockés à -20°C.

#### **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

- La PCR a été réalisée selon les recommandations du fabriquant, à l'aide du kit KAPA mouse genotyping kit <sup>(2)</sup>.
- Dans un tube de 200 µL sont ajoutés successivement 12,5 µL de tampon 2x KAPA2G Fast Genotyping Mix, 0,2 µL d'amorces sens concentrées à 10 µM, 0,2 µL d'amorces anti-sens wild type et 0,2 µL d'amorces anti-sens mutant concentrées également à 10 µM, puis 2 µL d'extrait d'ADN préalablement préparé, le tout complété à 25 µL avec de l'eau ultra-pure.
- L'amplification a été réalisée dans un thermocycler<sup>(3)</sup> (Icycler, Biorad) selon le programme suivant :

Dénaturation initiale	94°C	3 min
Dénaturation	94°C	20 min
Hybridation	60°C	20 min
Elongation	72°C	30 sec
Elongation finale	72°C	3 sec

} 30 cycles

## **Electrophorèse sur gel d'agarose**

### **Préparation du gel**

- Peser 0,8 g d'agarose <sup>(4)</sup>, et transférer dans un erlenmeyer propre.
- Ajouter 80 mL de TBE <sup>(5)</sup> avec une éprouvette graduée. Mélanger manuellement.
- Placer l'erlenmeyer dans le micro-onde, et chauffer jusqu'à ébullition de la solution, laisser bouillir 10 s.
- Sortir avec précaution l'erlenmeyer du micro-onde et laisser refroidir la solution (jusqu'à 50-60 °c).
- - Préparer le système de coulage et le placer sur une surface bien horizontale et disposer dans les encoches prévues à cet effet le peigne nécessaire à la réalisation des puits dans le gel.
- Ajouter 1 goutte de BET <sup>(6)</sup> à la solution. Mélanger manuellement.
- Verser la solution dans le system. Attendre la polymérisation de l'agarose, 10-30 min.
- Enlever délicatement le peigne.
- Récupérer le rack avec le gel et le place'r dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1x

### **Préparation et dépôt des échantillons**

- Charger 12,5 µL de chaque échantillon + contrôle (+) + contrôle (-) dans des puits consécutifs et ajouter 5 µL de marqueur de taille 100 pb <sup>(7)</sup> dans le premier puits.
- Fermez le couvercle du réservoir à gel et raccordez les fils électriques.

### **Migration**

- Régler la migration pour un grand gel à 110 V constant et pour un petit gel à 80 V constant.
- Faire la migration jusqu'au moment où le bleu de bromophénol a migré jusqu'au  $\frac{3}{4}$  environ de la longueur totale du gel ( $\pm$  40 à 60 minutes).
- Couper le courant, récupérer le rack avec le gel en égouttant le TBE autant que possible.
-

## Révélation

- Positionnez le gel sur le tiroir de l'appareil de révélation et photographiez le gel.
- Taille attendue : 736 pb (WT), 549 pb (Mutant)

---

(1) Biosystem, KB7101

(2) KAPA Biosyste, KK7302)

(3) Icycler, Biorad

(4) Eurobio, GEPAGA07

(5) Tris base 108 g/L, Acide borique 55 g/L, EDTA 3,72 g/L , H2O qsp 1 L

(6) Eurobio, GEPBET000M

(7) Invitrogen, 15628-050

### Fiche 3

#### **EXTRACTION DES PROTEINES A PARTIR DE TISSU CEREBRAL**

**NB :** L'extraction des protéines se fait en conditions dénaturantes à partir des microdissections de cerveau.

- Extraction des protéines (travailler toujours sur de la glace)
  - Préparer du tampon de lyse RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay)
  - Introduire le volume correspondant de tampon RIPA froid selon la Microstructure (0.1 g tissu/500µL tampon)
  - Broyer les échantillons manuellement à l'aide d'un micropilon
  - Incuber 10 minutes dans la glace
  - Homogénéiser le mélange par 10 à 20 allers-retours avec une seringue
  - Faire 3 cycles de congélation-décongélation (30s azote-30s bain marie à 37°C)
  - Centrifuger 30 minutes à 4°C, 18000rpm
  - Récupérer le surnageant et stocker à -80°C si le dosage n'est pas fait de suite.

#### ***Solutions stock***

Tampon RIPA	Tris-HCl pH 8	50 mM	}	Dilué dans du PBS 1x
	NaCl	150 mM		
	NP40	1%		
	DOC	0.5%		
	SDS	0.1%		
	PMSF	10 µL/mL RIPA	}	A ajouter dans le tampon RIPA juste avant de commencer l'extraction
	Cocktail anti protéase	1.4µL/mL RIPA		

---

(1) cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science, Meylan, France)

(2) centrifugeuse Allegra™ X-22R, Beckman, France

## Fiche 4

### DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE (BCA)

- Préparer une gamme étalon (2 ; 1,8 ; 1,4 ; 1,2 ; 0,8 ; 0,4 ; 0,2 ; 0 mg/mL, en duplicats) à partir d'une solution stock de BSA <sup>(2)</sup> (bovine serum albumin) à 2 mg/mL diluée dans la même solution que les échantillons à doser (tampon de lyse RIPA)

	Sol. BSA 2mg/mL	Volume de BSA (µL)	Volume de tampon RIPA (µL)
A	2	100	0
B	1.8	90	10
C	1.4	70	30
D	1.2	60	40
E	0.8	40	60
F	0.4	20	80
G	0.2	10	90
H	0	0	100

- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA) avec 1 volume de réactif B (CuSO<sub>4</sub>) <sup>(3)</sup>
- Dans une plaque 96 puits à fond plat, distribuer 25 µL de chaque standard, du blanc (tampon de lyse RIPA) et de chaque échantillon dans les puits (2 prises d'essai).
- Ajouter 200 µL de réactif de travail dans chaque puits et agiter la plaque.
- Couvrir la plaque et laisser 30 min à 37°C.
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre lecteur de plaque <sup>(4)</sup> en tenant compte des facteurs de dilution
- Tracer la droite de régression étalon et déduire la concentration protéique des échantillons
- Stocker les échantillons après dosage à -80°C

---

(1) kit BCA: Protein Assay® Reagent (Interchim, France)

(2) BSA : 2 mg/mL d'une solution de 0,9% (p/v) NaCl et 0,05% (p/v) NaN<sub>3</sub>

(3) Réactif B : solution de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée

(4) lecteur de plaque Victor wallac Multilabel, Perkin Elmer

## **Fiche 5**

### **ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITIONS DENATURANTES (SDS-PAGE)**

#### **□ Préparation des gels**

- Passer les plaques de verre à l'eau distillée puis à l'alcool
- Monter l'appareil d'électrophorèse <sup>(1)</sup> : plaques de verre et spacers (en général 1,5 mm)
- Préparer le mélange pour le gel de séparation à la concentration souhaitée <sup>(2)</sup> (prévoir 10 mL de Solution par gel) et le couler entre les deux plaques de verre
- Déposer un film de 0,5 à 1 mL d'isopropanol sur le gel et laisser polymériser le gel (le temps de polymérisation est en fonction de la température ambiante)
- Retirer l'isopropanol, rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau
- Préparer le mélangeur pour le gel de concentration <sup>(3)</sup> et le couler au-dessus du gel de séparation jusqu'en haut
- Positionner le peigne en Téflon, qui crée les puits (10 ou 15 puits) en évitant la formation de bulles et laisser polymériser.
- Retirer le peigne et rincer soigneusement les puits avec d'eau distillée
- Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central d'électrode en forme de U.
- Remplir le réservoir central jusqu'en haut ainsi que la cuve avec le tampon de migration <sup>(4)</sup>

#### **□ Préparation des échantillons**

En général, prévoir un dépôt de 20 à 30 µg de protéines par puits.

- Dans un tube, ajouter 1 volume de tampon de dépôt LaemmLi 2X <sup>(5)</sup> à 1 volume d'échantillon
- Chauffer 5 min les échantillons à 95-100°C
- Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire <sup>(6)</sup>

## Migration sur un générateur à voltage constant

- Laisser migrer à 80V les échantillons dans le gel de concentration environ 15mn
- Une fois dans le gel de séparation, laisser migrer à 110V jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel (environ 2 heures)
- Arrêter la migration

## **Electro-transfert liquide**

### Préparation de la membrane

- Découper une membrane PVDF<sup>(7)</sup> ou en nitrocellulose<sup>(8)</sup> (le cas échéant) à la dimension du gel : 7x8,5 cm minimum
- Mettre la membrane PVDF (uniquement) dans du méthanol pendant 1 minute afin de la perméabiliser
- Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert<sup>(9)</sup> froid (5 min max.) ainsi que les éponges et les filtres environ une demi-heure avant la fin de la migration.
- Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5min max)

### Transfert

- Préparer une cassette de transfert dans laquelle il faut superposer sur la face blanche dans l'ordre :
  - Une éponge
  - Un papier filtre<sup>(10)</sup>
  - La membrane PVDF ou nitrocellulose
  - Le gel de polyacrylamide
  - Un papier filtre (expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique)
  - Une éponge et fermer la cassette
- Placer les cassettes dans le module de transfert<sup>(11)</sup>, face noire vers face noire
- Mettre le glaçon et remplir la cuve avec du tampon froid
- Le transfert se fait à ampérage constant 350mA pendant 45mn

## **Electro-transfert semi-sec**

- Préparation de la membrane (Même procédure que pour le transfert liquide)
- Transfert

- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
  - Un papier filtre Whatman® 3MM3
  - La membrane de PVDF ou nitrocellulose
  - Le gel de polyacrylamide
  - Un papier filtre Whatman® 3MM
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau
- Eponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil <sup>(12)</sup> sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10V pendant 45 min

### **Vérification du transfert**

- Colorer la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S <sup>(13)</sup> pendant 5min puis décoloration à l'eau distillée.

### **Blocage**

- Mettre les membranes dans une solution de TBST <sup>(14)</sup> /lait écrémé 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante afin de bloquer les sites spécifiques.

**NB** : suivant les anticorps, la solution de blocage peut être faite soit avec de la BSA soit avec du lait écrémé (idem pour la dilution des anticorps)

### **Anticorps primaire** <sup>(15)</sup>

- Découper une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane
- Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5% (4 à 5 mL au total)
- Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps,
- Souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

## **Lavages**

- Sortir la membrane de sa pochette plastique
- Rincer la membrane avec du TBST 4x10min sous agitation rapide à température ambiante

## **Anticorps secondaire**<sup>(16)</sup>

- Procéder de la même façon qu'avec le 1er anticorps
- Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

## **Lavages**

- Idem lavages ci-dessus

## **Révélation ECL**

- Préparer la solution ECL<sup>TM</sup><sup>(17)</sup> (pour une membrane prévoir 1 mL au total)
- Sur un film Saran déposer 1mL d'ECL/ membrane complète
- Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECL<sup>TM</sup>, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles et incuber 2 à 5 min
- Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une pochette plastique.
- Déposer la membrane dans le fusion et se référer aux instructions du fusion

## **Analyse densitométrique**

On utilise le logiciel imageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health) pour quantifier l'intensité des bandes présentes sur les membranes. Par délimitation d'une zone autour de la bande, le programme mesure la densitométrie par contraste entre la protéine d'intérêt et le bruit de fond.

---

(1) Mini-Protean II (Biorad)

**Tableau 2: Solutions pour la préparation des gels de séparation (pour une solution d'acrylamide à 30%)**

(2)

		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6%	H <sub>2</sub> O MQ	2.7	5.3	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
	Acrylamide <sup>(18)</sup> Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1.5M pH 8.8 <sup>(19)</sup>	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10% <sup>(20)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10% <sup>(21)</sup>	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED <sup>(22)</sup>	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	H <sub>2</sub> O MQ	2.3	4.6	7	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	Acrylamide Mix 29:1	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	H <sub>2</sub> O MQ	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	H <sub>2</sub> O MQ	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	H <sub>2</sub> O MQ	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
	Acrylamide Mix 29:1	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

**Tableau 3: Solutions pour la préparation des gels de Concentration (pour une solution d'acrylamide à 30%)**

(3)

		1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Stacking	H <sub>2</sub> O MQ	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
	Acrylamide Mix 29:1	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
	Tris 0.5M pH 6.8 <sup>(23)</sup>	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
	SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	APS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

(4) Tampon de migration 10x concentré (pour 1 litre) : Tris 250 mM, glycine 1,92 M et SDS 1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C). A utiliser 1X concentré : diluer 100 mL de la solution 10X et compléter à 1 litre (Utiliser à température ambiante).

(5) tampon LaemmLi 2X : sigma- Aldrich (St Louis, USA)

(6) Marqueurs de poids moléculaire : Low Molecular Weight (LMW)

(7) Membrane PVDF, porosité 0,45µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes- la-Coquette, France)

(8) Membrane nitrocellulose : porosité 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes- la-Coquette, France)

(9) Tampon de transfert 10X (pour 1 litre) : Tris 480 mM, glycine 390 mM et SDS 0,375% (p/v) pH~9,2 (Ne pas ajuster avec HCl ; conserver à 4°C). A utiliser 1X concentré : diluer 100mL de la solution 10X+200 mL d'éthanol 100% et compléter à 1 litre (Utiliser froid)

(10) Papier filtre d'épaisseur 1 mm (blotting paper - Sigma, St Louis, USA)

(11) Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (BioRad)

(12) Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Biorad)

(13) Solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0,5% (p/v), acide acétique 1% (v/v), filtrée 0.2µm, 4°C) (SigmaAldrich, St Louis, USA)

(14) Solution de TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100mL de la solution TBS 10X + qsp H<sub>2</sub>O MQ 1 litre + 1mL de Tween 20 à 0,1%. TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4, qsp H<sub>2</sub>O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ;conserver à 4°C)

(15) Voir fiche « liste des anticorps primaires utilisés en western blot »

(16) Voir fiche « liste des anticorps secondaires utilisés en western blot »

(17) Amersham Pharmacia Biotech

(18) Acrylamide: bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories)

(19) Tris-HCl 1,5M pH 8,8 : 18,165 g de Tris/100mL H<sub>2</sub>O MQ (ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C)

(20) SDS 10% (sodium dodécylsulfate) : 10 g de SDS/100mL H<sub>2</sub>O MQ, sous agitation douce (Conserver à température ambiante)

(21) APS 10% (ammonium persulfate) : 1g/10mL H<sub>2</sub>O MQ, aliquoter par 400µL (conserver à -20°C)

(22) Temed

(23) Tris-HCl 0,5M pH 6,8 : 6,055 g de Tris/100mL H<sub>2</sub>O MQ (ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C).

**Tableau 4: Anticorps primaires utilisés en Western blot.**

Nom	Source	Fournisseur	Dilution
Glucocorticoïde récepteur GR	Mouse	Novus Biological	1/200
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ )	Mouse	Calbiochem	1/500
Synapsine I (SYN I)	Rabbit	Millipore	1/1000
Synapsine II (SYN II)	Rabbit	Abcam	1/100
Protein arginine N-methyltransferase PRMT1	Rabbit	Cell signaling	1/1000
Early Growth Response Protein 1 (EGR1)	Rabbit	Cell signaling	1/1000
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Chicken	Millipore	1/1000

**Tableau 5: Anticorps secondaires utilisés en Western blot.**

Anticorps secondaires	Espèce hôte	Espèce reconnue	Fournisseur
Anti - Mouse IgG - HRP	Ane	Souris	Santa Cruz
Anti - Rabbit IgG - HRP	Ane	Rabbit	Santa Cruz
Anti-Chicken IgY-B	Goat	Chicken	Santa cruz

## **Fiche 6**

### **DÉSHYBRIDATION DE MEMBRANE APRÈS WESTERN BLOTTING (STRIPPING)**

Principe : Les membranes ayant déjà été incubées avec des anticorps primaires et secondaires peuvent être ré-incubées avec un autre anticorps après avoir été déshybridées.

- Chauffer le tampon entre 37 et 50°C.
- Sous hotte, remplir un bac en verre de tampon de déshybridation<sup>(1)</sup> chaud
- Immerger les membranes dans les bacs pendant 30 min dans un bain-marie en agitant de temps en temps
- Rincer rapidement les membranes à l'eau distillée
- Rincer ensuite avec du tampon de lavage TBST<sup>(2)</sup> 2x10 min sous agitation rapide
- Reprendre le protocole de western à partir du tampon de blocage.

---

(1) Tampon de déshybridation : Pour 1 litre, 100 mM 2-mercaptoethanol 7 mL, 2 % SDS 20g, 62,5mM Tris HCL pH 6,7 7,57g

(2) TBST 10x : Pour 1 litre, Tris 200 mM 24,2g, NaCl 1,5 M 87,5g, pH 7,4 à ajuster avec HCl Qsp H2O MilliQ. Conserver à 4°C.

## **Fiche 7**

### **EXTRACTION CYTOSOLIQUE A PARTIR DE TISSU CEREBRAL**

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

---

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

## Fiche 8

### **DOSAGE RADIO - IMMUNOLOGIQUE DES VITAMINES B9 ET B<sub>12</sub>**

Les dosages ont été effectués sur des extractions cytosoliques à partir de tissu cérébral à l'aide du kit Coffret SimulTRAC – SNB<sup>(1)</sup>.

Le protocole utilisé est celui décrit par le fabricant :

□ Extraire la fraction cytosolique à partir de tissu cérébral (fiche précédente)

- Les courbes d'étalonnages sont réalisées sur 6 points :

Vitamine B12 (0 – 74 – 148 – 296 – 740 – 1480 pmol/L)

Folates (0 – 2,3 – 4,5 – 9,1 – 23 – 45 nmol/L)

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

---

(1) Kit SimulTRAC – MP Biomedicals

(2) DTT : Solution de Dithiothreitol SimulTRAC-SNB

(3) Compteur gamma : Fluostar Galaxy (BMG LabTechnologies, Champigny sur Marne, France)

Compteur COBRA-IIr<sup>TM</sup> autogamma (Packard) à double canal

## Fiche 9

### **DOSAGE DE L'HOMOCYSTEINE, ACIDE METHYLMALONIQUE ET ACIDE SUCCINIQUE**

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

#### **Préparation des réactifs**

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

	<b>Homocystine<sup>①</sup></b>	<b>Homocystine d8<sup>②</sup> (98%)</b>
<b>Poudre (mg) *</b>	13,27	13,8
<b>HCl 0,1 N (<i>T° amb, hormones</i>)</b>	50 mL	50 mL
	Vortexer, Soniquer	
<b>NaOH 10 M (+ 4°C, hormones)</b>	1 mL	1 mL
<b>Dithiothréitol (DTT)</b>	132,7 mg	132,7 mg
<b>HCl 0,1 N</b>	qsp 100 mL	
	Vortexer, Soniquer	
<b>Concentration solution mère</b>	1 mM d'homocystéine	1 mM d'homocystéine d4
Aliquoter par fraction de 0,7 mL Congeler à - 20°C.		

\* NB : Vérifier les quantités à peser pour chaque nouveau flacon en fonction de la masse et de la pureté du produit

#### **Préparation de la gamme d'étalonnage**

- Diluer S8 au 1/2 jusque S1 dans le pool de plasma :

<b>Concentration finale (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>S8</b>	<b>S7</b>	<b>S6</b>	<b>S5</b>	<b>S4</b>	<b>S3</b>	<b>S2</b>	<b>S1</b>
<b>Homocystéine</b>	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.781

#### **Préparer le mélange de standards internes**

- 150  $\mu\text{L}$  de **HCYd4** à 1 mmol/L
- 150  $\mu\text{L}$  d'**ac succinique d6** à 1 mmol/L
- 10  $\mu\text{L}$  d'Ac. Méthylmalonique (**MMA**) **d3** à 2 mmol/L

- 4,5 mL de DTT 2200 mmol/L

### Préparation des contrôles d'homocystéine

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

### Préparer une solution d'extraction de méthanol contenant 0,1% (v/v) d'acide formique<sup>④</sup>

#### Préparation des échantillons

- Décongeler les plasmas, les vortexer et les centrifuger (10 min, 2300 g à 4°C)
- Allumer la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffe)
- Dans un tube de 1,5 mL en polypropylène :
- 

	<b>Double blanc</b>	<b>Standards S0</b>	<b>Standards S1 à S8</b>	<b>Contrôles (pool, levels 1 et 2)</b>	<b>Plasma</b>
Echantillon	50 µL pool	50 µL Pool	50 µL	50 µL	50 µL
Standard interne	0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
DTT 200 mM	50 µL	0	0	0	0
<b>Vortexer ATTENDRE 15' à température ambiante</b>					
meOH 0,1% ac. formique	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

- Vortexer et incubé 30 min à 4°C
- Vortexer et centrifuger à 20 000 g pendant 10 min à 4°C
- Reprendre 100 µL de surnageant dans un microtube de 1,5 mL (congeler éventuellement si nécessaire de faire ultérieurement l'étape LCMS/MS) par 400 µL d'eau 0,1% (v/v) ac formique (= dilution au 1/5ème)
- Vortexer et centrifuger à 20 000 g pendant 10 min à 4°C
- Transférer sur microplaque Waters 350 µL ou 1 mL (ne pas remplir les puits à plus d'1/3)
- Sceller les plaques avec un film plastique à l'aide de la thermosoudeuse Waters (30 min de préchauffage)
- Passer sur LC/MSMS selon la technique ci-après

## Méthodes

- Lancement de la méthode LCMSMS *via* Analyst<sup>□</sup>:
- Méthode UPLC Acquity: &ISO\_2.80 MIN\_95-5\_FL.method
- Méthode d'acquisition : \&T3\_HCY\_MMA\_AC SUCC\_ISO\_FL\_H6.dam
- Méthode de quantification : HCY –AC SUCC-MMA.qmf

---

(1) DL Homocystine, acide succinique, Dithiothréitol (DTT) en poudre (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)

(2) Standards internes (SI) d8 Homocystine (DLM 3619, Cambridge isotopes)

(3) Homocystéine Plasma Control Level I (n°0072) & Level II (n°0073) lyophilisé (Chromsystems)

(4) Acide Formique 98%: (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)

(5) Colonne UPLC: Acquity UPLC HSS T3 (1,8µm ; 2,1 x 50 mm) UPLC Acquity Waters, Boucle d'injection de 10 µL

Spectromètre de Masse 4000 QTrap Applied Biosystems / MDS Sciex

## **Fiche 10**

### **MARQUAGE D'IMMUNOFLUORESCENCE**

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3 min à température ambiante (ne pas les laisser sécher).
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™.
- Rincer les lames dans un bain de PBS <sup>(1)</sup> 1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce (facultatif).
- Incuber les coupes dans un bain de Triton <sup>(2)</sup> 0,1% PBS 1x afin de perméabiliser les membranes, pendant 10 min à température ambiante.
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante
- Entourer de nouveau les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200 µL d'une solution de BSA <sup>(3)</sup> à 10% diluée dans du triton 0.1 % (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber 1h à température ambiante
- Déposer environ 100 µL d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de BSA 10%) s'il y a deux anticorps sinon 200 µL et laisser incuber de 24 à 72h selon l'anticorps dans une chambre humide à 4°C sous agitation douce.
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min à température ambiante sous agitation douce.
- Déposer environ 100 µL d'anticorps secondaire (dilution 1/1000<sup>e</sup> dans une solution de BSA 10%) si un seul anticorps primaire et si deux, 200 µL, et laisser incuber pendant 1h à l'obscurité dans une chambre humide à température ambiante.
- Après cette étape mettre les lames dans du papier d'aluminium afin de les protéger de la lumière
- Laver les lames dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min sous agitation douce.
- Déposer environ 200 µL de DAPI <sup>(4)</sup> (dilution 1/200<sup>e</sup> dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5 µg/mL) et laisser incuber de 30s à 1 min à température ambiante.
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5 min sous agitation douce.
- Verser sur le milieu de la coupe une goutte du liquide de montage <sup>(5)</sup>, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C.

- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C.

- (1) *PBS 10X* → 12,1g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 7H<sub>2</sub>O, 2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80g de NaCl, 2g de KCl, Qsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100mL de PBS 10X dans 900mL d'eau distillée
- (2) *Triton 0,1%* → Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1mL de Triton dans 1l de PBS 1X
- (3) *BSA 10%* → 10g de BSA dans 100mL de PBS 1X
- (4) DAPI : Calbiochem ; VWR International, S.A.S, Fontenay sous-bois, France
- (5) (Fluoromount, Sigma)

**Tableau 6: Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence.**

Nom	Source	Fournisseur	Dilution
Glucocorticoïde récepteur GR	Rabbit	Santa cruz 1004	1/200
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 $\alpha$ )	goat	Interchim NB100-60955	1/200
Early Growth Response Protein 1 (EGR1)	Rabbit	Cell signaling 4153	1/200

**Tableau 7: Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence**

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

## **Fiche 11**

### **DUOLINK**

#### **Protocole**

- Sortir les lames du congélateur et les laisser décongeler environ 2-3min à température ambiante (ne pas les laisser sécher)
- Entourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Fixer les coupes en ajoutant 200µl de paraformaldéhyde<sup>(1)</sup> à 4% pendant 15min à température ambiante
- Rincer les lames dans un bain de PBS<sup>(2)</sup> 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce (facultatif)
- Incuber les coupes dans un bain de Triton<sup>(3)</sup> à 0,1% afin de perméabiliser les membranes, 2 fois pendant 10min à température ambiante
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce.
- Réentourer les coupes à l'aide d'un stylo hydrophobe DakoPen™
- Déposer 200µl d'une solution de BSA<sup>(4)</sup> à 10% diluée dans du PBS 1X (attention à ce que la coupe soit bien recouverte de la solution) afin de bloquer les sites non spécifiques et laisser incuber entre 1h à température ambiante
- Déposer environ 100µl d'anticorps primaire (diluer l'anticorps dans une solution de PBS 1X-BSA 10%) si il y a deux anticorps sinon 200µl et laisser incuber de 24 à 72h selon anticorps dans une chambre humide à 4°C
- Laver dans un bain de PBS 1X, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de chaque PLA probes<sup>(5)</sup> (diluer les anticorps au 1/5° dans une solution PBS 1X-BSA 10%) NB : les deux PLA probes utilisés doivent avoir une dénomination différente → un « espèce » minus et un « espèce » plus et incuber pendant 1h dans une chambre humide à 37°C
- Laver dans un bain de TBST<sup>(6)</sup>, 2 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock de ligation au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la ligase au 1/40°) et laisser

incuber 30min dans une chambre humide à 37°C

- Laver dans un bain de TBST, 2 fois pendant 2min à température ambiante sous agitation douce

NB : ce réactif est sensible à la lumière donc à partir de cette étape procéder à l'obscurité. Déposer environ 80µl de la solution de ligation (Diluer la solution stock d'amplification au 1/5° dans de l'eau MilliQ puis diluer dans cette solution la polymérase au 1/80°) et laisser incuber 100min dans une chambre humide à 37°C

- Laver dans un bain de tampon de lavage B<sup>(7)</sup>, 2 fois pendant 10min à température ambiante sous agitation douce
- Déposer environ 200µl de DAPI<sup>(8)</sup> (dilution 1/200° dans du PBS 1X soit une concentration finale de 5µg/ml) et laisser incuber de 30s à 1min à température ambiante
- Laver dans un bain d'eau distillé, 3 fois pendant 5min à température ambiante sous agitation douce
- Monter les lames au montage fluo (Fluoromount, Sigma) (verser sur le milieu de la coupe une goutte, poser une lamelle et laisser sécher à 4°C
- Conserver bien les lames à l'obscurité dans du papier aluminium à 4°C
- L'observation se fait au microscope à fluorescence à 555nm
- Pour le comptage, utiliser le logiciel

- 
- (1) Paraformaldéhyde (PAF) à 4% → 20g de paraformaldéhyde dans 450 ml d'eau distillée. Ajouter 50 ml de PBS 10X
  - (2) PBS 10X → 12,1g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80g de NaCl, 2g de KClQsp 1 litre d'eau distillée et ajuster à pH=7,4. Pour du PBS 1X mélanger 100ml de PBS 10X dans 900ml d'eau distillée
  - (3) Triton 0,1% → Ajouter avec un cône coupé à l'extrémité 1ml de Triton dans 1l de PBS 1X
  - (4) BSA 10% → 10g de BSA dans 100ml de PBS 1X
  - (5) PLA probes : Mouse, Rabbit, Goat MINUS ou PLUS, Kit Duolink Detection reagent Orange (Olink Bioscience, Suède)
  - (6) *Solution de TBST* (Tris-Buffered Saline Tween-20) : diluer 100ml de la solution TBS 10X + qsp H<sub>2</sub>O MQ 1 litre + 1ml de Tween 20 à 0, 1%. TBS 10X (pour 1 litre) → Tris 200 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4, qsp H<sub>2</sub>O MQ 1 litre (à ajuster avec HCl ; conserver à 4°C
  - (7) Tampon de lavage B : Dans 500 ml d'eau MilliQ dissoudre 5,84g de NaCl ; 4,24g de Tris base et 26g de Tris HCl. Ajuster le pH à 7,5 par ajout d'HCl et compléter à 1 litre avec De l'eau MilliQ. Filtrer la solution avec un filtre de 0,22µm et stocker à 4°C
  - (8) DAPI → Diamidino-4',6 phénylindol-2 dichlorhydrate

## Fiche 12

### **TEST DU LABYRINTHE AQUATIQUE MULTI-T**

- Remplir le bassin avec de l'eau, et ne mettre que la paroi extérieure (A1, A6, B1, B6). Ajouter une pastille antiseptique. Ajouter 50 mL de lait concentré.

#### **Phase d'habituat**ion (2 jours consécutifs)

Le premier jour

- Allumer l'éclairage. Amener les animaux à la chambre d'essai.
- Déposer la souris dans la case de départ et laisser la souris libre de ses mouvements pendant 2 minutes.
- Si au bout de ce temps, l'animal n'a pas trouvé la voie de sortie, il est guidé manuellement vers la voie de sortie.
- Cette procédure est appliquée en 3 temps, espacés d'au moins trente minutes.
- A la fin de la procédure, toutes les souris retournent dans l'animalerie, et sont hébergées selon la procédure de quarantaine.

#### **Le deuxième jour**

- Ajouter la seconde paroi (A2, A5, B2, B5) afin de créer 1 couloir coté arrivée et un autre côté départ.
- Refaire les mesures qui ont été appliquées dans le premier jour.

#### **Phase d'apprentissage** (5 jours consécutifs)

Le troisième jour (début du test)

- Ajouter la troisième série de paroi (A3, A4, B3, B4) et déterminer le chemin par lequel doit passer l'animal selon le protocole (protocole Learning 1).
- Injecter le cortisol en IP (0,086 mg/kg/jour, dissout dans du DMSO, et dilué à 6 mg/mL dans du PBS 1x) pendant 5 jours consécutifs.
- Lancer le logiciel d'acquisition
- Les paramètres principaux enregistrés sont
  - Le nombre d'erreurs (entrée avec les quatre pattes dans un cul-de-sac ou dans un compartiment du labyrinthe déjà emprunté qualifié de « retour en arrière »)
  - La latence de sortie du labyrinthe (entrée avec les quatre pattes dans la voie de sortie).
  - La distance parcourue.

## **Fiche 13**

### **TEST DE L'OPEN FIELD (CHAMP OUVERT)**

On peut utiliser ce test pour tous les âges à partir du moment où l'activité exploratoire des individus est bien.

- Les animaux testés sont délicatement placés au milieu de l'appareil et l'explorent librement pendant un temps fixé (généralement entre 2 et 10 minutes en fonction de l'âge).
- Le dispositif est nettoyé à l'alcool 50 à 70% entre chaque rat.
- Les paramètres mesurés sont
  - Le nombre d'entrée dans les quartiers périphériques et centraux (quatre pattes dans le quartier).
  - Le nombre de redressement (les deux pattes antérieures décollées du sol et les deux pattes postérieures au sol).

A la fin du test, chaque individu rejoint sa cage d'élevage.

## Résumé

Il est maintenant clairement établi que la vitamine B12 (cobalamine) joue un rôle important dans la formation des globules rouges, et joue un rôle essentiel dans l'efficacité du fonctionnement du système nerveux, comme les fonctions cognitives. La carence en vitamine B12 est répandue dans le monde et provoque une anémie mégalo-blastique et des déficits neurologiques. La carence en vitamine B12 et l'hyperactivité glucocorticoïde (GC) contribuent à la détérioration de la plasticité et des fonctions de l'hippocampe.

Pour comprendre comment la carence en cobalamine dans le système nerveux central génère des déficits neurologiques fonctionnels, nous avons utilisé un modèle de souris génétiquement modifiées, dont le gène codant le récepteur de la transcobalamine (souris *CD320* KO) est invalidé exclusivement dans le cerveau.

Nos analyses comportementales indiquent des déficits dans l'apprentissage visuo-spatial hippocampo-dépendant chez les souris KO. Les résultats ont montré qu'une dose journalière physiologique d'hydrocortisone (8 mg / kg / jour I.P.) a un effet positif dans la restauration dans les performances d'apprentissage, chez les souris KO par rapport aux contrôles.

Conformément aux déficits comportementaux, ce modèle knock-out montre une diminution de l'expression de protéines clés impliquées dans la plasticité cérébrale. Les résultats de western blot des extraits d'hippocampe ont révélé que les souris KO femelles montrent une diminution de l'expression des récepteurs des glucocorticoïdes (GR) et du coactivateur Proliférateur de peroxydase 1 (PGC-1), la protéine de réponse de croissance précoce - 1 (EGR-1), Synapsines (Syn I, II), protéines clés connues pour être impliquées dans l'activité synaptique.

L'étude du modèle *CD320* KO pourrait permettre de mieux comprendre les effets de la carence en vitamine B12 observés chez l'homme, afin d'identifier des réponses potentielles aux différents troubles neurologiques associés ; notamment peut être un traitement palliatif basé sur les corticoïdes.

**Mots clés :** Cobalamine, Souris *CD 320* knockout, Glucocorticoïdes, PGC-1, Synapsine, Plasticité synaptique

---

## Abstract

It is now clearly established that vitamin B12 (or cobalamin), plays an important role in the formation of red blood cells, as well as it has a vital role in the efficient functioning of the nervous system such as cognitive functions. Vitamin B12 deficiency is widespread worldwide and causes megaloblastic anemia and neurological deficits. Vitamin B12 deficiency and the hyperactivity of the glucocorticoid (GC) contribute to the deterioration of hippocampal plasticity and functions.

To understand whether cobalamin deficiency in the central nervous system produced functional neurologic deficits, we used a transcobalamin receptor / *CD320* knockout mouse that lacks the receptor for the cellular uptake of cobalamin in the brain.

Our behavioral analyses indicate deficits in hippocampo-dependant visuo-spatial learning capacities in KO mice. However, a daily physiological dose of hydrocortisone (8 mg/kg/day I.P.) has a positive effect in improving learning performances in KO mice compared to controls.

Consistent with the behavioral deficits, the knockout mouse shows impaired expression of key proteins implicated in synaptic plasticity. The results of western blot analyses of hippocampus extracts revealed that the knockout female mice showed decreased expressions of glucocorticoids receptors (GR), Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 (PGC-1), early growth response protein -1 (EGR-1), Synapsines (Syn I, II), Protein arginine N-methyltransferase -1 (PRMT-1), key proteins known to be implicated in the synaptic activity.

The study of the *CD320* knock out model could help to better understand the effects of vitamin B12 deficiency observed in humans, in order to identify potential responses to various neurological associated disorders; with a putative palliative treatment approach using corticoids.

**Keywords :** Cobalamin, glucocorticoids, *CD320* knockout mouse, PGC-1, Synapsines, Synaptic plasticity