



**HAL**  
open science

# Carence en donneurs de méthyles d'origine paternelle : impact sur le développement cérébral et le transport des folates

Pauline Dimofski

## ► To cite this version:

Pauline Dimofski. Carence en donneurs de méthyles d'origine paternelle : impact sur le développement cérébral et le transport des folates. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0120 . tel-04429786

**HAL Id: tel-04429786**

**<https://theses.hal.science/tel-04429786>**

Submitted on 31 Jan 2024

**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.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## 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 bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## 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>

## **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 **Pauline DIMOFSKI**

**Carence en donneurs de méthyles d'origine paternelle : impact  
sur le développement cérébral et le transport des folates**

**Le 16 mai 2023**

**Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	<b>Mr Vincent BEREZOWSKI</b>	<b>PU, INSERM U1172, Université de Lille - Université d'Artois</b>
	<b>Mme Véronique KEMMEL</b>	<b>MCU-PH, HDR, INSERM U1119, Université de Strasbourg</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Mr Henri SCHROEDER</b>	<b>PU, INSERM U1256, Université de Lorraine</b>
	<b>Mme Brigitte LEININGER-MULLER</b>	<b>PU, INSERM U1256, Université de Lorraine, Directrice de thèse</b>
<b>Membre invité :</b>	<b>Mme Natacha DREUMONT</b>	<b>MCF, HDR, INSERM U1256, Université de Lorraine, Co-directrice de thèse</b>

---

**UMR\_S 1256 INSERM - Nutrition, Génétique et Exposition aux Risques  
Environnementaux (NGERE) - Campus Brabois Santé, Faculté de Médecine - 54500  
Vandœuvre-lès-Nancy**

***« Si tu ne peux pas croire,  
voilà pourquoi tu échoues »***

Maitre Yoda - Star Wars

# Remerciements

*La tradition du laboratoire est de faire un discours de remerciements sans dire « Merci », je vais donc essayer de le faire également à l'écrit.*

Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude au Pr. Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité INSERM 1256, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire durant ces 4 belles dernières années.

J'aimerais adresser mon respect le plus profond aux membres de mon jury, le Dr. Véronique Kemmel, le Pr. Vincent Berezowski et le Pr. Henri Schroeder pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je manifeste toute ma reconnaissance à Véronique, membre de mon comité de suivi, pour m'avoir conseillé depuis le début de ma thèse ; et à Henri, qui m'a formé et qui est présent lors de l'aboutissement de ces années d'études.

Je tiens à faire part de ma plus profonde gratitude à mes directrices de thèse, le Pr. Brigitte Leininger-Muller et le Dr. Natacha Dreumont, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. Votre investissement dans ce projet a été sans faille durant ces 4 années ! J'ai énormément apprécié travailler à vos côtés.

Je suis reconnaissante envers les autres membres de mon comité de suivi, les Dr. Cédric Boura et Stéphane Labialle, mais également envers les Pr. Hervé Schohn et David Meyre. Chacun à votre manière vous avez réussi à me conseiller et m'aiguiller avant, pendant et « après » la thèse.

Petite pensée également pour l'ensemble des membres du Conseil Scientifique de l'Université de Lorraine avec qui j'ai pu partager mon expérience du doctorat, et à mes colistiers, devenus des amis. Ce fut un réel enrichissement de mes connaissances sur les rouages politiques du doctorat.

J'exprime toute ma reconnaissance à la plateforme *GenomEast* de l'IGBMC de Strasbourg, et plus particulièrement au Dr. Bernard Jost et Tao Ye, pour leur aide dans la compréhension technique et bio-informatique de l'analyse *Small RNA-seq*.

Je continuerai en disant que je ne serai peut-être pas arrivée à ce stade sans le soutien de l'ensemble de l'équipe technique du laboratoire, des doctorants et stagiaires qui ont croisés mon chemin durant ces 4 années, avec un clin d'œil à Jean-Marc, Aurélie et Pauline, ainsi qu'aux médecins, les Dr.

Nicolas Scheyer, Dr. Paul Toussaint et Dr. Elsa Aboud, qui ont su m'aider, chacun dans leur domaine, à un moment donné. Vous avez toute ma reconnaissance !

En tant qu'ancienne trésorière de l'association doctorante AD'UL Team, je tiens à vous faire part, chers membres du bureau, de mes derniers jours en tant que doctorante. C'est la fin de thèse pour moi, enfin ! Comme vous le savez certainement, d'autres y sont arrivés avant nous, j'y arrive, donc vous y arriverez également !

Mention particulière à mes acolytes, les fraîchement diplômés Dr. Karim Matmat et Dr. Youssef Sibli, sans oublier ma très chère Dr. Célia Schellenberg. On dit très souvent que la thèse est compliquée et semée d'embûches mais votre soutien, votre bonne humeur et les (très) longues conversations m'ont vraiment apportées du réconfort dans les périodes difficiles. Je tiens à vous exprimer mon respect et vous souhaite tout le meilleur pour la suite ! J'espère qu'un jour on se retrouvera tous à Strasbourg.

Je tiens aussi à manifester ma gratitude envers mes amies, Laura, Coraline, Anaïs et la bande des Paupau, qui ont su comprendre les enjeux de ces 4 années. J'espère que vous ne m'en voulez pas trop pour avoir été absente parfois. A ces moments déconnectés partagés avec vous !

Enfin, je souhaiterais dédier cette thèse à ma famille qui a été un soutien sans faille depuis le début et qui m'a écouté parler pendant mes longs, très longs monologues (scientifiques parfois) même si vous n'arriviez pas à tout comprendre. Sans vous, je ne me serais pas lancée dans une telle aventure !

A toi, sans qui je ne serais jamais arrivé au bout. Tu m'as épaulé et réconforté dans les moments les plus compliqués et surtout tu as su trouver les mots justes pour me pousser encore plus loin.

Je t'aime.

*A mes anges gardiens*

# Table des matières

---

Table des matières .....	- 1 -
Liste des figures .....	- 5 -
Liste des tableaux.....	- 7 -
Liste des abréviations.....	- 8 -
Prologue .....	- 12 -
<b>INTRODUCTION</b> .....	- 13 -
1. LES DONNEURS DE GROUPEMENTS METHYLE .....	- 14 -
1.1. Présentation générale.....	- 14 -
1.2. Folates : origine et métabolisme.....	- 15 -
1.2.1. Structure et apport en vitamine B9 .....	- 15 -
1.2.2. Métabolisme des folates .....	- 17 -
1.3. Cobalamine : origine et métabolisme .....	- 19 -
1.3.1. Structure et apport en vitamine B12 .....	- 19 -
1.3.2. Métabolisme de la vitamine B12.....	- 21 -
1.3.3. Cycle de la méthionine .....	- 21 -
1.4. L'homocystéine : molécule charnière du métabolisme des monocarbones.....	- 22 -
1.4.1. Structure et apport en homocystéine .....	- 22 -
1.4.2. Voie de la transulfuration.....	- 23 -
1.5. Conséquences des carences gestationnelles en donneurs de méthyle .....	- 24 -
2. HOMÉOSTASIE CÉRÉBRALE EN FOLATES ET INTERFACES SANG-CERVEAU ..	- 25 -
2.1. Structure des interfaces sang-cerveau.....	- 25 -
2.1.1. Structure de la BHE .....	- 25 -
2.1.2. Structure de la barrière sang-LCR.....	- 27 -
2.2. Les mécanismes de transport .....	- 28 -
2.2.1. Rôle des enzymes .....	- 28 -
2.2.2. Rôle des récepteurs et transporteurs .....	- 29 -
2.2.2.1. Les transporteurs SLC.....	- 30 -
2.2.2.2. Les transporteurs FRs .....	- 32 -
2.2.2.3. Les transporteurs ABC .....	- 33 -
2.3. Conséquence d'une altération de l'homéostasie intracérébrale en folate.....	- 35 -
3. CONSÉQUENCES DES CARENCES EN FOLATES D'ORIGINE PATERNELLE .....	- 36 -
3.1. Influence du régime riche en lipides sur la descendance.....	- 37 -
3.2. Impacts d'une alimentation paternelle riche en sucres .....	- 38 -
3.3. Impact du régime pauvre en protéines du père sur la descendance .....	- 39 -
3.4. Régime restrictif chez le père : que savons-nous ? .....	- 40 -
3.5. Apports en folates chez les pères et effets sur la progéniture .....	- 41 -

4. FORMATION DES SPERMATOZOÏDES ET MECANISMES DE TRANSMISSION VIA LE SPERME.....	- 42 -
4.1. Description des organes et cellules nécessaires à la production des spermatozoïdes.....	- 42 -
4.1.1. Constitution de l'appareil génital mâle.....	- 42 -
4.1.2. Formation et maturation des spermatozoïdes.....	- 44 -
4.1.3. La barrière hémato-testiculaire.....	- 45 -
4.2. Synthèse des hormones stéroïdes (ou stéroïdogénèse).....	- 46 -
4.2.1. Rôles des hormones dans les gonades mâles.....	- 48 -
4.2.2. Rôle des donneurs de méthyle dans la stéroïdogénèse et la fertilité.....	- 49 -
4.2.3. Rôles des hormones stéroïdes au niveau du SNC.....	- 51 -
4.3. Mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la transmission paternelle.....	- 52 -
4.3.1. Hypothèse de transmission n°1 : la méthylation de l'ADN.....	- 53 -
4.3.2. Hypothèse de transmission n°2 : la modification des histones.....	- 54 -
4.3.3. Hypothèse de transmission n°3 : les petits ARNs non codants.....	- 55 -
4.3.3.1. Biogénèse des miARNs.....	- 55 -
4.3.3.2. Biogénèse des piARNs.....	- 56 -
4.3.3.3. Biogénèse des tRFs.....	- 57 -
4.3.3.4. Origine des endo-siRNA.....	- 59 -
4.3.3.5. Impact du régime alimentaire sur les sncRNA.....	- 60 -
Objectifs et hypothèses de travail.....	- 62 -
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	- 64 -
1. MODÈLE ANIMAL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	- 65 -
1.1. Espèce utilisée.....	- 65 -
1.2. Protocole animal.....	- 65 -
1.3. Prélèvements sanguins.....	- 66 -
1.4. Isolement des spermatozoïdes.....	- 67 -
1.5. Traitement des tissus.....	- 67 -
1.5.1. Prélèvement et fixation des organes.....	- 67 -
1.5.2. Inclusion en paraffine et coupe des organes.....	- 68 -
2. DOSAGES PLASMATIQUES.....	- 68 -
2.1. Dosage des métabolites du métabolisme des monocarbones par LCMS/MS.....	- 68 -
2.1.1. Conditions pré-analytiques.....	- 68 -
2.1.1.1. Préparation des échantillons et de la gamme standard.....	- 69 -
2.1.1.2. Préparation des standards internes (ISTD).....	- 69 -
2.1.2. Mesure sur le spectromètre de masse.....	- 70 -
2.1.3. Analyse des résultats.....	- 71 -
2.2. Dosage des hormones par méthode ELISA.....	- 71 -
2.2.1. Dosage des hormones gonado-stimulantes.....	- 71 -
2.2.2. Dosage de la testostérone.....	- 72 -

2.2.3. Analyse des résultats .....	- 72 -
3. ÉTUDES COMPORTEMENTALES .....	- 73 -
3.1. Tests comportementaux précoces .....	- 73 -
3.1.1. Le réflexe de retournement .....	- 73 -
3.1.2. Test de géotaxie négative .....	- 73 -
3.1.3. Test du « Homing » .....	- 74 -
3.1.4. Le test de discrimination olfactive.....	- 75 -
3.2. Tests comportementaux tardifs .....	- 75 -
3.2.1. Test de <i>l'openfield</i> .....	- 75 -
3.2.2. Le labyrinthe en croix surélevée.....	- 76 -
3.2.3. Test de marche linéaire sur échelle .....	- 77 -
3.2.4. Labyrinthe aquatique .....	- 78 -
4. ANALYSES D'IMMUNOHISTOCHIMIE.....	- 79 -
4.1. Étude histologique des testicules .....	- 79 -
4.1.1. Le frottis spermatique .....	- 79 -
4.1.2. Étude morphologique des testicules .....	- 80 -
4.2. Analyses de la mobilité des spermatozoïdes .....	- 80 -
5. ANALYSES BIOCHIMIQUES .....	- 80 -
5.1. Electrophorèse et <i>Western Blot</i> .....	- 80 -
5.1.1. Préparation des échantillons .....	- 80 -
5.1.1.1. Extraction des protéines .....	- 80 -
5.1.1.2. Mesure de la concentration en protéines .....	- 81 -
5.1.2. Analyse des protéines par Western Blot .....	- 81 -
5.1.3. L'immunodétection .....	- 82 -
5.1.3.1. Anticorps primaire et protéine de référence .....	- 82 -
5.1.3.2. Anticorps secondaire .....	- 82 -
5.1.4. Stripping des membranes.....	- 83 -
5.1.5. Analyses des résultats.....	- 83 -
5.2. Analyses de biologie moléculaire .....	- 83 -
5.2.1. Étude de l'expression génique par RT-qPCR .....	- 83 -
5.2.1.1. Extraction des ARNs .....	- 83 -
5.2.1.2. Rétrotranscription classique en ADNc.....	- 84 -
5.2.1.3. Rétrotranscription spécifique des micro-ARN .....	- 84 -
5.2.1.4. PCR quantitative.....	- 85 -
5.2.1.5. Analyse des résultats .....	- 86 -
5.2.2. Small RNA seq : analyses des données .....	- 87 -
6. TESTS STATISTIQUES .....	- 87 -
<b>RÉSULTATS</b> .....	- 88 -
Partie 1 : Mise en place du modèle de carence paternelle .....	- 89 -
1. MESURE DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES DES ANIMAUX .....	- 90 -

2. MESURE DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES DANS LE PLASMA ET LE FOIE.....	- 92 -
2.1. Dosages plasmatiques .....	- 92 -
2.2. Dosages dans le tissu hépatique.....	- 94 -
3. CONCLUSION.....	- 97 -
Partie 2 : Conséquences de la carence paternelle en donneurs de méthyle sur les testicules et la fertilité de la descendance.....	- 98 -
1. MESURE DES PARAMETRES DE FERTILITE CHEZ LES PERES ET LA DESCENDANCE .....	- 99 -
2. MESURE DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES DANS LES TESTICULES .....	- 105 -
3. NIVEAU D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DES FOLATES DANS LES TESTICULES.....	- 106 -
4. MESURE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN LH, FSH ET TESTOSTERONE .....	- 107 -
5. MESURE DE L'EXPRESSION DE STAR ET DES ENZYMES CLES DE LA STEROÏDOGENESE.....	- 108 -
6. ANALYSE DU CONTENU EN PETITS ARNS DU SPERME DES PERES ET DE LA DESCENDANCE A J65.....	- 109 -
7. CONCLUSION.....	- 111 -
Partie 3 : Conséquences de la carence paternelle sur le métabolisme cérébral des folates et le comportement des ratons.....	- 113 -
1. QUANTIFICATION DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES 1C DANS LE TISSU CEREBRAL DES RATONS.....	- 114 -
2. ÉTUDE DU TRANSPORT DES FOLATES DANS LE CERVEAU DES RATONS.....	- 116 -
3. ANALYSE DU COMPORTEMENT DES RATONS DE LA NAISSANCE A L'AGE ADULTE.....	- 118 -
3.1. Étude des capacités motrices des ratons.....	- 119 -
3.2. Analyse d'autres paramètres comportementaux : l'olfaction, l'anxiété, la mémoire spatiale .....	- 120 -
4. CONCLUSION.....	- 122 -
<b>DISCUSSION</b> .....	- 123 -
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	- 131 -
Références bibliographiques :.....	- 135 -
Annexes :.....	- 161 -

# Liste des figures

---

FIGURE 1 : VUE GLOBALE DU METABOLISME DES MONOCARBONES.....	- 15 -
FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA VITAMINE B9 ET DE SES FORMES REDUITES.....	- 16 -
FIGURE 3 : MECANISMES D'ABSORPTION DES FOLATES DEPUIS LA LUMIERE INTESTINALE JUSQU'AUX TISSUS CIBLES.....	- 18 -
FIGURE 4 : CYCLE DES FOLATES.....	- 19 -
FIGURE 5 : STRUCTURE DE LA VITAMINE B12.....	- 20 -
FIGURE 6 : CYCLE DE LA METHIONINE.....	- 22 -
FIGURE 7 : VOIE DE LA TRANSSULFURATION.....	- 23 -
FIGURE 8 : STRUCTURE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.....	- 26 -
FIGURE 9 : LOCALISATION DES ORGANES CIRCUMVENTRICULAIRES.....	- 27 -
FIGURE 10 : SYSTEMES DE TRANSPORTS AU NIVEAU DES INTERFACES SANG-CERVEAU.....	- 30 -
FIGURE 11 : INFLUX DES FOLATES DANS LES CELLULES MEDIE PAR LES TRANSPORTEURS DES FOLATES.....	- 32 -
FIGURE 12 : EFFLUX CELLULAIRE DES FOLATES PAR LES TRANSPORTEURS ABC.....	- 34 -
FIGURE 13 : CONSEQUENCES DES ALTERATIONS DE L'ALIMENTATION DES PERES SUR LEUR PROGENITURE.....	- 37 -
FIGURE 14 : VUE ANTERIEURE DE L'APPAREIL GENITAL MASCULIN CHEZ LES RONGEURS.....	- 43 -
FIGURE 15 : DEROULE DE LA SPERMATOGENESE.....	- 45 -
FIGURE 16 : VOIES METABOLIQUES DE LA STEROÏDOGENESE.....	- 47 -
FIGURE 17 : FACTEURS INFLUENÇANT LA STEROÏDOGENESE DANS LES TESTICULES.....	- 49 -
FIGURE 18 : MODELES DE TRANSMISSION D'INFORMATIONS EPIGENETIQUES.....	- 53 -
FIGURE 19 : BIOGENESE DES MIARNs CHEZ LES MAMMIFERES.....	- 56 -
FIGURE 20 : BIOGENESE DES PIRNA DANS LES CELLULES DE SOURIS.....	- 57 -
FIGURE 21 : CLASSIFICATION DES TRFs.....	- 58 -
FIGURE 22 : BIOGENESE DES ENDO-SIARNs.....	- 60 -
FIGURE 23 : CROISEMENTS REALISES DANS LE PROTOCOLE ANIMAL.....	- 66 -
FIGURE 24 : GRADIENT DE LA PHASE MOBILE ET TEMPS DE RETENTION DES COMPOSES ANALYSES.....	- 71 -
FIGURE 25 : TEST DU REFLEXE DE RETOURNEMENT.....	- 73 -
FIGURE 26 : TEST DE GEOTAXIE NEGATIVE REALISE DES RATONS.....	- 74 -
FIGURE 27 : DISPOSITIF UTILISE POUR LE TEST DU <i>HOMING</i> .....	- 74 -
FIGURE 28 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LA MESURE DE LA DISCRIMINATION OLFACTIVE.....	- 75 -
FIGURE 29 : DISPOSITIF DE L' <i>OPENFIELD</i> .....	- 76 -
FIGURE 30 : DISPOSITIF DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVEE.....	- 77 -
FIGURE 31 : TEST DE MARCHE LINEAIRE SUR ECHELLE.....	- 78 -
FIGURE 32 : PARCOURS DU LABYRINTHE AQUATIQUE.....	- 79 -
FIGURE 33 : NOMBRE MOYEN DE RATONS ET PROPORTIONS MALE/FEMELLE DANS LA DESCENDANCE.....	- 90 -
FIGURE 34 : ÉVOLUTION DU POIDS CORPOREL DES ANIMAUX.....	- 91 -
FIGURE 35 : DOSAGES PLASMATIQUES DES METABOLITES 1C CHEZ LES PERES.....	- 93 -

<b>FIGURE 36 : MESURE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES CHEZ LA DESCENDANCE. ....</b>	<b>- 94 -</b>
<b>FIGURE 37 : CONCENTRATIONS EN METABOLITES DE LA VOIE DES MONOCARBONES DANS LES ECHANTILLONS HEPATIQUES DES PERES.....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>FIGURE 38 : MESURE DES CONCENTRATIONS HEPATIQUES DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES CHEZ LA DESCENDANCE. ....</b>	<b>- 96 -</b>
<b>FIGURE 39 : IMPACT DE LA CARENCE EN DONNEURS DE METHYLE SUR LA MOBILITE DES SPERMATOZOÏDES. ....</b>	<b>- 101 -</b>
<b>FIGURE 40 : EXEMPLE DE MORPHOLOGIES SPERMATIQUES OBSERVEES DANS LE CAS D'UNE CARENCE PATERNELLE EN DONNEURS DE METHYLE.....</b>	<b>- 102 -</b>
<b>FIGURE 41 : MORPHOLOGIE SPERMATIQUE DES PERES ET DE LA DESCENDANCE A DIFFERENTS AGES... -</b>	<b>103 -</b>
<b>FIGURE 42 : MORPHOLOGIE DES TUBULES SEMINIFERES APRES COLORATION HISTOLOGIQUE HES..... -</b>	<b>104 -</b>
<b>FIGURE 43 : MESURE DES CONCENTRATIONS DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES DANS LES TESTICULES DES RATONS A J65 ET J180. ....</b>	<b>- 106 -</b>
<b>FIGURE 44 : MESURE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES RECEPTEURS AU FOLATE DANS LES TESTICULES DES PERES ET DE LA DESCENDANCE. ....</b>	<b>- 107 -</b>
<b>FIGURE 45 : MESURE DU NIVEAU D'EXPRESSION DE STAR ET DES ENZYMES CLES IMPLIQUEES DANS LA STEROÏDOGENESE DANS LES TESTICULES DES PERES ET DE LA DESCENDANCE.....</b>	<b>- 108 -</b>
<b>FIGURE 46 : VOLCANO PLOT DES FRAGMENTS D'ARNt DEREGULES DANS LE SPERME. ....</b>	<b>- 110 -</b>
<b>FIGURE 47 : QUANTIFICATION DES INTERMEDIAIRES 1C DANS LE CORTEX CEREBRAL DES RATONS A DIFFERENTS AGES.....</b>	<b>- 115 -</b>
<b>FIGURE 48 : DETERMINATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DANS LE CORTEX DES RATONS A J65.....</b>	<b>- 116 -</b>
<b>FIGURE 49 : MESURE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT POUR DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA PERMEABILITE DE LA BHE. ....</b>	<b>- 117 -</b>
<b>FIGURE 50 : MESURE DE L'EXPRESSION DE S100B DANS LE CORTEX DE LA DESCENDANCE A J65. ....</b>	<b>- 118 -</b>
<b>FIGURE 51 : MESURE DU NIVEAU D'EXPRESSION DU MiR-126A-5P DANS LE CORTEX DES RATONS A J65. -</b>	<b>118</b>
<b>FIGURE 52 : ÉVALUATION DES CAPACITES MOTRICES DES RATONS ENTRE J5 ET J60. ....</b>	<b>- 120 -</b>
<b>FIGURE 53 : DISTRIBUTION DU TEMPS PASSER DANS LES DIFFERENTES ZONES LORS DES TESTS LIES A L'OLFACTION CHEZ LA DESCENDANCE A J11 ET J21.....</b>	<b>- 121 -</b>
<b>FIGURE 54 : TEMPS NECESSAIRE AUX RATONS POUR TROUVER LA SORTIE DU LABYRINTHE AQUATIQUE. -</b>	<b>122 -</b>
<b>FIGURE 55 : MESURE DES INTERMEDIAIRES DU METABOLISME DES MONOCARBONES CHEZ LA DESCENDANCE..</b>	<b>- 196 -</b>

## Liste des tableaux

---

<b>TABLEAU I : CONCENTRATION EN VITAMINES B9, B12 ET EN CHOLINE DANS L'ALIMENTATION DES ANIMAUX DE NOTRE ÉTUDE.....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>TABLEAU II : TUBES DE PRELEVEMENTS SANGUINS .....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>TABLEAU III : STANDARDS DES METABOLITES DU METABOLISME DES MONOCARBONES .....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>TABLEAU IV : STANDARDS INTERNES UTILISES POUR L'ANALYSE DES METABOLITES DU METABOLISME DES MONOCARBONES .....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>TABLEAU V : CONDITIONS DE WESTERN BLOT.....</b>	<b>- 82 -</b>
<b>TABLEAU VI : ANTICORPS PRIMAIRES EN WESTERN BLOT .....</b>	<b>- 82 -</b>
<b>TABLEAU VII : ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT .....</b>	<b>- 82 -</b>
<b>TABLEAU VIII : AMORCES DE RT-qPCR .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>TABLEAU IX : POIDS DES ORGANES AUX DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT DES RATONS.....</b>	<b>- 92 -</b>
<b>TABLEAU X : MESURES PLASMATIQUES DES CONCENTRATIONS DE LH, FSH ET TESTOSTERONE.....</b>	<b>- 108 -</b>
<b>TABLEAU XI : LISTE DES MIARNs DEREGLUES DANS LE SPERME.....</b>	<b>- 111 -</b>

# Liste des abréviations

---

## A

ABC :	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ABP :	<i>Androgen Binding Protein</i>
AMH :	<i>Anti Müllerian Hormone</i>
AP :	<i>Area Postrema</i>
AR :	<i>Androgen Receptor</i>

## B

BCRP :	<i>Breast Cancer Resitance Protein</i>
BDNF :	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE :	Barrière Hémato-Encéphalique
BHMT :	Bétaïne Homocystéine Méthyltransférase
BHT :	Barrière Hémato-Testiculaire
BSA :	<i>Bovine Serum Albumin</i>

## C

CBS :	Cystathionine $\beta$ -synthase
CDO :	Cystéine Dioxygénase
Cldn :	Claudine
CSAD :	<i>Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase</i>
CSE :	Cystathionine $\gamma$ -lyase
CYP :	Cytochrome P450

## D

DFTN :	Défaut de Fermeture du Tube Neural
DHEA (S) :	Déhydroépiandrostérone (Sulfate)
DHF (R) :	Dihydrofolate (réductase)
DHH :	<i>Desert Hedgehog</i>
DHT :	Dihydrotestostérone
DNMTs :	<i>DNA methyltransferases</i>
DOHaD :	<i>Developmental Origin of Health and Disease</i>
dTMP :	désoxythymidine Monophosphate
dUMP :	désoxyuridine Monophosphate

## E

endo-siARNs :	Petits ARNs interférents endogènes
ER :	<i>Estrogen Receptor</i>

## F

FCCP :	<i>Carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>
FGF :	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIV :	Fécondation <i>in-vitro</i>
FR :	<i>Folate Receptor</i>
FSH :	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>

## G

GABA :	$\gamma$ -Aminobutyric Acid
$\gamma$ -GCS :	$\gamma$ -Glutamyl Cystéine Synthétase
GCPII :	Glutamate carboxypeptidase II
GOT :	<i>Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GS :	Glutathion Synthétase
GSH :	Glutathion réduit
GST :	Glutathion S-transférase

## H

HAT :	Histone acétyltransférase
Hcy :	Homocystéine
HDAC :	Histone désacétylase
HDL :	<i>High Density Lipoprotein</i>
HDM :	Histone déméthylase
HFD :	<i>High Fat Diet</i>
HMT :	Histone méthyltransférase
HSD :	Hydroxystéroïde Déshydrogénase
HTAU-DH :	Hypotaurine Déshydrogénase

## I

IGF :	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
-------	-----------------------------------

## J

## K

## L

LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
LDL :	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LH (R) :	<i>Luteinizing Hormone (Receptor)</i>
LPD :	<i>Low Protein Diet</i>

## M

MAO :	Monoamine Oxydase
MAT :	Méthionine Adénosyl Transférase
MDD :	<i>Methyl Donor Deficiency (or Deficient)</i>
MDR :	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
ME :	<i>Median Eminence</i>
Met :	Méthionine
MeTHF :	Méthyltétrahydrofolate
miARNs :	Micro-ARNs
MMACHC :	<i>Methylmalonic Aciduria cb1C type with homocystinuria</i>
MMADHC :	<i>Methylmalonic Aciduria cb1D type with homocystinuria</i>

MRP : *Multidrug Resistance-associated Protein*  
MS : *Methionine Synthase*  
MTHFR : *Méthylène Tétrahydrofolate Réductase*  
MTs : *Méthyltransférases SAM-dépendantes*

## N

NAD (+/H) : *Nicotinamide Adénine Dinucléotide (oxydé/réduit)*  
NADP (+/H) : *Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (oxydé/réduit)*  
NH : *Neurohypophyse*  
NRF-1 : *Nuclear Respiratory Factor 1*  
NSG : *Neurostéroïdogénèse*

## O

OCV : *Organes Circumventriculaires*  
OVLT : *Organe Vasculaire de la Lamme Terminale*

## P

PBS : *Phosphate-Buffered Saline*  
PCFT : *Proton-Coupled Folate Transporter*  
PDGF (R) : *Platelet-Derived Growth Factor (Receptor)*  
PFA : *Paraformaldéhyde*  
PG : *Pineal Gland*  
P-GP : *P-Glycoprotéine*  
PMA : *Procréation Médicalement Assistée*  
POHaD : *Paternal Origin of Health and Development*  
PTC1 : *Persistent Tapetal Cell 1*

## Q

## R

RFC : *Reduced Folate Carrier*  
RISC : *RNA Induced Silencing Complex*

## S

SAH : *S-Adénosylhomocystéine*  
SAHH : *S-Adénosylhomocystéine Hydrolase*  
SAM : *S-Adénosylméthionine*  
scc : *Side Chain Cleavage*  
SCO : *Subcommissural Organ*  
SF-1 : *Steroidogenic Factor-1*  
SFO : *Subfornical Organ*  
SHMT : *Sérine Hydroxy-Méthyltransférase*  
SLC : *Solute Carrier Transporter*  
SNC : *Système Nerveux Central*  
sncRNAs : *Small non-coding RNA*  
SNP : *Single Nucleotide Polymorphisms*

SRB1 : *Scavenger Receptor B1*  
SREBP : *Sterol Response Element Binding Protein*  
StAR : *Steroidogenic Acute Receptor*  
SULT : Sulfotransférases

## T

TGF : *Transforming Growth Factor*  
THF : *Tétrahydrofolate*  
THP : *Tétrahydroprogestérone*  
TNF : *Tumor Necrosis Factor*  
tRFs : *Fragments d'ARNt*  
TS : *Thymidylate Synthase*  
TSPO : *Translocator Protein*

## U

UGT : *UDP-glucuronosyltransférases*

## V

VDR : *Récepteur à la vitamine D*  
VIH : *Virus de l'Immunodéficience Humaine*

## W

## X

## Y

## Z

ZO : *Zonula Occludens*

# Prologue

---

Le lien entre l'alimentation et la santé est établi depuis l'Antiquité, mais ce n'est qu'au XIX<sup>ème</sup> siècle que l'importance des vitamines et des minéraux a été découverte. L'une des origines d'une carence en micronutriments peut être la sous-consommation de certains aliments ou bien des mutations génétiques touchant des acteurs essentiels à l'assimilation de ces aliments. Ces carences peuvent perturber les mécanismes de régulation métabolique, entraîner des anomalies du développement et/ou une croissance altérée. Le scorbut qui sévissait du XVI<sup>ème</sup> au XVII<sup>ème</sup> siècle a d'ailleurs pu être soigné grâce aux agrumes qui contenaient de la vitamine C (Carpenter, 2012). La vitamine B9, ou folates, et la vitamine B12, ou cobalamine, sont des micronutriments essentiels. Ces 2 vitamines, non synthétisées par l'Homme, sont impliquées dans le métabolisme des monocarbones. Une carence précoce en vitamines B9 et B12 affecte le développement ainsi que la maturation du cerveau, tout comme son vieillissement. Il a été démontré qu'il existe une association entre des troubles du métabolisme des monocarbones et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la maladie de Huntington (Brune *et al.*, 2004; McCaddon, 2013). Précurseurs des bases puriques et pyrimidiques, les folates sont nécessaires à la division et au maintien cellulaire. De plus, leur présence est cruciale durant la grossesse et l'enfance, c'est pourquoi les femmes sont supplémentées en acide folique en phase périconceptionnelle (Smithells *et al.*, 1976; Wilson *et al.*, 2015; Ebara, 2017; Liu *et al.*, 2020).

De récentes études concernant les carences gestationnelles en donneurs de méthyle ont pu mettre en évidence des retards de croissance *in utero* ainsi que des défauts de fermeture du tube neural (DFTN). Par ailleurs, une carence en folates peut impacter le développement cérébral postnatal en affectant notamment la neurogenèse (Kruman *et al.*, 2005; Craciunescu *et al.*, 2010; Araki *et al.*, 2021) et la composition lipidique de la myéline (Chida *et al.*, 1972; Hirono et Wada, 1978). Des études antérieures menées au sein du laboratoire ont pu mettre en évidence des altérations de la neurostéroïdogenèse (NSG) et des perturbations épigénétiques liées au développement cérébral postnatal des rats, associées à des troubles cognitifs et moteurs (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014a, b; Willekens *et al.*, 2019). Ces effets plus largement observés dans le cervelet démontrent qu'en plus de son rôle dans la régulation de la coordination des mouvements, il possède également un rôle dans les processus cognitifs et dans des troubles psychiatriques comme l'autisme et la schizophrénie (Phillips *et al.*, 2015). Des analyses transcriptomiques sur cette structure cérébrale chez des rats issus de mères carencées ont permis d'identifier des dérégulations de gènes impliqués dans le développement cérébelleux et la plasticité synaptique, le tout associé à une diminution du nombre de cellules de *Purkinje* (Willekens *et al.*, 2019).

Depuis quelques années, il est devenu de plus en plus évident que les pères peuvent également affecter le développement et la santé de leur progéniture, notamment par leurs habitudes de vie et l'exposition à différents facteurs environnementaux (Kvaavik *et al.*, 2010). Dans ce contexte, l'objectif de la thèse est d'étudier les effets de la carence en donneurs de méthyle d'origine paternelle sur le développement cérébral des rats, et comment elle affecte le transport des folates et leur homéostasie dans le cerveau.

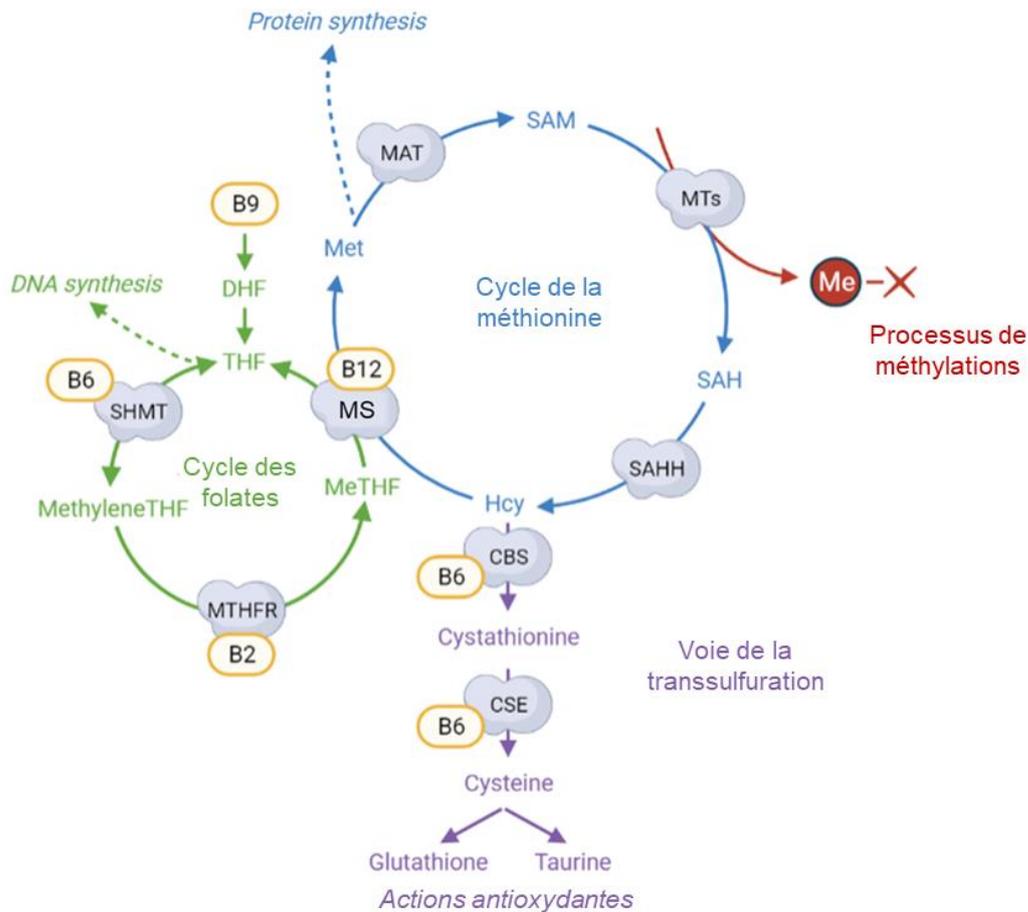
# INTRODUCTION

## 1. LES DONNEURS DE GROUPEMENTS METHYLE

### 1.1. Présentation générale

Le métabolisme des monocarbone est composé de 3 parties : le cycle des folates, le cycle de la méthionine et la voie de la transulfuration. Le bon déroulement de ces cycles repose sur les folates (vitamine B9) et la vitamine B12 (ou cobalamine). Ces 2 vitamines sont des cofacteurs essentiels provenant respectivement de l'alimentation végétale et animale. Ce métabolisme est important pour tous les processus de méthylation, ainsi que pour la synthèse des acides nucléiques. La méthylation des régions promotrices de gènes et/ou des histones peut influencer la régulation transcriptionnelle et donc rendre ces régions accessibles, ou non, aux facteurs de transcription (Sibrian-Vazquez *et al.*, 2010; Guéant *et al.*, 2013).

Brièvement, les folates sont les précurseurs pour le cycle des folates, qui permet la conversion du tétrahydrofolate (THF) en méthylène-THF, puis en méthylTHF (MeTHF). La première réaction est possible grâce à la sérine hydroxy-méthyltransférase (SHMT) et la seconde par l'enzyme méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR). La SHMT et la MTHFR utilisent la vitamine B6 et la vitamine B2 comme cofacteur, respectivement. Le MeTHF est l'une des molécules charnières de ce métabolisme car, sous l'action de la méthionine synthase (MS) et de son cofacteur, la vitamine B12, il donne son groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) pour la synthèse de méthionine (Met). À la suite de cette étape de clivage, le THF retourne dans le cycle des folates et la Met est transformée en S-adenosyl méthionine (SAM) par l'action des méthionine adénosyl transférases (MAT). La poursuite du cycle de la méthionine permet le transfert du groupement -CH<sub>3</sub> de la SAM vers les acides nucléiques ou les protéines. Cette perte du groupement méthyle permet d'obtenir la S-adenosyl homocystéine (SAH) qui, grâce à la SAH hydrolase (SAHH), sera elle-même hydrolysée en homocystéine (Hcy). L'Hcy peut alors soit être reméthylée en Met, soit entrer dans la voie de la transulfuration afin de générer des composés antioxydants tels que le glutathion ou encore la taurine (**Figure 1** ; Guéant *et al.*, 2013).



**Figure 1 : Vue globale du métabolisme des monocarbone.**

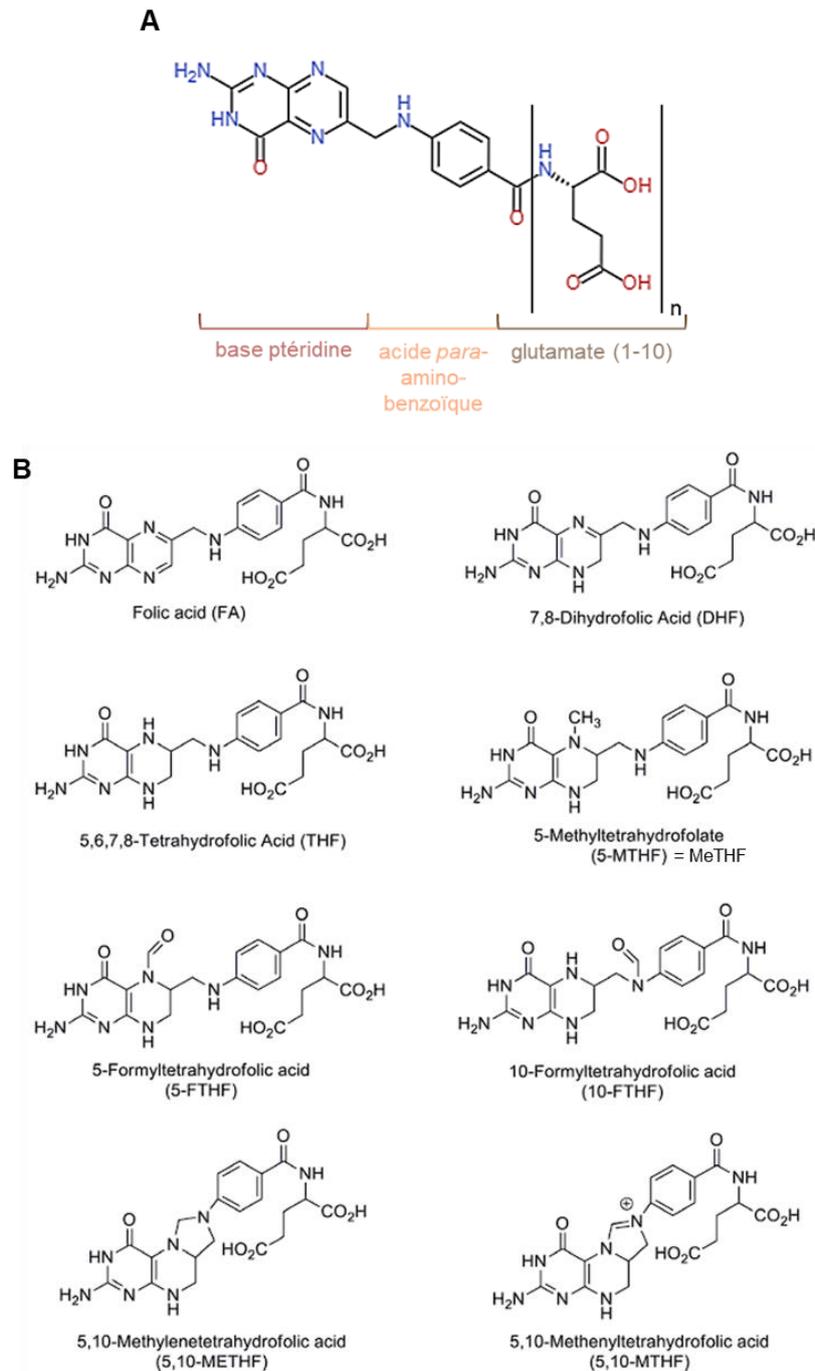
Le métabolisme des monocarbone est constitué de 3 parties : le cycle des folates, le cycle de la méthionine et la voie de la transsulfuration. La vitamine B9 (ou folates) est le précurseur du dihydrofolate (DHF), lui-même étant le précurseur du tétrahydrofolate (THF) qui entre dans le cycle des folates. Par l'action de différentes enzymes, ce dernier est transformé en méthyl tétrahydrofolate (MeTHF). Le MeTHF transfère son groupement méthyle (Me) à l'homocystéine (Hcy) pour former la méthionine (Met) par l'action de la méthionine synthase (MS) dont la vitamine B12 est le cofacteur. La Met est ensuite transformée en S-adenosylméthionine (SAM), le donneur universel de groupement méthyle. La SAM est ensuite convertie en S-adenosylhomocystéine (SAH), elle-même hydrolysée en Hcy. L'Hcy peut ensuite soit être reméthylée en Met par l'action de la MS, soit entrer dans la voie de la transsulfuration afin de produire des antioxydants tels que le glutathione ou la taurine (Guéant *et al.*, 2013). Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

*Abréviations additionnelles :* CBS : cystathionine β-synthase ; CSE : cystathionine γ-lyase ; MAT : méthionine adénosyl transférase ; MTHFR : méthylène-tétrahydrofolate réductase ; MTs : méthyltransférases SAM-dépendantes ; SAHH : S-adenosylhomocystéine hydrolase ; SHMT : sérine hydroxy-méthyltransférase.

## 1.2. Folates : origine et métabolisme

### 1.2.1. Structure et apport en vitamine B9

Les folates sont des vitamines hydrosolubles apportées par l'alimentation et principalement retrouvées dans les légumes, les légumineuses, le foie de volaille et la levure boulangère. Le terme « folate » est un terme générique désignant la forme soluble de la vitamine B9. Il s'agit d'une molécule conjuguée comportant un acide ptéroïque au centre (ou acide *para*-amino-benzoïque) qui est lié d'une part à un (ou des) résidu(s) de glutamate, et d'une autre part à une base ptéridine (**Figure 2A**) (Fowler, 2001; Ebara, 2017). Le dihydrofolate (DHF) et le THF sont les formes réduites des folates qui permettent le transfert de monocarbone vers d'autres composés (**Figure 2B**).



**Figure 2 : Structure de la vitamine B9 et de ses formes réduites.**

(A) La vitamine B9 (ou folates) est composée d'un acide *para*-amino-benzoïque en son centre, relié d'une part à une base ptéridine et d'autre part à un (ou des) résidu(s) glutamate. Lorsqu'elle comporte un seul résidu glutamate, on parle de la forme monoglutamate, contre polyglutamate lorsqu'elle en comporte plusieurs. C'est majoritairement sous cette dernière forme qu'elle est rencontrée dans l'alimentation (Guilland et Aimone-Gastin, 2013). Figure réalisée à l'aide du site [librairiedemolecules.education.fr](http://librairiedemolecules.education.fr).

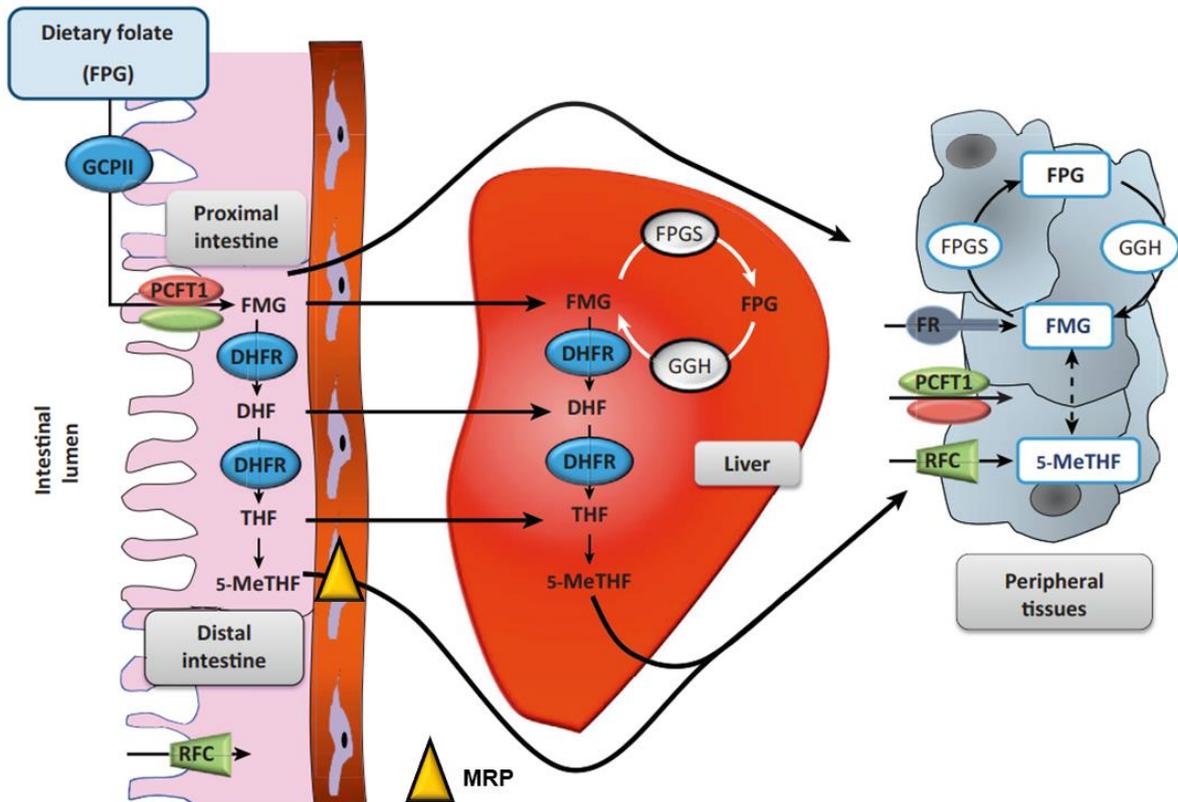
(B) Structure de la vitamine B9 sous ses formes réduites.

L'apport alimentaire en vitamine B9 est influencé par différents facteurs dont la stabilité des folates, l'origine de l'apport ou encore l'environnement digestif. Par le fait que les folates possèdent un ou plusieurs résidus glutamate, on retrouve donc différentes formes de vitamine B9 dans les aliments, dont la forme « polyglutamate » est majoritaire. Une déficience en vitamine B9 peut avoir plusieurs origines, dont un défaut d'apport nutritionnel, des mutations génétiques entraînant un défaut dans le

cycle (comme la mutation du gène *MTHFR*), ou une malabsorption (comme une mutation héréditaire du gène codant pour le transporteur aux folates PCFT (*Proton-Coupled Folate Transporter*) (Aluri *et al.*, 2018), la prise de médicaments ciblant les folates comme le méthotrexate (Visentin *et al.*, 2012) ou encore un besoin accru comme lors d'une grossesse (Ebara, 2017). Afin d'éviter ces situations de carence, il existe des recommandations nutritionnelles. Le référentiel 2021 publié par l'ANSES (l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) indique que pour les personnes de 18 ans ou plus, les apports recommandés sont de 330 µg/jour, contre 600 µg/jour pour une femme enceinte et 500µg/jour pour une femme en période d'allaitement (**Annexe 4**). Une supplémentation est recommandée en période périconceptionnelle (8 semaines avant et après conception) pour les femmes, afin de limiter les risques de DFTN (Czeizel et Dudás, 1992). De même, une limite supérieure de sécurité à 1000 µg/jour d'apport en acide folique (forme synthétique du dérivé oxydé du folate monoglutamate présente dans aliments enrichis et les compléments alimentaires) a été définie, pour éviter les effets négatifs de la supplémentation (**Annexe 4**). En effet, des symptômes graves liés à une carence en vitamine B12 peuvent être masqués par l'excès d'apport en vitamine B9, pouvant alors entraîner des troubles neurologiques (Butterworth et Tamura, 1989).

#### 1.2.2. Métabolisme des folates

La forme polyglutamate du folate présente dans l'alimentation est incapable de passer la barrière intestinale. La glutamate carboxypeptidase II (GCP II) va hydrolyser la forme polyglutamate en monoglutamate. Cette enzyme est présente au niveau de la barrière intestinale du jéjunum proximal (Chandler *et al.*, 1986). L'internalisation dans les entérocytes se fait grâce au transporteur des folates couplé aux protons PCFT présent sur la partie apicale. Le fonctionnement de ce récepteur est détaillé dans le paragraphe 2.2. Une fois dans les entérocytes, la vitamine B9 sera transformée de manière indirecte en MeTHF. Sous cette forme, les folates peuvent passer dans le sang veineux grâce aux protéines de la famille des MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*). L'entrée dans les cellules se fait ensuite grâce aux 2 autres types de récepteurs aux folates, les récepteurs FR (*Folate Receptor*) et RFC (*Reduced Folate Carrier*) (**Figure 3**).

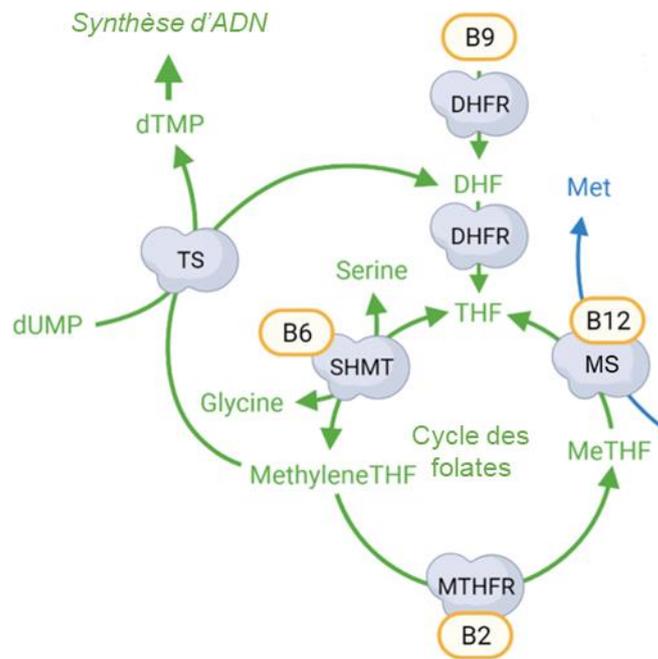


**Figure 3 : Mécanismes d'absorption des folates depuis la lumière intestinale jusqu'aux tissus cibles.**

La glutamate carboxypeptidase II (GCPII) présente sur la bordure en brosse des intestins est capable d'hydrolyser la forme polyglutamate du folate, en forme monoglutamate. L'internalisation dans les entérocytes se fait grâce au transporteur PCFT1. Sous la forme MeTHF, les folates peuvent passer dans le sang veineux grâce aux protéines de la famille des MRP (pour *Multidrug Resistance-associated Protein*). L'entrée dans les cellules se fait ensuite grâce aux récepteurs FR (*Folate Receptor*) et RFC (*Reduced Folate Carrier*). Modifiée de (Guéant *et al.*, 2013).

*Abréviations additionnelles* : FPG : folate polyglutamate ; FMG : folate monoglutamate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate ; GGH :  $\gamma$ -glutamyl hydrolase; FPGS : folylpoly- $\gamma$ -glutamyl synthétase.

Une fois dans la cellule, le MeTHF peut être reconverti en folate monoglutamate et/ou polyglutamate (Ebara, 2017). Il peut donc être retrouvé sous forme mono- ou polyglutamate DHF et ensuite mono- ou polyglutamate THF. Les conversions en DHF, puis en THF, se font grâce à la dihydrofolate réductase (DHFR). Le THF est ensuite converti en méthylène THF grâce à la SHMT, qui permet en parallèle la conversion de la glycine en sérine. Cette dernière pourra alors entrer dans la synthèse des protéines. Le méthylène THF peut alors soit être réduit en MeTHF par action de l'enzyme MTHFR, soit être reconverti en DHF grâce à la thymidylate synthase (TS). Cette enzyme permet également la conversion de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP), qui entre dans la synthèse d'ADN. Enfin, le MeTHF redonnera du THF par action de la MS dont la vitamine B12 est le cofacteur (**Figure 4**) (Fowler, 2001; Guéant *et al.*, 2013; Froese *et al.*, 2019).



**Figure 4 : Cycle des folates.**

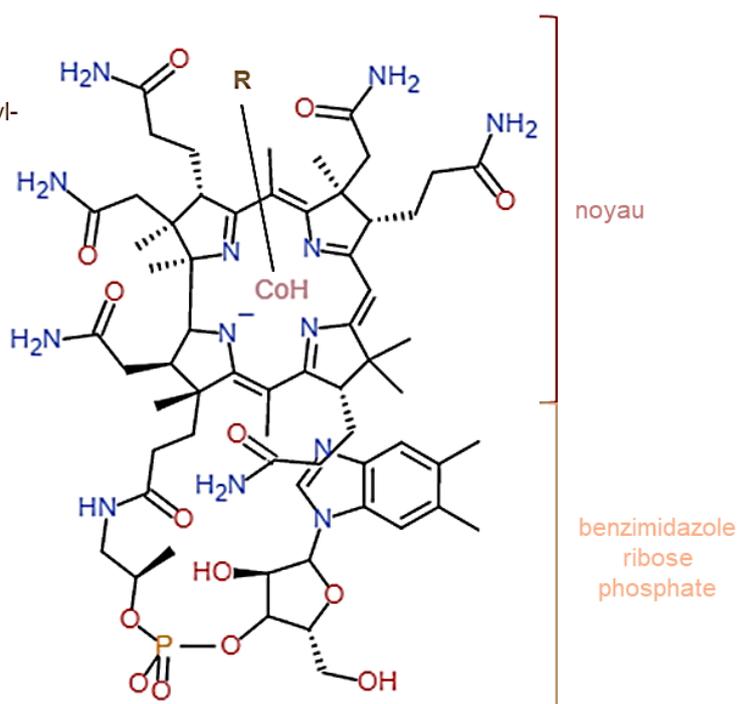
La vitamine B9 monoglutamate est réduite en dihydrofolate (DHF) monoglutamate, lui-même réduit en tétrahydrofolate (THF) monoglutamate. Cela est également le cas lorsqu'il s'agit de la forme polyglutamate. Ces 2 étapes de réduction se font grâce à la dihydrofolate réductase (DHFR). Le THF est ensuite converti en méthylène-THF, grâce à la sérine hydroxy-méthyltransférase (SHMT), qui permet en parallèle la conversion de la glycine en sérine, qui pourra alors participer à la formation des protéines. Le méthylène-THF peut alors soit être réduit en méthyl-THF (MeTHF) par action de l'enzyme Méthylène Tétrahydrofolate Réductase (MTHFR), soit être reconverti en DHF grâce à la thymidylate synthase (TS). Cette enzyme permet également la conversion de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP), qui entrera alors dans la synthèse d'ADN. Enfin, le MeTHF redonnera du THF par action de la MS dont la vitamine B12 est le cofacteur (Fowler, 2001; Guéant *et al.*, 2013; Froese *et al.*, 2019). Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

### 1.3. Cobalamine : origine et métabolisme

#### 1.3.1. Structure et apport en vitamine B12

La cobalamine est un micronutriment hydrosoluble essentiel apporté exclusivement par l'alimentation d'origine animale (viande, poisson, œufs et produits laitiers). Elle se compose d'un noyau corrine tétrapyrrolique à cobalt (Co) relié à un groupement benzimidazole ribose phosphate. L'atome de Co situé au centre du noyau peut être relié à différents groupements, ce qui est à l'origine des différentes formes de vitamine B12. Le groupement peut soit être un hydroxyle (-OH), donnant alors la forme hydroxocobalamine, soit un méthyle (-CH<sub>3</sub>) générant la forme méthylcobalamine, soit un cyanure (-CN) pour la forme cyanocobalamine ou encore une désoxyadénosine pour former l'adénylcobalamine (**Figure 5**). Les formes cyano- et hydroxocobalamine représentent les formes stables, tandis que la méthylcobalamine est le cofacteur de la MS dans le métabolisme des monocarbones (Scott, 1997; Froese *et al.*, 2019).

R = OH → hydroxo-  
 R = CH<sub>3</sub> → méthyl-  
 R = CN → cyano-  
 R = désoxyadénosyl → adénosyl-



**Figure 5 : Structure de la vitamine B12.**

La vitamine B12 (ou cobalamine) est composée d'un noyau tétrapyrrolique à cobalt (Co). Elle peut prendre différentes formes en fonction du groupement rattaché à l'atome de Co. Il peut s'agir de la forme hydroxocobalamine (-OH), de la forme méthylcobalamine (-CH<sub>3</sub>), de la forme cyanocobalamine (-CN) ou encore de la forme adénosyl-cobalamine (-désoxyadénosyl). De plus, un groupement benzimidazole ribose phosphate vient compléter la structure de la vitamine B12 (Scott, 1997; Froese *et al.*, 2019). Figure réalisée à l'aide du site [librairiedemolecules.education.fr](http://librairiedemolecules.education.fr).

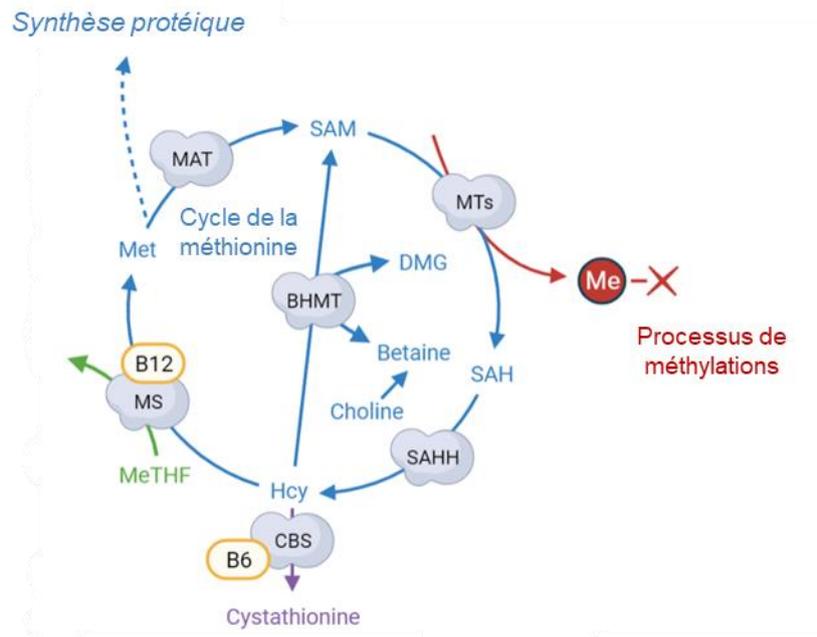
L'apport alimentaire en vitamine B12 se faisant uniquement par les aliments d'origine animale, une des principales causes de carence en vitamine B12 dans les pays développés correspond aux régimes végétariens. Ces déficits sont d'autant plus importants à prendre en compte chez les femmes en période périconceptionnelle car ils peuvent entraîner des conséquences sur le développement de l'enfant, comme des retards de développement ainsi qu'une hypotonie (O'Leary et Samman, 2010; Kozyraki et Cases, 2013). Une carence en vitamine B12 peut également entraîner une hyperhomocystéinémie et une hyperhomocystéinurie (O'Leary et Samman, 2010; Kozyraki et Cases, 2013). De plus, comme pour la vitamine B9, il existe également différents facteurs limitant l'absorption et la biodisponibilité de la vitamine B12 comme des facteurs génétiques associés à une malabsorption (comme la mutation du récepteur CD320) ou à des défauts dans le métabolisme (comme la mutation du gène *MMACHC*) (Nielsen *et al.*, 2012). Certains traitements médicamenteux comme les inhibiteurs de pompes à protons peuvent également impacter l'assimilation de la vitamine B12 (Long *et al.*, 2012). Les recommandations d'apport nutritionnel données par le référentiel 2021 de l'ANSES préconisent un apport de 4 µg/jour pour les personnes de 18 ans ou plus, de 4,5 µg/jour pour les femmes enceintes et 5 µg/jour pour les femmes en période d'allaitement (**Annexe 4**). Une supplémentation en cobalamine peut être mise en place pendant la grossesse, selon une recommandation de 2,5 µg/jour, afin d'éviter les DFTN (O'Leary et Samman, 2010; Kozyraki et Cases, 2013).

### 1.3.2. Métabolisme de la vitamine B12

Le transport de la cobalamine jusque dans l'estomac est permis par l'haptocorrine, le premier transporteur intervenant dans l'absorption de la vitamine B12. Ce transporteur sera dégradé par des protéases pancréatiques. L'absorption intestinale de la vitamine B12 est rendue possible grâce au récepteur CUBAM présent sur la partie terminale de l'iléon (Sherwood *et al.*, 2016). Ce récepteur reconnaît le complexe vitamine B12-facteur intrinsèque, ce facteur étant l'un des 3 transporteurs de la vitamine B12. Chez l'Homme, ce facteur est quasi-exclusivement retrouvé au niveau du tube digestif, et est produit par les cellules pariétales de l'estomac. L'externalisation de la cobalamine dans le sang est possible grâce au transporteur MRP1, faisant partie de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*). Elle sera alors prise en charge par un second transporteur, la transcobalamine, afin d'être redistribuée aux cellules de l'organisme. Ces cellules expriment le récepteur CD320, appartenant à la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL), et reconnaissant le complexe vitamine B12-transcobalamine (Nielsen *et al.*, 2012). Avant d'entrer dans le métabolisme des monocarbones, la cobalamine est transportée du lysosome au cytoplasme cellulaire, où elle sera prise en charge par différentes enzymes (MMACHC et MMADHC) afin d'entrer dans le cycle de la méthionine en tant que cofacteur de la MS (Quadros, 2010). De plus, la B12 sert également de cofacteur à la méthylmalonyl-CoA mutase dans la mitochondrie (Takahashi-Iñiguez *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Cycle de la méthionine

Le bon fonctionnement du cycle de la méthionine est permis grâce à la vitamine B12, ce qui permet d'éviter l'accumulation de l'Hcy qui est un acide aminé toxique. En effet, la MS utilise la vitamine B12 comme cofacteur afin de transférer le groupement -CH<sub>3</sub> du MeTHF utilisé comme substrat, à l'Hcy, afin de former de la Met d'une part, et le THF de l'autre part. Cette reméthylation de l'Hcy en Met est permise lorsque la forme de la B12 utilisée par la MS est la forme méthylcobalamine (Li *et al.*, 1996; Matthews, 2001). La Met ainsi produite est ensuite transformée en SAM, elle-même déméthylée en SAH, ce qui permet le transfert du groupement méthyle sur l'ADN *via* les DNMTs (*DNA methyltransferases*), sur l'ARN *via* des MTs, ou encore sur les protéines grâce aux PRMTs (*protein arginine methyltransferases*) ou PKMTs (*protein lysine methyltransferases*). La SAH sera donc hydrolysée en Hcy, qui pourra soit être reméthylée en Met grâce à la MS, ou la BHMT (Bétaïne Homocystéine Méthyltransférase) par la voie dite de « secours », soit entrer dans la voie de la transsulfuration (*voir paragraphe 1.4 ; Figure 6*). Ces processus et les réactions métaboliques qui s'en suivent sont impliqués dans la synthèse des neurotransmetteurs, des phospholipides, de l'ADN et de l'ARN (Quadros, 2010; Guéant *et al.*, 2013; Froese *et al.*, 2019).



**Figure 6 : Cycle de la méthionine.**

La vitamine B12 sous forme méthylcobalamine est le cofacteur de la méthionine synthase (MS). Cette enzyme permet la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (Met), qui pourra ensuite être transformée en S-Adénosyl-méthionine (SAM), le donneur universel de groupement méthyle. La déméthylation de la SAM en S-Adénosyl-homocystéine (SAH) par les méthyltransférases (MTs) permet le transfert du groupement sur l'ADN, l'ARN ou les protéines. La SAH sera ensuite hydrolysée en Hcy, qui sera soit reméthylée en Met par la MS, soit entrer dans la voie de la bétaine homocystéine méthyltransférase (BHMT), soit entrer dans la voie de la transsulfuration (Quadros, 2010; Guéant *et al.*, 2013; Froese *et al.*, 2019). Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

*Abréviations additionnelles :* CBS : cystathionine  $\beta$ -synthase ; DMG : diméthylglycine ; Me : groupement méthyle ; MeTHF : méthyltétrahydrofolate ; MTs : méthyltransférases SAM-dépendantes ; SAHH : S-Adénosylhomocystéine hydrolase.

#### 1.4. L'homocystéine : molécule charnière du métabolisme des monocarbones

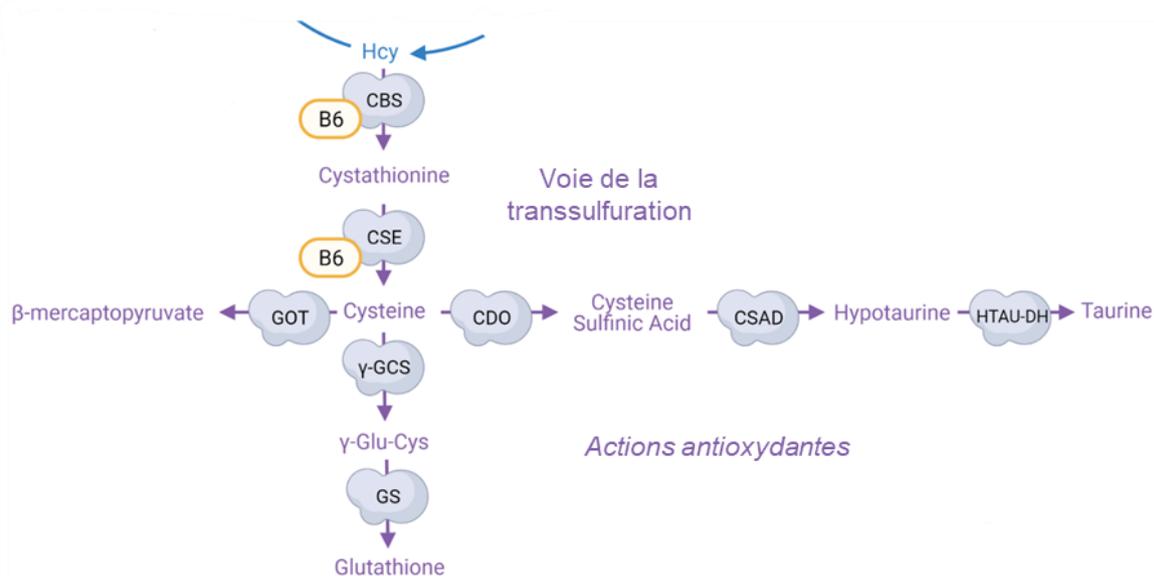
##### 1.4.1. Structure et apport en homocystéine

L'Hcy est un micronutriment important pour le métabolisme protéique, glucidique et lipidique (Kozyraki et Cases, 2013). Il s'agit d'un acide aminé sulfuré, non protéinogène, synthétisé à partir du cycle de la méthionine. Elle se situe à l'interface entre le cycle des folates et la voie de la transsulfuration où elle participe aux processus de reméthylation B9/B12 dépendant (par le biais de la MS) et indépendant (*via* la BHMT). Elle est le précurseur de la cystathionine, cystéine et autres métabolites de la voie de la transsulfuration. Implicitement, l'Hcy possède 4 rôles biologiques : il s'agit (1) de la forme de stockage de la Met ; (2) du métabolite receveur du groupement méthyle dans le catabolisme de la choline ; (3) du précurseur des métabolites de la voie de la transsulfuration ; (4) d'un substrat essentiel au recyclage des folates tissulaires en cas de déficience en MS (Finkelstein et Martin, 2000).

De plus, l'Hcy peut être impliquée dans des modifications structurales de protéines par le biais de l'homocystéinylation : le groupement thiol (-SH) de l'Hcy peut se lier à un autre -SH se trouvant sur les résidus cystéine, formant ainsi un pont disulfure qui va modifier la fonction de la protéine. Il a été montré que cette réaction est possible sur l'hémoglobine, l'albumine sanguine, les LDL et les HDL, les immunoglobulines, la transferrine, le fibrinogène et l' $\alpha$ 1-antitrypsine (Jakubowski, 2008).

### 1.4.2. Voie de la transsulfuration

Le métabolisme de l'Hcy est régulé par les vitamines B9, B12 et B6. Il dépend de l'apport alimentaire de ces vitamines et de l'efficacité des enzymes impliquées dans le métabolisme des monocarbone (Finkelstein et Martin, 2000). Comme décrit ci-dessus, l'Hcy peut être reméthylée en Met par la MS ou par la BHMT, mais elle peut également être éliminée par la voie de la transsulfuration. Cette dernière fait intervenir une première enzyme, la cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), qui utilise la vitamine B6 comme cofacteur. La CBS permet la conversion de l'Hcy en cystathionine, qui sera ensuite dégradée en cystéine par l'action de la cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) (utilisant également la vitamine B6 comme cofacteur) (**Figure 7**). Produit terminal de cette voie, la cystéine peut être incorporée dans différents composants. Elle peut entrer (1) dans la formation du pyruvate (par action de la transaminase glutamique oxaloacétique, ou GOT), (2) participer à la formation de la taurine (*via* la cystéine dioxygénase (CDO)), ou (3) encore entrer dans la composition du glutathion (Sbodio *et al.*, 2019). La taurine et le glutathion sont de puissants antioxydants, permettant le maintien de la balance redox. En effet, une dérégulation de cette voie, tout comme une carence en vitamines B9/B12, peut conduire à l'accumulation d'Hcy plasmatique (ou hyperhomocystéinémie), pouvant à terme, mener à des effets toxiques liés à ses propriétés pro-apoptotiques et pro-oxydantes.



**Figure 7 : Voie de la transsulfuration.**

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé sulfuré non protéinogène qui fait le lien entre les 3 cycles du métabolisme des monocarbone. En effet, elle peut être reméthylée en Met par la MS (**Figure 4**), ou par la BHMT (**Figure 6**), mais elle peut également être éliminée par la voie de la transsulfuration. Dans cette dernière, l'Hcy sera convertie en cystathionine par la cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), qui utilise la vitamine B6 comme cofacteur. La cystathionine sera ensuite dégradée en cystéine par l'action de la cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE). Le produit terminal de cette voie, la cystéine, pourra ensuite être utilisée pour la synthèse de différents antioxydants. Par l'action de la transaminase glutamique oxaloacétique (GOT), elle entrera dans la formation de pyruvate ; par l'action de la  $\gamma$ -glutamyl cystéine synthétase ( $\gamma$ -GCS) et de la glutathion synthétase (GS), elle participera à la synthèse de glutathion ; et enfin, par l'action de diverses enzymes comme la cystéine dioxygénase (CDO), l'acide cystéine-sulfonique décarboxylase (CSAD) et l'hypotaurine déshydrogénase (HTAU-DH), elle contribuera à la formation de taurine (Kohl *et al.*, 2019; Sbodio *et al.*, 2019). Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

### 1.5. Conséquences des carences gestationnelles en donneurs de méthyle

Étant précurseurs des bases puriques et pyrimidiques, les folates sont nécessaires à la division et au maintien cellulaire. Des études ont pu démontrer qu'une carence précoce en donneurs de méthyle mène à des DFTN, des retards de croissance *in utero*, des anencéphalies (Herrmann, 2001; Mattson et Shea, 2003), des altérations de la neuroplasticité et des défauts cognitifs (Iskandar *et al.*, 2010). D'un point de vue métabolique, les déficits nutritionnels en vitamines B9/B12 engendrent une accumulation plasmatique et tissulaire d'Hcy, ayant des effets pro-oxydants et pro-apoptotiques avec des effets au niveau fonctionnel (Blaise *et al.*, 2007). Par ailleurs, une carence en folates peut impacter le développement cérébral postnatal en affectant notamment la neurogenèse et la composition lipidique de la myéline, en raison d'une diminution de la méthylation (Silva *et al.*, 2014; Pourié *et al.*, 2015). De plus, ces carences précoces sont également liées à un déficit de prolifération des progéniteurs neuronaux (Araki *et al.*, 2021), comme cela a récemment été montré dans un modèle murin *knock-out* conditionnel pour le gène *MTR* (codant pour la MS) au niveau cérébral (Matmat *et al.*, en cours de publication). L'hyperhomocystéinémie peut également être associée à un risque accru de développement de pathologies cardio- et cérébro-vasculaires (McCully, 2009; Blom et Smulders, 2011). Il a été montré qu'un déficit en folate pendant la grossesse est associé au risque d'autisme (Desai *et al.*, 2016).

Des études antérieures menées au sein du laboratoire ont pu mettre en évidence des altérations de la NSG et des perturbations épigénétiques liées au développement cérébral postnatal des ratons, associées à des troubles cognitifs et moteurs (Blaise *et al.*, 2007; El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014a, b; Willekens *et al.*, 2019). Des analyses transcriptomiques sur cette structure cérébrale chez des ratons issus de mères carencées ont permis d'identifier des dérégulations de gènes impliqués dans le développement cérébelleux et la plasticité synaptique, le tout associé à une diminution du nombre de cellules de *Purkinje* (Willekens *et al.*, 2019). Enfin, certaines formes d'autisme présentent des syndromes de déficits cérébraux en folate dus à la présence d'auto-anticorps anti-FR $\alpha$ . Dans ce cas, les patients sont traités avec de hautes doses d'acide folinique, allant de 0,5 à 1 mg/kg/jour (Ramaekers *et al.*, 2016). Une étude a également montré que l'expression des récepteurs aux folates (FR $\alpha$ , PCFT et RFC) et des transporteurs ABC (ABCB1, ABCC2, ABCG2, voir paragraphe 2.2) diminue au cours de la grossesse, notamment dans le placenta. Cette même étude a également mis en évidence une réduction de l'expression de FR $\alpha$  et PCFT dans le placenta prééclampsie (Williams *et al.*, 2012). Cela montre l'importance des transporteurs des folates pendant les premières phases de la grossesse, notamment lors du développement placentaire et embryonnaire.

L'absorption des folates est donc cruciale durant la grossesse et l'enfance, c'est pourquoi les femmes en période périconceptionnelle sont supplémentées en acide folique, en prévention du *spina bifida*, spécialement au cours du premier trimestre de grossesse (Smithells *et al.*, 1976; Wilson *et al.*, 2015). Ces suppléments ont été préconisés à la suite d'études montrant qu'elles permettent de réduire l'accumulation d'Hcy (Douaud *et al.*, 2013; Obeid, 2013). Il est donc évident que l'homéostasie intracérébrale en folate est essentielle lors du développement mais également à l'âge adulte pour le maintien de l'intégrité du tissu cérébral. Cet équilibre repose sur la présence des transporteurs des

folates dans le système nerveux central (SNC), et plus particulièrement au niveau de la barrière hématoencéphalique (BHE), où ils favorisent l'import des folates dans le cerveau (Alam *et al.*, 2020).

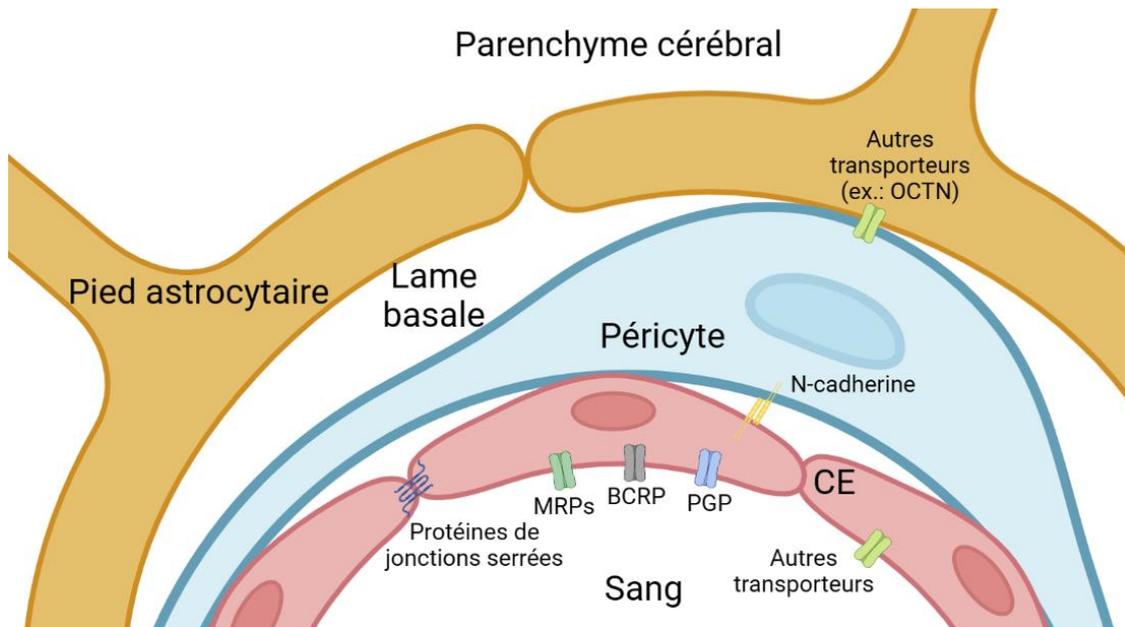
## 2. HOMÉOSTASIE CÉRÉBRALE EN FOLATES ET INTERFACES SANG-CERVEAU

Les interfaces sang-cerveau comprennent la BHE et la barrière sang-liquide céphalorachidien (LCR). La BHE, située entre le sang et le milieu cérébral, a été décrite pour la première fois en 1885 par Paul Ehrlich comme étant une membrane complexe, hautement sélective et semi-perméable (Daneman et Prat, 2015). En effet, du fait de sa composition particulière, elle est capable de réguler les flux entre les 2 compartiments. La barrière sang-LCR ou « barrière choroïdienne » est représentée par les plexus choroïdes. On la retrouve également au niveau des organes circumventriculaires (dite tanyctaire) ainsi qu'au niveau de l'arachnoïde (alors nommée arachnoïdienne) (Engelhardt et Sorokin, 2009).

### 2.1. Structure des interfaces sang-cerveau

#### 2.1.1. Structure de la BHE

La BHE est présente sur l'ensemble du SNC. Elle comprend l'ensemble des composants cellulaires et moléculaires interagissant avec les cellules endothéliales des capillaires. La paroi des vaisseaux sanguins cérébraux formée de cellules endothéliales, est continue et non fenestrée (Oldendorf, 1977; Daneman et Prat, 2015). Ces cellules endothéliales sont en contact des péricytes, qui sont enchâssés dans la membrane basale des vaisseaux. Les cellules endothéliales et les péricytes sont entourés des pieds astrocytaires, formant ainsi la BHE (**Figure 8**) (Blanchette et Daneman, 2015; Daneman et Prat, 2015). Cet ensemble, conjointement aux neurones, les cellules de la microglie et les macrophages périvasculaires interagissant avec la BHE, composent l'unité neurovasculaire. Il a été montré que les péricytes sont les premiers éléments vasculaires à se dilater lors de l'activité neuronale. Il existe donc un couplage entre cette activité et la régulation du débit vasculaire dans les capillaires cérébraux (Hall *et al.*, 2014). Même si les cellules endothéliales constituent la barrière physique et métabolique, les interactions avec les types cellulaires adjacents sont des prérequis à la fonction de barrière. La composition, la morphologie, l'activité métabolique ainsi que la fonction de ces cellules endothéliales les rendent distinctes des autres types de cellules endothéliales de l'organisme (Engelhardt et Sorokin, 2009).



**Figure 8 : Structure de la barrière hémato-encéphalique.**

La barrière hémato-encéphalique (BHE) sépare le sang du parenchyme cérébral. Elle est composée des cellules endothéliales (CE), des péricytes et des pieds astrocytaires. Ces 3 composants interagissent les uns avec les autres par le biais de jonctions cellulaires afin de maintenir l'intégrité de la BHE ainsi que sa perméabilité. Les jonctions cellulaires sont formées de différentes protéines comme les claudines et les occludines ou encore la N-cadhérine qui permet de lier les CE aux péricytes. Le flux de molécules, ions et cellules se fait grâce à différents mécanismes de transport actifs mettant en jeu des protéines telles que les MRP (*Multidrug Resistance-associated Proteins*), BCRP (*Breast Cancer Related Protein*) et la PGP (glycoprotéine-P, ou MDR1) (Blanchette et Daneman, 2015; Daneman et Prat, 2015; Sweeney *et al.*, 2019). Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

Abréviations additionnelles : OCTN : *novel organic cation transporteur*

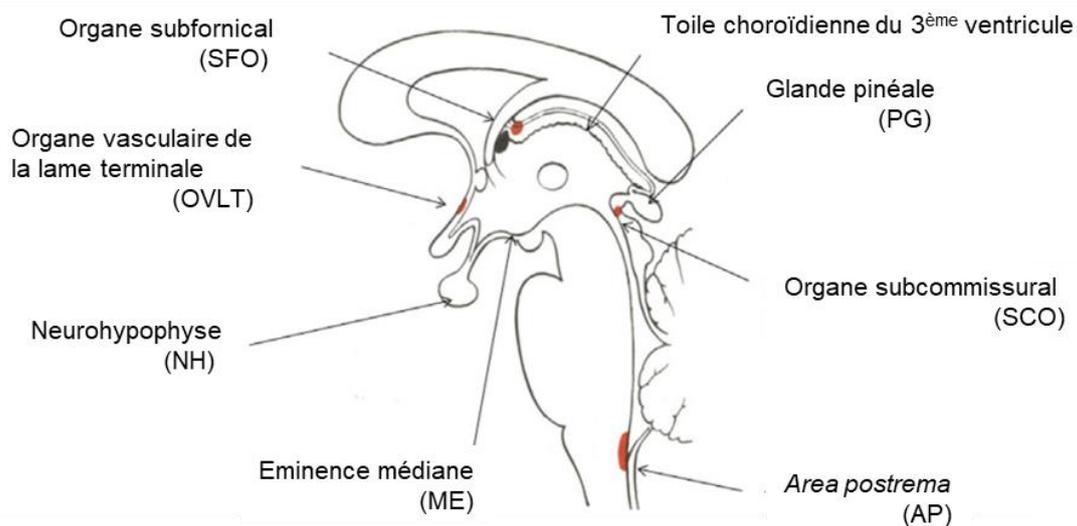
Les cellules endothéliales possèdent une forte capacité de synthèse protéique ainsi qu'une importante activité métabolique du fait de la présence d'une grande quantité de mitochondries (Oldendorf, 1977; Liu *et al.*, 2012). De plus, elles expriment divers récepteurs, transporteurs, et enzymes qui contribuent au phénotype de barrière (Declèves *et al.*, 2014). Ces cellules sont polarisées et étroitement liées entre elles par des jonctions adhérentes (impliquant la cadhérine V) et serrées incluant les claudines (Cldn) 3, 5, 12, l'occludine et les protéines ZO (*zonula occludens*) (Abbott *et al.*, 2006). Les péricytes sont des cellules que l'on retrouve autour des capillaires, des veinules et artérioles. Ces cellules interagissent avec les cellules endothéliales par le biais de jonctions « *peg-and-socket* », faisant intervenir la N-cadhérine et la connexine 43. Ces jonctions se composent de protrusions cytoplasmiques péricytaire (ou *pegs*) s'insérant dans des invaginations endothéliales (aussi appelées *socket*). Cette disposition permet notamment le passage des nutriments et des molécules de signalisation (Armulik *et al.*, 2011; Tanigami *et al.*, 2012; Liebner *et al.*, 2018). La membrane basale, quant à elle, participe essentiellement au maintien de l'intégrité et des propriétés de la BHE (Thomsen *et al.*, 2017).

Enfin, les pieds astrocytaires ont une forte expression des connexines 30 et 43 leur permettant d'établir des jonctions communicantes (De Bock *et al.*, 2014). Comme pour la membrane basale, ces pieds astrocytaires sont essentiels au maintien du phénotype de barrière de la BHE car ils optimisent la qualité des jonctions serrées, régulent l'expression et la polarisation de certains transporteurs (comme MDR1), mais ils peuvent également induire des systèmes enzymatiques (Abbott *et al.*, 2006; Liebner *et*

*al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Il existe également un transport secondaire actif au niveau de la BHE, comme par exemple celui réalisé par les perméases pour le transport des acides aminés. En plus de ce rôle de maintien, les pieds astrocytaires participent également activement au contrôle de l'homéostasie cérébrale, notamment en régulant le pH, la concentration en ions ainsi que le volume d'eau présent au sein du SNC (Liu *et al.*, 2018). Même si les astrocytes sont essentiels à l'intégrité de la BHE, ce sont les cellules endothéliales et les péricytes qui possèdent les mécanismes de transport les plus critiques de la BHE (Zeisel *et al.*, 2015).

### 2.1.2. Structure de la barrière sang-LCR

De la même manière que pour la BHE, les interfaces sang-LCR jouent un rôle de barrière. Les organes circumventriculaires (OCV ; **Figure 9**) sont des structures neuroépithéliales retrouvées au niveau des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ventricules cérébraux, possédant des cellules épendymaires spécialisées ou tancytes. L'éminence médiane (ME), les glandes pinéale (PG) et pituitaire postérieure (NH), l'*area postrema* (AP), les organes subfornical (SFO) et subcommissural (SCO), et l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) constituent les OCV (Ballabh *et al.*, 2004; Szathmari *et al.*, 2015).



**Figure 9 : Localisation des organes circumventriculaires.**

Les organes circumventriculaires sont composés de différentes structures cérébrales : l'éminence médiane (ME), la neurohypophyse (NH), l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), l'organe subfornical (SFO), la glande pinéale (PG), l'organe subcommissural (SCO) et l'*area postrema* (AP). Ces organes sont constitués de cellules neuroépithéliales spécialisées et sont retrouvés au niveau des 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ventricules cérébraux. Ces cellules neuroépithéliales sont des cellules épendymaires, que l'on appelle également des tancytes. Traduit de (Szathmari *et al.*, 2015).

Contrairement à la BHE, les capillaires des OCV et des plexus choroïdes sont fenestrés, permettant la diffusion des molécules hydrosolubles (Engelhardt et Sorokin, 2009; Szathmari *et al.*, 2015). Au niveau des OCV, cette fenestration permet la régulation des glandes endocrines en périphérie, ainsi que la régulation du système nerveux autonome qui comporte notamment le contrôle du rythme cardiaque et du métabolisme (Szathmari *et al.*, 2015; Gibbons, 2019). Au niveau des plexus choroïdes, la filtration se fait par la partie apicale des cellules épithéliales qui possèdent des jonctions cellulaires. Ces jonctions serrées sont caractérisées par une expression des CLDN1, CLDN2, CLDN3 chez l'Homme et le rat, et de la CLDN5 chez l'Homme uniquement (Kratzer *et al.*, 2012). Ces protéines

n'ont pas toutes la même fonction : la CLDN1 est une claudine de scellement, alors que la CLDN2, majoritairement retrouvée au niveau de cette barrière, forme un pore assurant le passage paracellulaire de petites molécules. On retrouve également une expression de l'occludine et de la tricelluline, cette dernière régulant le passage de molécules de haut poids moléculaire (Mariano *et al.*, 2011; Iwamoto *et al.*, 2014). En plus de cette fonction de barrière, les plexus choroïdes synthétisent le LCR. Ces 2 processus sont permis par l'expression de transporteurs contribuant ainsi à l'apport de nutriments et l'élimination de molécules toxiques (Engelhardt et Sorokin, 2009).

En résumé, le rôle principal de ces interfaces sang-cerveau est de réguler le passage de molécules, ions et cellules entre le milieu circulant et le tissu cérébral afin de maintenir l'homéostasie cérébrale. Ces fonctions sont assurées par la présence des jonctions cellulaires serrées composées de protéines cytoplasmiques comme les protéines ZO et la cinguline, mais également de protéines membranaires comme les occludines et les Cldn. Cependant, toutes les molécules ne peuvent pas diffuser à travers la BHE et nécessitent un certain nombre de mécanismes de transport actifs spécifiques aux cellules des capillaires cérébraux. En outre, une BHE fonctionnelle repose sur un transport bidirectionnel des nutriments vers le cerveau, et l'élimination des molécules toxiques vers le compartiment sanguin (Engelhardt et Sorokin, 2009).

## 2.2. Les mécanismes de transport

### 2.2.1. Rôle des enzymes

Du fait de la composition, de l'organisation et de la fonction de la BHE, le passage de molécules thérapeutiques au sein du SNC est complexe. Afin d'éviter que des substances toxiques ou des composés pharmacologiques actifs n'entrent dans le cerveau, ils sont inactivés par les enzymes de phase I exprimées par les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et des plexus choroïdes (Declèves *et al.*, 2014).

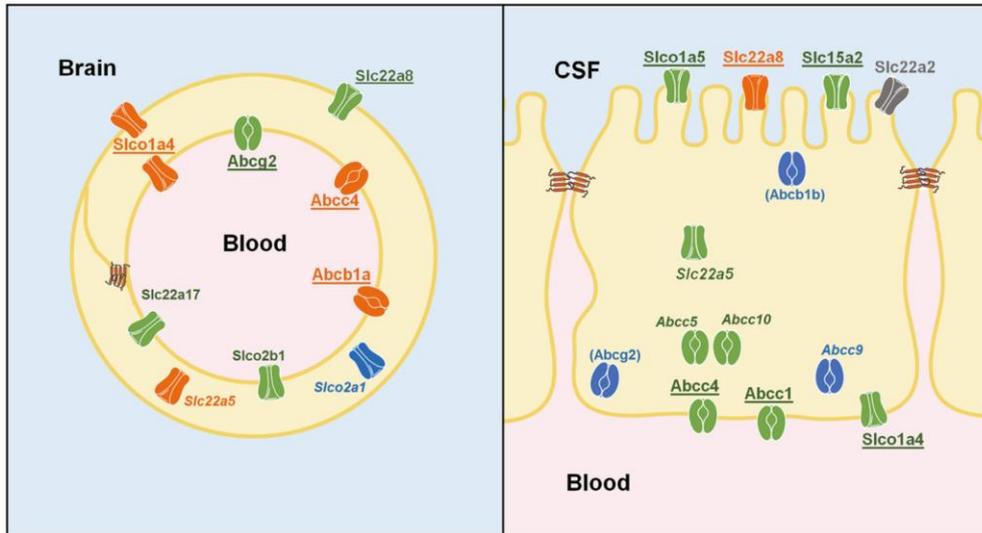
Au niveau cérébral, l'inactivation des monoamines neuroactives que sont l'adrénaline, la noradrénaline et la sérotonine se fait grâce à la monoamine oxydase (MAO). Elle est également capable d'agir sur des xénobiotiques contenant des amines. Il existe 2 isoformes de la MAO, la MAOA étant plus exprimée au niveau des capillaires cérébraux et des plexus choroïdes par rapport à d'autres tissus comme le foie chez la souris (Vanlandewijck *et al.*, 2018). On retrouve également certains membres de la superfamille enzymatique des cytochromes P450 (CYP). Ces enzymes catalysent des réactions de fonctionnalisation de la phase I du métabolisme des xénobiotiques. Au niveau de la BHE humaine, on retrouve principalement les sous-familles CYP2U1 et CYP1B1. Cette dernière participe au métabolisme de molécules endogènes comme l'estradiol, de médicaments (tels que le tamoxifène et le docétaxel) ou encore de composés toxiques (Gherzi-Egea *et al.*, 1993, 1994; Dauchy *et al.*, 2008; Shawahna *et al.*, 2011; Dutour et Poirier, 2017). L'isoenzyme CYP2U1 est impliquée dans le métabolisme des acides gras insaturés et saturés à longue chaîne (Dhers *et al.*, 2017). Enfin, il existe également une activité époxyde hydrolase au niveau des microvaisseaux cérébraux et des plexus choroïdes (Gherzi-Egea *et al.*, 1988, 1993; Marowsky *et al.*, 2009). Par exemple, l'enzyme microsomale (EPHX1) est essentielle

pour la détoxification des époxydes issus du métabolisme de certains xénobiotiques et des époxydes exogènes (Václavíková *et al.*, 2015).

Quant aux enzymes de phase II, elles catalysent les réactions de conjugaison permettant l'élimination de leurs substrats en les rendant plus polaires. Parmi ces enzymes, on retrouve notamment les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) qui réalisent les réactions de glucuroconjugaison, les glutathion S-transférases (GST) qui conjuguent des molécules au glutathion réduit (GSH), ainsi que les sulfotransférases (SULT) qui possèdent de nombreux substrats endogènes comme les hormones et les stéroïdes (Shawahna *et al.*, 2011). Ces enzymes sont présentes dans la BHE et la barrière sang-LCR. Selon le substrat utilisé, l'activité des UGT dans les plexus choroïdes de rat est comparable à celle du foie, et est 40 à 150 fois supérieure par rapport à l'activité mesurée dans la BHE (Ghersì-Egea *et al.*, 1994; Leininger-Muller *et al.*, 1994). Les plexus choroïdes possèdent également un équipement enzymatique de réactions antioxydantes, notamment l'activité glutathion peroxydase (Tayarani *et al.*, 1989).

### 2.2.2. Rôle des récepteurs et transporteurs

Du fait même de la structure même de la BHE, il existe très peu de passage transcellulaire de molécules. Pour compenser et sélectionner les composés, les cellules endothéliales de la BHE possèdent de nombreux mécanismes de transport. Cela permet la sélection des nutriments et molécules actives présentes dans le sang, mais également l'élimination des déchets métaboliques. Les transporteurs d'efflux présents au niveau de la BHE régulent le passage de composés entre le sang et le parenchyme cérébral. Parmi ces transporteurs, on retrouve ceux de la famille des transporteurs SLC (*Solute Carrier Transporter*) et ceux de la famille des transporteurs ABC (**Figure 10**). Les transporteurs SLC permettent la diffusion facilitée (ou transport actif secondaire) alors que ceux de la famille ABC effectuent un transport actif primaire. De manière générale, l'absorption de molécules est permise par les transporteurs SLC et l'efflux contre le gradient de concentration par les transporteurs ABC (Morris *et al.*, 2017).



**Figure 10 : Systèmes de transports au niveau des interfaces sang-cerveau.**

L'image de gauche représente la barrière hémato-encéphalique (BHE) et celle de droite la barrière sang-liquide céphalorachidien (LCR ou CSF pour *cerebrospinal fluid*). Au niveau de la BHE, on retrouve majoritairement des transporteurs ABC sur la partie luminale des cellules endothéliales. Quant aux transporteurs SLC, ils sont plutôt retrouvés du côté du parenchyme cérébral. Le même type d'organisation est retrouvé au niveau des plexus choroïdes avec les transporteurs ABC sur la partie basale et ceux de la famille SLC sur la partie en contact avec le LCR (issue de Ghersi-Egea *et al.*, 2018).

### 2.2.2.1. Les transporteurs SLC

Les transporteurs SLC constituent une superfamille de gènes contenant au total 52 familles et près de 400 transporteurs différents. Ils incluent non seulement des échangeurs et transporteurs d'ions, mais également des mécanismes de transport facilité. Ces transporteurs peuvent agir de façon uni- ou bi-directionnelle et sont exprimés dans le foie, l'intestin, les reins mais également au niveau des barrières placentaire, la BHE, les plexus choroïdes et la barrière hémato-testiculaire (BHT). Ces transporteurs permettent le transfert de diverses molécules comme des médicaments, des stéroïdes ou encore des peptides (Morris *et al.*, 2017).

Le substrat énergétique principal du SNC est le glucose. Son apport depuis la périphérie s'effectue grâce au transporteur GLUT1, codé par le gène *Slc2a1*, et GLUT3, codé par le gène *Slc2a3*. Ils fonctionnent en uniport et possèdent un seul site de liaison aux hexoses. Lorsque la concentration en glucose dans le parenchyme cérébral est inférieure à celle du plasma, ils permettent son entrée au niveau du SNC. GLUT1 est exprimé par les cellules endothéliales (Sweeney *et al.*, 2019). Au niveau des interfaces sang-cerveau, on retrouve principalement les transporteurs SLCO, SLC7A, SLC16A, SLC22A, SLC28A et SLC29A au niveau de la BHE ; et SLCO, SLC1A, SLC15 et SLC22 au niveau des plexus choroïdes des rongeurs (Stieger et Gao, 2015; Strazielle et Ghersi-Egea, 2015). La famille SLCO possède une large variété de substrats, notamment les prostaglandines, les hormones thyroïdiennes, l'oestradiol-17 $\beta$ -glucuronide et les stéroïdes sulfatés comme l'estrone-3-sulfate, le déhydroépiandrostérone sulfate (DHEAS) et la prégnénolone sulfate (Grube *et al.*, 2018).

Le transporteur RFC, encodé par le gène *Slc19a1*, appartient à la famille des transporteurs SLC. Il s'agit d'un échangeur anionique actif qui permet l'internalisation des folates réduits dans les

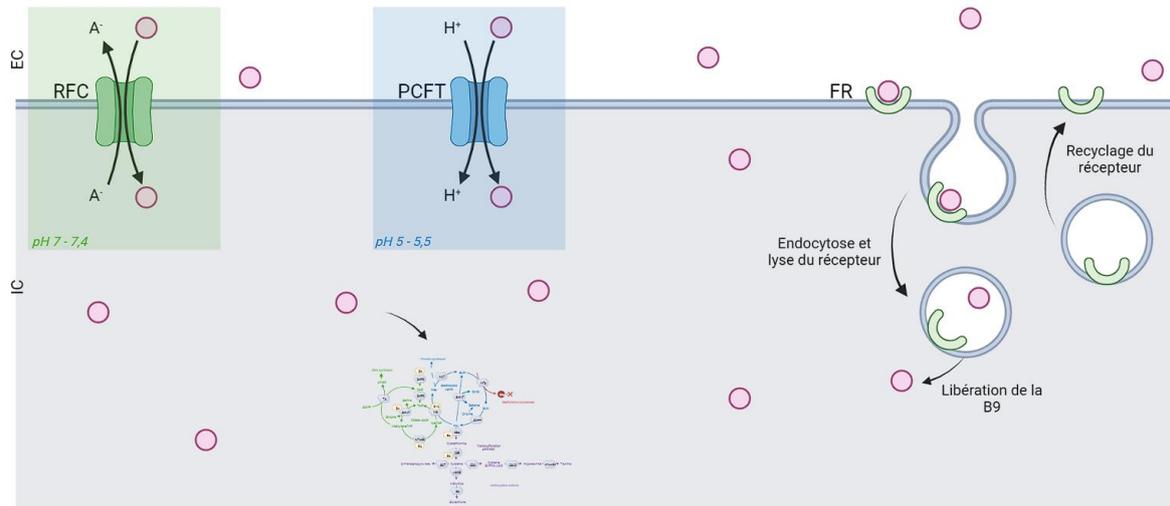
tissus à partir du sang (**Figure 11**). Chez les mammifères, le substrat physiologique de RFC est la forme MeTHF de la vitamine B9, qui correspond à la forme circulante majoritaire de cette vitamine (Matherly *et al.*, 2007). Comme pour les autres transporteurs FRs et PCFT, RFC est capable de lier l'acide folique, mais avec une affinité 50 à 100 fois inférieure comparée au MeTHF. Ce transporteur est caractérisé par un fonctionnement à pH physiologique (pH 7 – 7,5), activité qui décroît avec l'augmentation de la valeur de pH. En plus du transport de la vitamine B9, RFC est également capable d'internaliser des molécules ciblant les folates telles que l'aminoptérine, le méthotrexate, le pémétrexed, le pralatrexed, et le ralitrexed (Matherly *et al.*, 2007). Ces molécules peuvent également être transportées par PCFT. A l'inverse, les 2 molécules antitumorales  $\delta$ -hémiphthaloylornithine antifolate PT523 et la benzoquinazoline antifolate GW1843U89, sont spécifiques de RFC (Desmoulin *et al.*, 2012; O'Connor *et al.*, 2021). Il a été démontré que le polymorphisme 80G>A du gène codant pour RFC interagit avec le nombre de copies du chromosome 21 et affecte l'efficacité et la toxicité du méthotrexate (Gregers *et al.*, 2010).

Le transporteur RFC est exprimé de manière ubiquitaire et joue un rôle crucial au cours du développement (Zhao *et al.*, 2001; Matherly *et al.*, 2007). Chez l'Homme, il est retrouvé majoritairement dans le foie et le placenta, mais également dans la moelle osseuse, les leucocytes, l'intestin, les poumons, les reins et le cerveau. Au niveau cérébral, il est notamment présent sur la surface apicale des plexus choroïdes et les cellules longeant le canal rachidien (Wang *et al.*, 2001; Whetstone *et al.*, 2002). Les travaux menés par Alam et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence une régulation de l'expression génique et protéique de RFC par le récepteur à la vitamine D (VDR) dans des capillaires cérébraux isolés de souris (Alam *et al.*, 2017, 2019).

Le récepteur PCFT, codé par le gène *Slc46a1*, est le dernier récepteur aux folates à avoir été identifié. Contrairement à RFC, il fonctionne en symport folate-proton et dans des conditions acides, à pH 5-5,5 (**Figure 11**). Il permet l'absorption intestinale des folates présents dans l'alimentation du fait de sa présence au niveau de la bordure en brosse de l'intestin. Structuralement parlant, PCFT est stéréospécifique pour la forme 5-formyl-THF de la vitamine B9, mais il est capable de lier les autres formes réduites ainsi que l'acide folique (Zhao et Goldman, 2007). Tout comme RFC, il est également capable d'internaliser des molécules ciblant les folates telles que l'aminoptérine, le méthotrexate, le pémétrexed, le pralatrexed, et le ralitrexed (Matherly *et al.*, 2007), bien que le pémétrexed ait été considéré comme le meilleur substrat pour ce transporteur (Zhao et Goldman, 2007). En effet, à pH 5,5, l'affinité de pémétrexed pour PCFT est plus élevée ( $K_M \sim 0,2$  à  $0,8 \mu M$ ) par rapport au méthotrexate ( $K_M = 3,4 \mu M$ ) dans les cellules de la lignée HepG2 transfectées (Zhao *et al.*, 2008a).

De plus, un traitement des cellules HEK293 ou des oocytes de *Xenopus Laevis* avec de nigéricine (ionophore échangeur de  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Pb^{2+}$ ) ou le FCCP (cyanure de carbonyle-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone) permet de réduire le transport lié à PCFT (Qiu *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2008). Chez l'Homme, PCFT est largement exprimé au niveau intestinal, principalement dans la bordure en brosse du duodénum et du jéjunum proximal, mais également au niveau des plexus choroïdes, du foie et des reins (Inoue *et al.*, 2008; Wollack *et al.*, 2008). On retrouve une expression plus modérée dans les ovaires, l'utérus, les testicules et l'épididyme. Son expression est régulée par le

facteur respiratoire nucléaire 1 (NRF-1), le VDR et des médicaments comme les inhibiteurs de pompes à protons, l'oméprazole ou le pantoprazole (Eloranta *et al.*, 2009; Gonen et Assaraf, 2010; Urquhart *et al.*, 2010). Une étude conduite dans un modèle murin a montré qu'une carence en folate augmente l'expression génique de PCFT au niveau de l'intestin grêle proximal (Qiu *et al.*, 2007) suggérant qu'il existe également un mécanisme d'auto-régulation de l'expression de PCFT par les folates.



**Figure 11 : Influx des folates dans les cellules médié par les transporteurs des folates.**

Le transport des folates est réalisé par 3 types de transporteurs (i) RFC qui fonctionne en antiport anionique à pH physiologique, (ii) PCFT qui permet l'internalisation de la B9 en symport avec un proton, et (iii) les récepteurs FR qui font entrer la B9 par endocytose dans la cellule. La B9, représentée par le rond rose (○), ainsi introduite dans la cellule, peut ensuite intégrer le métabolisme des monocarbone. Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

*Abréviations additionnelles* : A<sup>-</sup> : anions ; H<sup>+</sup> : proton ; EC : milieu extra-cellulaire ; IC : milieu intra-cellulaire ; RFC : *Reduced Folate Carrier* ; PCFT : *Proton-Coupled Folate Transporter* ; FR : *Folate Receptor*

#### 2.2.2.2. Les transporteurs FRs

Les FR, 3<sup>ème</sup> groupe de transporteurs des folates, n'appartiennent pas à la famille des transporteurs SLC (**Figure 11**). On distingue 3 isoformes homologues majoritaires : FR $\alpha$ , FR $\beta$  et FR $\gamma$ , respectivement codées par les gènes *Folr1*, *Folr2* et *Folr3*. Les formes FR $\alpha$  et FR $\beta$  sont présentes à la surface des cellules grâce à la présence d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) alors que FR $\gamma$  est une forme soluble. Cette famille de récepteurs reconnaît avec une forte affinité les formes réduites et conjuguées des folates, l'acide folique, ainsi que des antifolates (Elnakat et Ratnam, 2004). Les récepteurs FR $\alpha$  et FR $\beta$  introduisent les folates dans la cellule par un processus d'endocytose avec formation d'endosome. Le relargage des folates dans le cytoplasme cellulaire est possible par le phénomène de diffusion, mais il peut aussi être médié par PCFT. Dans les conditions physiologiques, c'est majoritairement la forme FR $\alpha$  qui est retrouvée sur la surface apicale des cellules épithéliales où son expression permettrait de protéger les tissus des agents cytotoxiques ciblant le métabolisme des folates (Weitman *et al.*, 1992). On la retrouve au niveau des tubules proximaux rénaux, de l'épithélium pigmentaire rétinien, des trompes de Fallope, de l'utérus, du placenta et des plexus choroïdes. Son expression est régulée par HNF4 $\alpha$  (Salbaum *et al.*, 2009). Pour ce qui est de la forme FR $\beta$ , elle est

principalement localisée au niveau des cellules hématopoïétiques et du placenta (Elnakat et Ratnam, 2004). De plus, ces récepteurs sont également retrouvés au niveau des testicules (Holm *et al.*, 1999), de la prostate (Holm *et al.*, 1993), et dans le sperme (Holm *et al.*, 1991), chez l'Homme. L'isoforme FR $\alpha$  est surexprimée dans différents cancers dont le choriocarcinome testiculaire (Ross *et al.*, 1994; Elnakat and Ratnam, 2006; Assaraf *et al.*, 2014).

### 2.2.2.3. Les transporteurs ABC

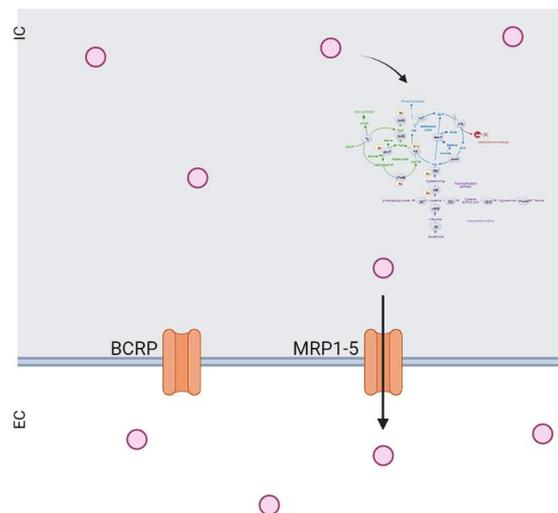
Les transporteurs ABC représentent plus de 50 protéines transmembranaires classées en 7 sous-familles notées de A à G. Pour fonctionner, ils ont besoin de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP afin d'assurer le transport de molécules à travers la membrane. Ils sont principalement connus pour leur rôle d'élimination des déchets toxiques et des médicaments, étant à l'origine de nombreuses résistances aux traitements médicamenteux. Les 3 sous-familles représentées au niveau des interfaces sang-cerveau sont : ABCB, ABCC et ABCG (Morris *et al.*, 2017).

La glycoprotéine-P (P-GP, aussi retrouvé sous le nom MDR1 (*Multidrug Resistance Protein 1*)) qui est codée par le gène *Abcb1*, possède 2 isoformes chez la souris et le rat, et une seule chez l'Homme. Chez les rongeurs, les gènes *Abcb1a* et *Abcb1b* sont exprimés de manière tissu-spécifique, ce qui leur confère des propriétés particulières de transport. MDR1a est l'isoforme la plus proche de celle de l'Homme et celle qui est principalement retrouvée au niveau de la BHE. Cependant, son niveau d'expression est plus faible dans les plexus choroïdes que dans les microvaisseaux cérébraux (Strazielle et Ghersi-Egea, 2015). La P-GP possède une grande diversité de substrats, dont plusieurs médicaments de différentes classes thérapeutiques comme la plupart des antitumoraux, les agents antidépresseurs et antipsychotiques, antirétroviraux, les immunosuppresseurs et certains antibiotiques (Amawi *et al.*, 2019). De plus, il existe un polymorphisme de type *single nucleotide polymorphism* (SNP) du gène *ABCB1* pouvant expliquer la différence observée en termes de toxicité lors d'un traitement avec du méthotrexate chez des patients. L'étude menée par Han et ses collaborateurs a pu mettre en évidence une importante influence des polymorphismes de *ABCB1* et *MTHFR* sur la toxicité hématopoïétique liée au traitement par le méthotrexate chez des patients atteints d'hémopathies malignes (Han *et al.*, 2021).

La protéine MRP1 (*Multidrug Resistance-associated Protein*) est codée par le gène *Abcc1*, premier transporteur à avoir été identifié dans la sous-famille des transporteurs ABCC (Cole *et al.*, 1992). Il s'agit d'un transporteur retrouvé de manière ubiquitaire dans les tissus, avec une prédominance dans les reins, la vessie et les surrénales, le placenta, la rate, les poumons et les testicules (Flens *et al.*, 1996; St-Pierre *et al.*, 2000; Chang, 2007), mais également au niveau des barrières sang-cerveau, sang-LCR et sang-testicule. Dans ces barrières, le transporteur MRP1 possède un rôle d'élimination des substances toxiques dans le but de protéger ces organes (i.e. cerveau et testicules) (Wijnholds *et al.*, 2000; Mercier *et al.*, 2004). Les transporteurs MRP2 et MRP4 permettent également l'élimination de xénobiotiques *via* la BHE. Il existe plusieurs polymorphismes du gène *Abcc1*, majoritairement des SNP, mais il est possible de retrouver des insertions, des délétions et des répétitions au niveau génique. Ces polymorphismes entraînent des modifications de réponse aux traitements anticancéreux. En effet,

MRP1 possède un large variété de substrats : on retrouve des molécules anticancéreuses, comme le méthotrexate, ou anti-VIH (virus de l'immunodéficience humaine), mais également des anions conjugués organiques comme le glutathion et la vitamine B9 sous la forme d'acide folique (**Figure 12**), ou encore le DHEAS et l'estrone-3-sulfate (transporté conjointement au GSH) (Yin and Zhang, 2011; Grube *et al.*, 2018).

Tout comme MRP1 et MRP3, MRP2 et MRP4 participent à l'élimination du méthotrexate et d'autres médicaments, et peuvent donc jouer un rôle dans les mécanismes de neuroprotection au niveau de la BHE et des plexus choroïdes (Rao *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; Leggas *et al.*, 2004). Le transporteur MRP4 possède également des substrats endogènes tel que le DHEAS. Son expression a été retrouvée dans les cellules gliales, dont les astrocytes qui sont eux-mêmes régulés par la progestérone et le DHEA (Grube *et al.*, 2018). Les hormones stéroïdes sont également transportées par MRP8 (codé par le gène *Abcc11*) au niveau du cerveau. Il a été montré que ce transporteur est capable de transférer le DHEAS et l'estrone-3-sulfate dans des vésicules membranaires isolées. Sa localisation préférentielle au niveau des axones engendre l'implication de MRP8 dans l'efflux présynaptique des hormones stéroïdes, et donc dans la modulation de l'expression des récepteurs post-synaptiques (Grube *et al.*, 2018). Concernant les folates, ils peuvent être mobilisés à partir du foie avant d'être exportés à travers la membrane du canal biliaire par l'intermédiaire de MRP2 et BCRP, vers l'intestin afin d'être à nouveau disponibles pour, soit les mécanismes de réabsorption du cycle entéro-hépatique, soit un transport par les MRP dans la circulation systémique (Zhao *et al.*, 2017). Une étude a mis en évidence que le statut en folates des cellules affecte le transport des molécules par MRP1 (Hooijberg *et al.*, 2004).



**Figure 12 : Efflux cellulaire des folates par les transporteurs ABC.**

Le transport des folates (○) du compartiment intracellulaire à l'extérieur des cellules est réalisé par les transporteurs ABC. Parmi cette superfamille, on retrouve notamment BCRP (codé par le gène *Abcg2*) et les MRP (codés par les gènes *Abcc1-5*). Illustration réalisée avec le site internet BioRender.com.

*Abréviations additionnelles* : EC : milieu extra-cellulaire ; IC : milieu intra-cellulaire ; BCRP : *Breast Cancer Related Protein* ; MRP : *Multidrug Resistance-associated Protein*

Enfin, les transporteurs de la sous-famille ABCG sont sous forme de monomères et doivent se dimériser pour acquérir l'activité de transport de molécules. Chez le rat, il a été montré que leur expression est très élevée dès la naissance et est maintenue jusqu'à l'âge adulte (Gherzi-Egea *et al.*, 2018). Tout comme MRP1, BCRP est capable de transporter une grande variété de molécules anticancéreuses (dont des anthracyclines comme la doxorubicine, et des antifolates comme le méthotrexate) mais également des composés toxiques présents dans l'alimentation (comme des porphyrines) (Assaraf, 2006). Des auteurs ont également montré qu'une surexpression de BCRP dans des cellules cancéreuses est corrélée à une résistance au méthotrexate (Volk *et al.*, 2002). En plus de ces composés, BCRP est également capable de transporter des formes réduites de la vitamine B9 dont les formes THF, MeTHF et le méthylène-THF (Kusuhara *et al.*, 1998), et des stéroïdes sulfatés comme le DHEAS, l'estrone-3-sulfate, ou encore la dihydrotestostérone (DHT) (Grube *et al.*, 2018). De plus, les travaux de Ifergan et ses collaborateurs ont montré qu'une déficience en folates entraîne la perte d'expression des protéines MRP1 et BCRP chez des patientes atteintes du cancer du sein (Ifergan *et al.*, 2004). A l'inverse, d'autres auteurs ont reporté une augmentation de l'expression de BCRP en condition de carence en vitamine B9 dans des cellules d'adénocarcinome colorectal (Lemos *et al.*, 2008).

### 2.3. Conséquence d'une altération de l'homéostasie intracérébrale en folate

L'homéostasie en folates dans le cerveau joue un rôle essentiel au cours du développement cérébral et une diminution de son contenu peut être à l'origine de l'apparition de pathologies neurologiques. Son maintien nécessite un environnement stable et contrôlé, passant par le bon fonctionnement et l'intégrité des barrières sang-cerveau présentées ci-dessus.

Le métabolisme des monocarbones joue un rôle clé au niveau du SNC. Pour exemple, l'Hcy agit comme un inhibiteur des pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase dans différentes régions cérébrales comme le cortex ou encore l'hippocampe (Kozyraki et Cases, 2013). Cette inhibition peut être à l'origine d'une altération du potentiel membranaire, ayant pour conséquence un dysfonctionnement des cellules neuronales. Lors d'une carence en vitamines B9/B12 qui engendre une hyperhomocystéinémie, on peut retrouver une accumulation d'Hcy dans les tissus qui peut se lier aux protéines. Ce phénomène appelé l'homocystéinylation, est responsable d'une importante cytotoxicité résultant de l'activation des processus cellulaires de réponse aux protéines non ou mal repliées, *via* un stress du réticulum endoplasmique (Finkelstein et Martin, 2000).

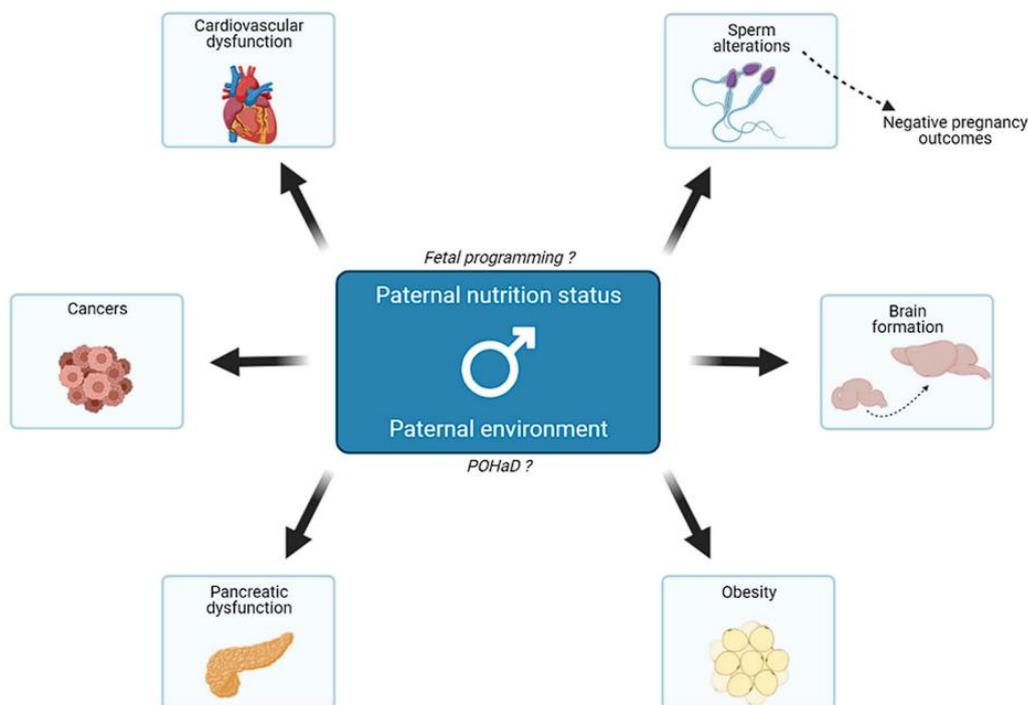
En dehors des déficiences ou carences liées à un défaut d'apport alimentaire, il existe des mutations génétiques impactant le transport des folates. La mutation la plus représentative des conséquences d'un déficit systémique en folates est celle concernant le récepteur PCFT. Pour rappel, ce transporteur est principalement retrouvé au niveau de l'intestin et des plexus choroïdes. Cette mutation est autosomale récessive et est responsable, entre autres, de retards de croissance, d'une malabsorption des folates et d'une susceptibilité accrue aux infections. Les signes cliniques correspondant aux atteintes du SNC correspondent à l'irritabilité, une hypotonie, l'ataxie ou encore la

dyskinésie. Elle peut également être à l'origine d'une déficience intellectuelle, de crises d'épilepsie et de neuropathies périphériques (Ramaekers et Quadros, 2022).

En 2004, Vincent Ramaekers et son équipe ont introduit le concept de déficience cérébrale en folates ou CFD (*Cerebral Folate Deficiency*). Cette notion intègre toutes les pathologies neurodéveloppementales et neuropsychiatriques qui se caractérisent par une très faible concentration en MeTHF dans le LCR alors que les niveaux d'Hcy, B12 et B9 sont normaux au niveau circulant (Ramaekers et Blau, 2007). D'après la littérature, il existe 5 grands mécanismes potentiellement responsables de cette déficience : (1) Réduction du transport des folates à travers les interfaces sang-cerveau ; (2) Réduction du stockage et de la libération des folates ; (3) Augmentation de l'utilisation et de la consommation de folates réduits par le SNC ; (4) Augmentation du catabolisme des folates réduits au sein du SNC ; et (5) Conditions métaboliques affectant le métabolisme des folates au sein du SNC (Ramaekers et Quadros, 2022).

### 3. CONSÉQUENCES DES CARENCES EN FOLATES D'ORIGINE PATERNELLE

Les effets des carences gestationnelles en donneurs de méthyle sont largement décrits, et ont conduit aux recommandations de supplémentation maternelle en période périconceptionnelle. Pendant des années, le père a été limité à son rôle de transmission de matériel génétique *via* le sperme. Récemment, des publications ont pu mettre en évidence que tout comme pour les mères, le statut nutritionnel des pères peut impacter la progéniture, conduisant au développement de pathologies à l'âge adulte (Dimofski *et al.*, 2021 (**Annexe 1**)). Il existe des données concernant les régimes déficients en protéines, en vitamines ou restrictifs (comme le jeûne intermittent ou la restriction calorique) mais également sur des régimes enrichis en lipides et sucres. De manière générale, quel que soit le régime du père, toute modification des apports nutritionnels peut engendrer (i) des troubles de la grossesse potentiellement liés à des altérations du sperme, (ii) des désordres métaboliques (pouvant aboutir à l'obésité ou des dysfonctionnements pancréatiques), (iii) le développement de pathologies cardiaques ou de cancers, mais cela peut également altérer le développement cérébral (**Figure 13**).



**Figure 13 : Conséquences des altérations de l'alimentation des pères sur leur progéniture.**

Le statut nutritionnel des pères peut impacter la croissance et le métabolisme de la descendance, et donc leur prédisposition à différentes pathologies à l'âge adulte. Cela est lié à l'hypothèse de la programmation fœtale, car les pères agissent indirectement sur la croissance du fœtus. En outre, à l'instar de la théorie DOHaD (*Developmental Origin of Health and Disease*), le paradigme POHaD suggère que l'environnement paternel pourrait également influencer les changements métaboliques de la progéniture. Les mécanismes sous-jacents à tous ces événements sont mal compris, mais de nouvelles données suggèrent qu'ils pourraient être transmis par l'épigénome des spermatozoïdes (issu de Dimofski *et al.*, 2021).

### 3.1. Influence du régime riche en lipides sur la descendance

Un régime paternel riche en lipides (HFD) pourrait conduire à des désordres métaboliques et l'obésité chez l'Homme (Power, 2003; Kasturi *et al.*, 2008; Portha *et al.*, 2019). Dans les modèles animaux, ce régime est connu pour induire une réduction transgénérationnelle du poids corporel chez les rats à J3 (de Castro Barbosa *et al.*, 2016), mais une augmentation pour les descendants plus âgés chez les souris (Binder *et al.*, 2012a; Chowdhury *et al.*, 2016; Grandjean *et al.*, 2016; Masuyama *et al.*, 2016) avec une masse grasse corporelle plus élevée (Ghanayem *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2016; Masuyama *et al.*, 2016). Les pères nourris avec une alimentation riche en lipides peuvent transmettre aux femelles de la génération F1 un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  du pancréas et une intolérance au glucose (Ng *et al.*, 2010), ainsi qu'une réponse altérée à l'insuline chez la progéniture mâle (Grandjean *et al.*, 2016).

D'autres études sur le tissu adipeux blanc rétro-péritonéal montrent que de nombreuses voies métaboliques sont affectées dans la descendance, telles que la réponse cellulaire et mitochondriale au stress, la survie et la mort cellulaire, la signalisation de la télomérase, la croissance et la prolifération cellulaires, et le cycle cellulaire (Ng *et al.*, 2014). La consommation paternelle de HFD donne des signatures génétiques liées aux maladies dégénératives chroniques et au vieillissement précoce, à la fois dans les cellules  $\beta$  du pancréas et dans le tissu adipeux blanc rétro-péritonéal de leur progéniture

(Ng *et al.*, 2010, 2014). L'exposition paternelle au HFD peut entraîner un risque accru de maladie rénale chronique (Chowdhury *et al.*, 2016) et le développement d'un phénomène similaire au syndrome métabolique (Masuyama *et al.*, 2016). En outre, Zhou et ses collaborateurs rapportent que l'hyperphagie paternelle entraîne des déficiences cognitives chez la descendance F1, mais pas chez la génération F2 chez les souris. Ces déficiences sont liées à une diminution de la neurogenèse hippocampique potentiellement due à une hyperméthylation du promoteur du gène *Bdnf* (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) transmise par les spermatozoïdes des pères (Zhou *et al.*, 2018).

Lorsque les pères sont nourris avec une alimentation riche en lipides, il en résulte, pour les femelles avec qui l'accouplement se fait, un nombre réduit de bouchons et de grossesses, peut-être en raison de la diminution de 20% de la mobilité des spermatozoïdes (Ghanayem *et al.*, 2010). La fécondation *in vitro* réalisée avec des spermatozoïdes de pères nourris avec un HFD montre un retard dans le développement préimplantatoire des embryons et une fréquence réduite de formation des blastocystes, ainsi qu'une moindre capacité des embryons à s'implanter dans la paroi utérine. Les processus biologiques des blastocystes sont également concernés : des modifications du métabolisme glucidique avec une augmentation de la voie de la glycolyse et de l'absorption du pyruvate, et une réduction du potentiel membranaire mitochondrial sont rencontrées (Binder *et al.*, 2012a, b).

D'autres études ont montré que ce régime chez le père pouvait également affecter le déroulement de la grossesse, tels qu'un taux réduit de grossesse arrivant à terme, des poids placentaires et fœtaux faibles, et un retard morphologique, tel qu'une croissance retardée des membres (Binder *et al.*, 2012a, b). Ces données suggèrent que le régime HFD paternel a un impact négatif sur la physiologie de l'embryon et son état de santé à l'âge adulte chez les rongeurs.

### 3.2. Impacts d'une alimentation paternelle riche en sucres

Comme le régime pauvre en protéines (LPD) ou HFD, une alimentation paternelle riche en sucre a des effets néfastes sur la progéniture. Le régime riche en sucres est un problème de santé publique puisqu'il possède un impact délétère sur la physiologie humaine (Lin *et al.*, 2013; Bjornstad *et al.*, 2019). L'apport excessif de sucres tels que le glucose ou le fructose, est étroitement lié au risque de maladies cardiovasculaires et métaboliques. Le fructose est actuellement ajouté aux aliments industrialisés (Choo *et al.*, 2018), et sa surconsommation induit une augmentation de la concentration hépatique en triacylglycérol, une hypercholestérolémie, une hypertriglycémie, et une altération du métabolisme du glucose avec une hyperinsulinémie chez les mères comme chez les pères (Carapeto *et al.*, 2018; Ornellas *et al.*, 2020). Par conséquent, si la mère ou le père seul, ou les deux, sont soumis à un régime riche en fructose, on observe chez leur progéniture une diminution de la concentration d'adiponectine, mais une augmentation de la concentration en leptine, ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle, de l'uricémie et une accumulation de graisse génitale (Carapeto *et al.*, 2018; Ornellas *et al.*, 2020). Lorsque les parents sont tous deux soumis à un régime riche en fructose, les effets sur le métabolisme hépatique de la progéniture sont plus graves et s'accompagnent d'une augmentation des marqueurs inflammatoires (Ornellas *et al.*, 2017; Carapeto *et al.*, 2018).

Une autre étude chez la drosophile montre qu'un régime paternel riche en sucres pourrait être lié à une altération de l'homéostasie énergétique chez la progéniture. Cependant, cela n'a pas affecté la croissance et le développement de la progéniture, mais a reprogrammé leur métabolisme de manière stable (Öst *et al.*, 2014; Emborski et Mikheyev, 2019; Teltumbade *et al.*, 2020). L'étude menée par Nätt et ses collaborateurs montre que le contenu en ARN des spermatozoïdes change rapidement en réponse à un régime riche en sucres chez l'Homme. Ils ont utilisé une stratégie en deux étapes dans laquelle chaque participant était son propre témoin. Dans cette étude, ils ont rapporté que le nombre de spermatozoïdes n'était pas affecté, mais que certains fragments d'ARNt (tRFs) étaient régulés à la hausse en réponse à un régime riche en sucres. Ils ont ensuite comparé ces résultats à ceux d'hommes obèses qui présentaient également une altération de la teneur en tRFs de leurs spermatozoïdes (Nätt *et al.*, 2019).

Un régime riche en sucres, combiné avec un régime riche en graisses, entraîne un dysfonctionnement du système reproducteur avec une descente testiculaire plus précoce dans la génération F1 (Oshio *et al.*, 2020). Ce régime hypercalorique est également connu pour augmenter la masse grasse chez les rats (Chambers *et al.*, 2016; Oshio *et al.*, 2020) et les souris (Fullston *et al.*, 2012, 2013).

Ces études antérieures suggèrent qu'un régime riche en sucres ou hypercalorique pourrait affecter à la fois le métabolisme de la progéniture et les paramètres de reproduction.

### 3.3. Impact du régime pauvre en protéines du père sur la descendance

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique, et est influencée par une prédisposition génétique et/ou une hérédité épigénétique et des effets transgénérationnels (Pigeyre *et al.*, 2016; Reddon *et al.*, 2016). Par exemple, la teneur en protéines du régime alimentaire paternel influence le métabolisme de la progéniture. Chez la souris, lorsque les pères sont nourris avec un régime LPD, la descendance présente une plus grande vulnérabilité vis-à-vis de différentes pathologies comme l'intolérance au glucose, le stress et l'anxiété, les dysfonctionnements métaboliques et cardiovasculaires, l'altération du développement du squelette et l'altération du dépôt minéral osseux (Carone *et al.*, 2010; Watkins et Sinclair, 2014; Watkins *et al.*, 2017, 2018). En outre, le poids corporel de la descendance mâle des pères nourris avec un régime LPD est plus élevé (Watkins et Sinclair, 2014), tandis que celui des femelles est plus faible par rapport au groupe témoin (da Cruz *et al.*, 2018). Une altération de la fonction vasculaire de la progéniture a également été montrée (Morgan *et al.*, 2020), tout comme un risque accru de cancer du sein chez la descendance féminine (da Cruz *et al.*, 2018). L'expression des gènes de la progéniture est modifiée, en particulier les gènes impliqués dans les voies de synthèse du cholestérol et des lipides (Carone *et al.*, 2010; Ly *et al.*, 2019). Elle affecte aussi négativement l'expression génétique de diverses voies de l'AMPK dans les blastocystes, mais positivement les gènes régulant la croissance fœtale, avec une régulation à la hausse (i) des gènes codant pour des transporteurs de nutriments dans le placenta et (ii) des gènes soumis à empreinte parentale impliqués dans la régulation de la croissance fœtale (da Cruz *et al.*, 2018; Watkins *et al.*, 2018). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que le régime LPD paternel pourrait avoir un effet

néfaste sur la progéniture, potentiellement sexe-dépendant, les femmes étant légèrement plus affectées que les hommes.

### 3.4. Régime restrictif chez le père : que savons-nous ?

Depuis l'épisode de la famine hollandaise, d'autres études ont montré qu'une alimentation maternelle déséquilibrée au moment de la conception a des conséquences néfastes, sur la santé mentale et physique de l'enfant. La plupart des études se sont concentrées sur les effets à l'âge adulte, en tenant compte de la durée d'exposition et du développement des tissus ou des organes, le début de la de gestation étant la période la plus vulnérable. La progéniture des personnes soumises à la famine présente un risque accru de diabète de type 2, de maladies cardiaques, de dépression et de schizophrénie, ainsi qu'un vieillissement prématuré. Des effets similaires semblent se produire dans les populations africaines sous-alimentées (Roseboom *et al.*, 2011). Cependant, la plupart de ces données concernent l'exposition de la mère à la dénutrition, et il existe peu d'études concernant le jeûne du père.

Lorsque les pères suivent un régime restrictif, les descendants présentent une diminution de la glycémie et une augmentation du niveau de corticostérone sérique, mais il y a également des changements dans la concentration sérique en IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*) (Anderson *et al.*, 2006). En utilisant un régime restrictif diminué de 70% par rapport à un régime classique, McPherson et ses collaborateurs ont rapporté que la restriction alimentaire paternelle nuit au développement préimplantatoire de l'embryon, à la méthylation globale et à la fonction des spermatozoïdes, ce qui pourrait entraîner des conséquences sur la fertilité de ces derniers. Cette restriction calorique a également eu pour conséquence une réduction du poids postnatal et un retard de croissance, ainsi qu'une augmentation de la prévalence de la dyslipidémie et de l'adiposité chez la progéniture (McPherson *et al.*, 2016). Une étude sur *Caenorhabditis elegans* a également montré que la restriction alimentaire paternelle affecte la teneur en graisse des descendants mâles et femelles (Miersch et Döring, 2012).

McPherson et ses collaborateurs ont également étudié la supplémentation en antioxydants et en vitamines du père (vitamines B9, C, E, lycopène, sélénium, zinc et extrait de thé vert) et ont montré que le statut oxydatif du sperme était corrélé à la croissance de la progéniture. La supplémentation des pères soumis à une restriction alimentaire a inversé les effets sur l'adiposité et le poids de la progéniture. La restriction alimentaire a affecté l'expression des gènes de manière spécifique au sexe de la progéniture et a été partiellement inversée par une supplémentation en antioxydants et en vitamines (McPherson *et al.*, 2016).

Des études menées chez l'Homme (Corley *et al.*, 2018) et les rongeurs (Baumeier *et al.*, 2015; Marinho *et al.*, 2019) montrent que la restriction alimentaire a également un impact positif sur la glycémie, la sensibilité à l'insuline, l'adiposité et le risque de diabète de type 2. En ce qui concerne les effets au niveau cellulaire, de nombreuses études soulignent l'implication des mécanismes de réparation de l'ADN, de l'autophagie, des voies de signalisation de la réponse adaptative au stress cellulaire, de la santé mitochondriale, de la régénération des cellules souches et des effets métaboliques à long terme, dans les mécanismes liés au jeûne intermittent (Mattson *et al.*, 2017).

Une autre étude réalisée sur des embryons de souris suggère que les mères pourraient moduler les effets de la restriction calorique paternelle sur le développement de leur progéniture. Les auteurs ont observé l'absence ou l'inversion des effets sur la progéniture entre le transfert d'embryon et l'accouplement naturel (Mashoodh *et al.*, 2018). En outre, les changements alimentaires du père avant la conception pourraient avoir un impact sur le comportement de la progéniture, puisqu'un comportement de type anxiolytique a été décrit à l'âge adulte (Govic *et al.*, 2016).

### 3.5. Apports en folates chez les pères et effets sur la progéniture

Plusieurs études ont montré qu'en plus des carences gestationnelles en donneurs de méthyle, les carences d'origine paternelle entraînent également des effets délétères chez la progéniture. Certains travaux sur des modèles murins ont mis en évidence que ce type de déficit chez le père induit une susceptibilité plus grande au développement de traits dépressifs et anxieux (McCoy *et al.*, 2018), peut conduire à des désordres au cours de la grossesse (Kim *et al.*, 2011; Lambrot *et al.*, 2013) et au cours du développement (Lambrot *et al.*, 2013), comme une réduction du taux de grossesse, des placentas anormaux, des malformations crânio-faciales ou encore des retards de développement osseux et musculaire.

De plus, ce déficit nutritionnel du père est responsable d'un délai d'apparition de la méiose à J12 et d'altérations de l'épigénome du sperme (Lambrot *et al.*, 2013). Les effets sur la spermatogenèse et le sperme restent controversés. En effet, les travaux de Lambrot et ses collaborateurs n'ont montré aucune variation significative en ce qui concerne la spermatogenèse, le nombre de spermatozoïdes ou encore la morphologie du testicule (Lambrot *et al.*, 2013), alors que d'autres auteurs ont observé des altérations de la spermatogenèse et une diminution du nombre de spermatozoïdes (Swayne *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2017). D'autres études menées chez les rongeurs ont montré que la carence paternelle en folates avait un impact sur le transport placentaire des folates (Kim *et al.*, 2011), sur la méthylation et/ou la mutation de l'ADN (Swayne *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Mejos *et al.*, 2013; Tomizawa *et al.*, 2015) et sur le niveau d'expression d'IGF-2 dans le cerveau du fœtus (Kim *et al.*, 2013; Mejos *et al.*, 2013).

Quelques rares études chez l'Homme ont pu mettre en évidence un réel impact du statut paternel en folate sur la reproduction, notamment sur la durée de gestation (Ly *et al.*, 2017). De plus, les mutations des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des folates, comme MTHFR, ont un impact sur la fertilité masculine (Liu *et al.*, 2015).

Outre les données sur les carences, les supplémentations en B9 chez le père sont également à l'origine d'anomalies embryonnaires et d'une diminution du nombre de spermatozoïdes chez la descendance à J200. Au moment du sevrage, la supplémentation de la génération F1 induit une diminution de la taille des portées F2 et augmente la mortalité postnatale, de la même manière qu'une carence paternelle (Ly *et al.*, 2017). De plus, cette supplémentation altère également des fonctions neurales et cognitives, spécifiquement l'apprentissage et la mémoire hippocampo-dépendante, ainsi que la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Ryan *et al.*, 2018). Des études sur les poulets ont montré que la supplémentation paternelle en acide folique pouvait avoir un impact sur l'expression des ARNm dans les spermatozoïdes (Wu *et al.*, 2019a), et induire des changements métaboliques

transgénérationnels (Wu *et al.*, 2019b). En résumé, il semble que les régimes déficients en folates ainsi que les régimes supplémentés puissent avoir un impact intergénérationnel sur la progéniture (Roseboom *et al.*, 2011).

Actuellement, il n'existe aucune recommandation de supplémentation des pères en période de conception, bien que les recommandations nutritionnelles d'apport en folates soient identiques à celles des femmes (de 18 ans ou plus) (**Annexe 4**).

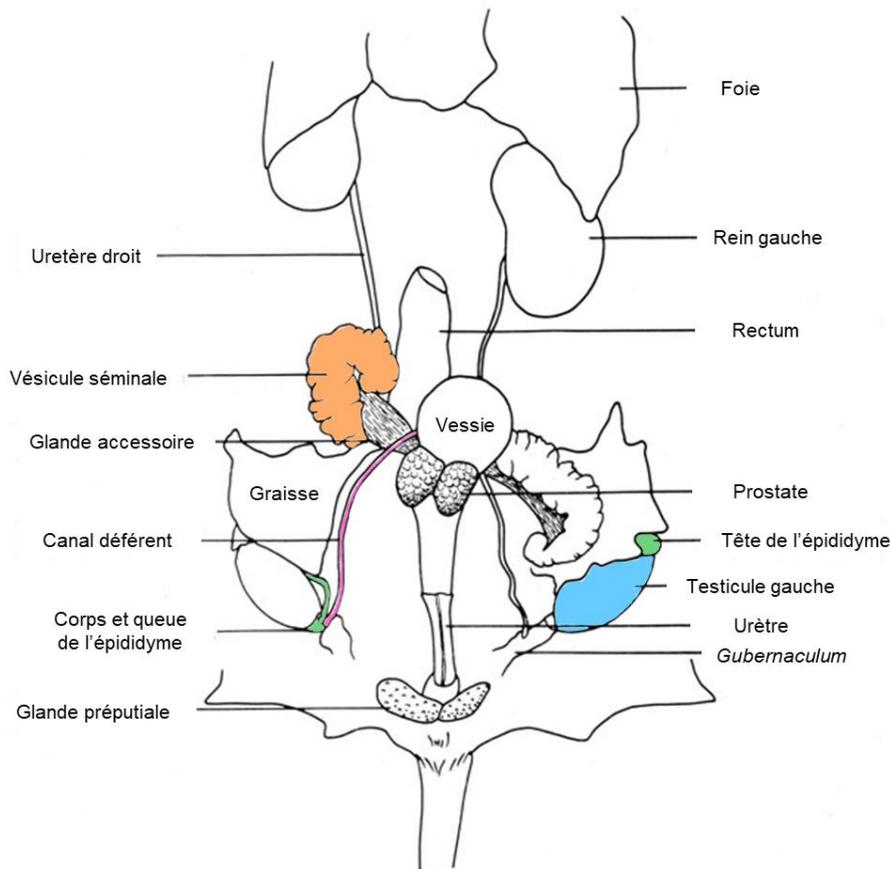
#### **4. FORMATION DES SPERMATOZOÏDES ET MECANISMES DE TRANSMISSION VIA LE SPERME**

##### 4.1. Description des organes et cellules nécessaires à la production des spermatozoïdes

###### 4.1.1. Constitution de l'appareil génital mâle

Le tractus génital mâle est composé des cordons spermatiques, des testicules et du scrotum, des épидидymes qui se poursuivent avec les canaux déférents (ou spermiductes), des vésicules séminales, de la prostate, des canaux éjaculateurs, de l'urètre et du pénis (**Figure 14**).

Les testicules sont responsables de la production de testostérone et des gamètes mâles. Les épидидymes font le lien entre les testicules et les canaux déférents, et, chez le rat, stockent le plus grand volume de spermatozoïdes à 12 mois d'âge (Guo *et al.*, 2019). Les vésicules séminales sont à l'origine de la production de 50 à 70% du sperme chez l'Homme.



**Figure 14 : Vue antérieure de l'appareil génital masculin chez les rongeurs.**

L'appareil reproducteur masculin comprend différents organes. On y retrouve les testicules, responsables de la production de testostérone et des spermatozoïdes ; les épидидymes qui font le lien entre les testicules et les canaux déférents ; les vésicules séminales qui sont à l'origine de la production de 50 à 70% du sperme chez l'Homme. Illustration adaptée depuis le livre « *The anatomy of the laboratory mouse* » de Margaret Cook.

Les testicules présentent plusieurs types cellulaires : les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli, ainsi que les différents progéniteurs responsables de la production des gamètes matures. Chaque type cellulaire possède un rôle prépondérant dans la production, le maintien et/ou l'intégrité du matériel génétique qui sera transmis *via* les spermatozoïdes à la descendance.

Les cellules de Leydig qui seront présentes à l'âge adulte sont formées après la naissance et produisent la testostérone responsable de la spermatogenèse et du maintien des fonctions reproductives mâles. Elles sont capables de réaliser une régénération complète en 7 semaines chez le rat (Chen *et al.*, 2009). La différenciation des cellules de Leydig adultes est sous la dépendance de facteurs sécrétés par les cellules de Sertoli. Ces facteurs (*Desert Hedgehog* (DHH) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes-A (PDGFA)) vont pouvoir se fixer sur les cellules de Leydig qui expriment les récepteurs correspondants (PTC1 pour DHH et PDGFRA pour PDGFA). Cette différenciation des cellules de Leydig est également sous la régulation de la LH et de l'ostéocalcine (Tremblay, 2015).

Chez les mammifères, le développement testiculaire nécessite la différenciation des cellules de Sertoli qui se fait entre les 11,5<sup>ème</sup> et le 12,5<sup>ème</sup> jour de gestation chez la souris (Karl et Capel, 1998). Les cellules de Sertoli régulent le développement et la fonction testiculaire. Ces cellules servent de

support structural et nutritionnel aux cellules germinales (Griswold, 1998), sécrètent plusieurs hormones dont l'activine, l'inhibine, l'*androgen binding protein* (ABP) ou encore le 17 $\beta$ -œstradiol ; et phagocytent les débris présents lors de la spermatogenèse (Barrionuevo *et al.*, 2011). De plus, ces cellules expriment fortement le récepteur aux androgènes (AR) ce qui permet la différenciation des spermatocytes après fixation de la testostérone (Chakraborty *et al.*, 2014). Enfin, le testicule possède un « privilège immun », au même titre que le cerveau, les yeux ou encore l'utérus lors de la grossesse (Barker et Billingham, 1977). Ce statut est assuré en majeure partie par les cellules de Sertoli qui servent de « rempart » entre les cellules immunitaires et germinales, et permettent de moduler la réaction immunitaire par l'expression de différents facteurs immunomodulateurs (Kaur *et al.*, 2014).

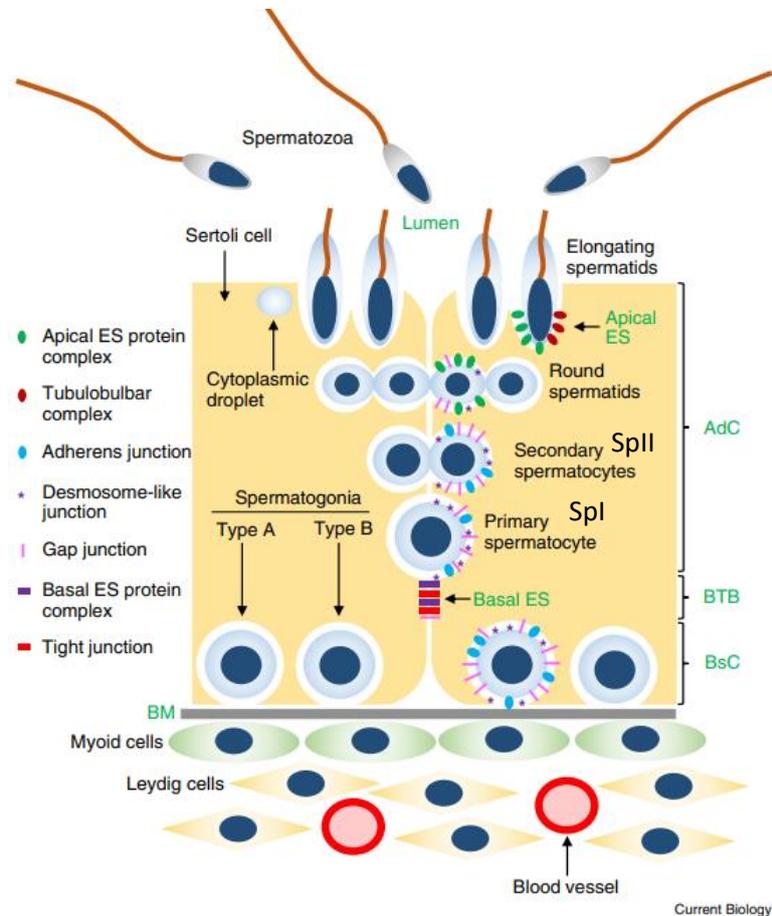
#### 4.1.2. Formation et maturation des spermatozoïdes

Les cellules de Sertoli composent la partie somatique de l'épithélium germinatif (ou épithélium séminifère) du testicule. Elles entourent les cellules germinales durant toute la spermatogenèse (Griswold, 1998). Les spermatogonies sont classées en 2 catégories : (i) type A qui vont se différencier en (ii) type B. Ces 2 types cellulaires, ainsi que les cellules de Sertoli, adhèrent à la membrane basale (BM). Les spermatogonies de type B sont à l'origine des spermatocytes primaires (SpI) qui réalisent ensuite une méiose de phase I afin de produire les spermatocytes secondaires (SpII). Cette division permet de passer d'une cellule tétraploïde à 2 cellules diploïdes. Les cellules SpII entrent en méiose de phase II afin de produire, chacune, 2 spermatides haploïdes, qui eux-mêmes vont se transformer en spermatozoïdes au cours de la spermiogenèse.

Le passage des spermatogonies A aux spermatozoïdes se fait vers la lumière du tubule afin de libérer les spermatozoïdes (**Figure 15** ; Griswold, 2016; Nishimura et L'Hernault, 2017). La dernière étape de la spermatogenèse correspond à la spermiogenèse, et se fait sous le contrôle de la testostérone (Griswold, 2016). Ce processus implique une condensation et un allongement du noyau, la formation de l'anneau ainsi que la biogenèse de l'acrosome. Cet organe dérive de l'appareil de Golgi et est impliqué dans les interactions avec l'ovule lors de la fécondation. La spermiogenèse aboutit à la libération des spermatozoïdes matures dans la lumière, ce qui correspond au stade final de la spermatogenèse : la spermiation, également sous le contrôle de l'acide rétinoïque (Griswold, 2016; Nishimura et L'Hernault, 2017). Enfin, au moment de la fécondation, il y a un développement de la membrane du spermatozoïde qui va fusionner avec l'acrosome afin de devenir fécondant, c'est le phénomène de capacitation. Sans ce processus physiologique, il ne peut y avoir fécondation (Jan *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces transformations se fait sous un contrôle moléculaire bien défini (Jan *et al.*, 2012) puisque les cellules germinales sont connectées aux cellules de Sertoli environnantes par des jonctions intercellulaires et complexes protéiques uniques qui offriraient la possibilité aux cellules germinales de transférer l'excès de cytoplasme aux cellules de Sertoli au cours de la spermatogenèse. Depuis 1925, il est connu que la vitamine A (sous forme d'acide rétinoïque) est essentielle pour la spermatogenèse, la régulation de la BHT, et la spermiation (Griswold, 2016). La condensation du noyau lors de la spermiogenèse est un processus nécessitant le remplacement des histones présentes par

des protamines (petites protéines nucléaires). Le phénomène inverse est réalisé lors de la fécondation, une fois que le spermatozoïde a pénétré l'ovule, ce qui permet la formation des pronucléi. Cette condensation permet de protéger le matériel génétique du spermatozoïde. Il s'agit d'un mécanisme complexe, avec des phénomènes épigénétiques pouvant modifier ce dernier et potentiellement être transmis à la descendance (*voir paragraphe 4.3*) (Kimmins et Sassone-Corsi, 2005; Meyer *et al.*, 2017; Hao *et al.*, 2019).



**Figure 15 : Déroulé de la spermatogenèse.**

La spermatogenèse est réalisée dans les milliers de tubules séminifères dans chaque testicule, et permet de passer de cellules diploïdes à des gamètes haploïdes. Les cellules souches germinales mâles (spermatogonies) sont de 2 types : A qui se différencie en B. Ces cellules souches sont en contact avec la membrane basale (BM). Les spermatogonies de type B se différencient en spermatocytes primaires (Spl) puis secondaires (SpII). Les SpII se différencient ensuite en spermatides au pôle apical (AdC) puis en spermatozoïdes par le processus de spermiogenèse. Les jonctions cellulaires et complexes protéiques présents entre 2 cellules de Sertoli adjacentes (Basal ES) permet la formation de la barrière hémato-testiculaire (BHT) (issu de Nishimura et L'Hernault, 2017).

*Abréviations additionnelles* : BsC : compartiment basal ; ES : spécialisations ectoplasmiques.

#### 4.1.3. La barrière hémato-testiculaire

A l'âge adulte, les cellules de Sertoli forment entre elles des jonctions spécialisées proches de la lame basale des tubules séminifères, formant ainsi la BHT. Il s'agit d'une barrière étanche, comparable à la BHE, bloquant le passage paracellulaire de molécules et donnant un privilège immun aux cellules germinales (Skinner, 1987; Chakraborty *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2014). Structuellement parlant, la BHT compartimente l'épithélium germinatif en 2 avec une partie basale et une partie apicale.

Les spermatogonies sont localisées dans le compartiment basal et, lors de l'entrée en méiose, les cellules de Sertoli activent le transport des spermatocytes formés vers le compartiment apical, d'où les spermatozoïdes matures sont relâchés dans la lumière du tubule. L'épithélium séminifère est la seule barrière existante régulièrement traversée par un autre type cellulaire. Cette migration baso-apicale des cellules germinales nécessite un système de jonctions dynamique et complexe (Cheng et Mruk, 2002; Barrionuevo *et al.*, 2011), l'ensemble étant renouvelé en 8,6 jours chez la souris (Smith et Braun, 2012).

Durant toute la spermatogenèse, les jonctions cellulaires sont remodelées. Parmi les protéines formant ces complexes, on retrouve principalement les protéines ZO (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) et les Cldn (essentiellement 3, 5 et 11). Parmi les Cldn exprimées, la Cldn11 est exprimée de manière constitutive alors que les Cldn3 et Cldn5 le sont de manière spécifique à chaque stade de développement des spermatozoïdes. Il a été montré dans un modèle de souris, qu'une absence d'expression de la Cldn11 entraîne une altération de la spermatogenèse et donc de la fertilité des animaux (Gow *et al.*, 1999). De plus, l'absence totale d'expression de la Cldn5, de même qu'une mutation dans les gènes codants pour ZO-1 et ZO-2, sont létaux en période postnatale et embryonnaire, respectivement (Nitta *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009). L'étude réalisée par Chakraborty et ses collaborateurs a permis de mettre en évidence dans un modèle murin *knockout* pour la Cldn3 que les animaux présentent une spermatogenèse continue et restent fertiles. Les jonctions cellulaires au niveau de la BHT restent également fonctionnelles (Chakraborty *et al.*, 2014).

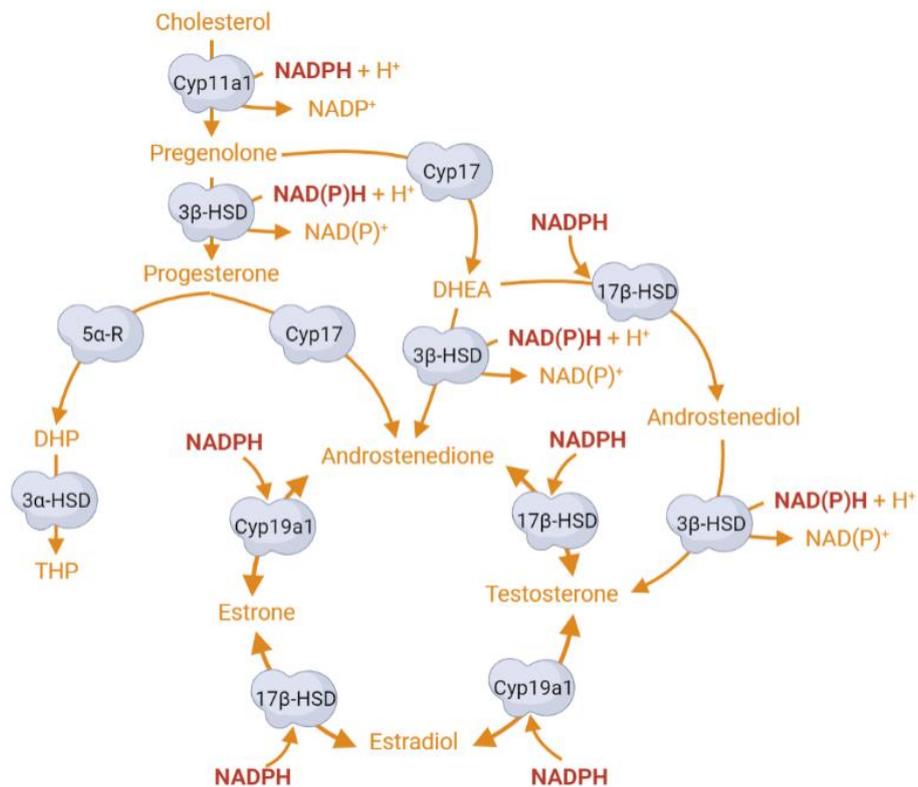
Le récepteur aux androgènes intervient également dans la formation et la fonction des jonctions cellulaires présentes entre les cellules de Sertoli. Une altération des voies de signalisation liées aux androgènes dans ces cellules, perturbe la dynamique des jonctions (Meng *et al.*, 2005, 2011; Willems *et al.*, 2010). Certaines protéines de jonction, comme les Cldn3 et Cldn13, sont régulées par les androgènes, mais le mécanisme de régulation impliqué reste encore inconnu (Chakraborty *et al.*, 2014).

#### 4.2. Synthèse des hormones stéroïdes (ou stéroïdogénèse)

La formation et la maturation des spermatozoïdes se fait sous le contrôle des hormones stéroïdes dont le précurseur est le cholestérol. Sa synthèse diffère légèrement entre l'Homme et les rongeurs. Chez l'Homme, les glandes surrénales sont capables de synthétiser *de novo* le cholestérol à partir de l'acétate, mais la majorité provient de l'alimentation et est transporté par les LDL. Chez les rongeurs, les glandes surrénales synthétisent la majorité du cholestérol depuis celui apporté par les HDL, et internalisé dans les cellules *via* le récepteur SRB1 (*Scavenger Receptor B1*). L'utilisation intracellulaire de cholestérol est régulée par les SREBP (*Sterol Response Element Binding Protein*), un groupe de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et des acides gras (Miller et Auchus, 2011).

De manière succincte, la première étape de la stéroïdogénèse est l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie. Le transfert entre la membrane externe et la membrane interne se fait grâce au complexe protéique StAR/TSPO (*Steroidogenic Acute Receptor et Translocator Protein*) (Miller, 2013). La majorité des enzymes impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdes sont issues des familles des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) ou encore de la superfamille des CYP. Une fois dans la

mitochondrie, le cholestérol est transformé en prégnénolone par action de CYP11A1 (ou P450<sub>scc</sub>, scc pour *side chain cleavage*). La prégnénolone est ensuite dirigée vers le réticulum endoplasmique où elle sera déshydrogénée en progestérone, qui elle-même pourra donner de l'androstènedione, ou encore, de manière indirecte, l'allopregnénolone (3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -tétrahydroprogestérone ou THP). La conversion de l'androstènedione en testostérone se fait grâce à l'action catalytique de la 17 $\beta$ -HSD, enzyme également responsable de la conversion de l'estradiol en estrone. De plus, les transformations de l'androstènedione en estrone et de la testostérone en estradiol sont permises par CYP19A1 (ou P450 aromatasé) (**Figure 16**). Il est également possible de synthétiser de l'androstènedione à partir de la prégnénolone et du DHEA. Ce dernier peut également être converti en testostérone *via* l'androstènedione et l'action des enzymes HSD (Miller et Auchus, 2011).



**Figure 16 : Voies métaboliques de la stéroïdogénèse.**

La synthèse des hormones stéroïdes débute par l'entrée du cholestérol dans la cellule *via* le récepteur SRB1, puis dans la mitochondrie. L'entrée mitochondriale du cholestérol est permise par un complexe protéique formé de 2 protéines : StAR (*Steroidogenic Acute Receptor*) et TSPO (*Translocator Protein*). Cette internalisation permet alors le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par CYP11A1 (ou P450<sub>scc</sub> (*side chain cleavage*)) afin de produire de la prégnénolone. Cette dernière est ensuite convertie en progestérone, elle-même pouvant donner de la testostérone et de l'estradiol par action de diverses enzymes de la famille des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSD) et des cytochromes P450 (CYP) (Miller et Auchus, 2011; Tsutsui *et al.*, 2011; Giatti *et al.*, 2012; Tsutsui, 2012; Meyer et Wirtz, 2018).

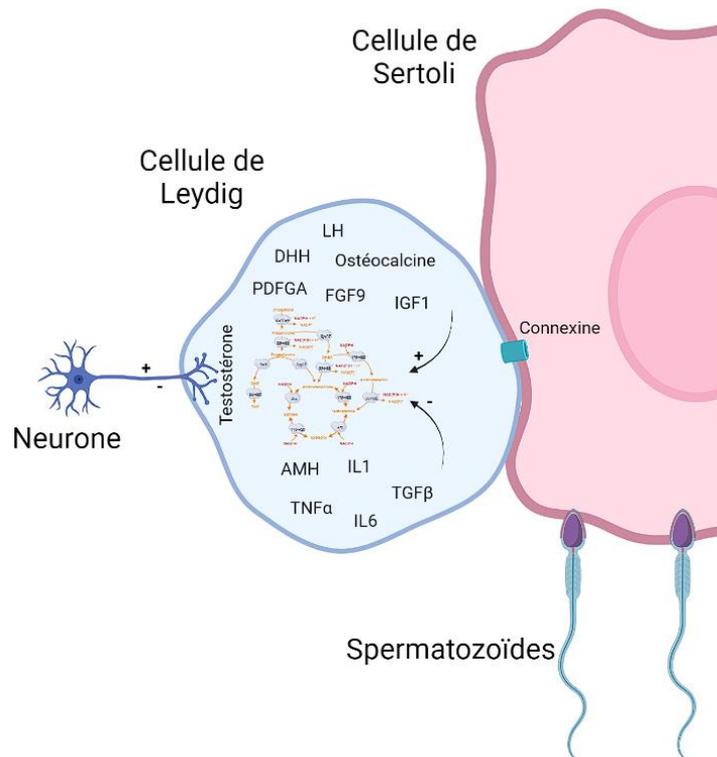
*Abréviations additionnelles* : SRB1 : *Scavenger Receptor B1* ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé ; NADP<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide (+ : forme oxydée ; H : forme réduite)

Les hormones stéroïdes sont principalement produites dans les glandes surrénales et les gonades, mais d'autres organes sont capables de les synthétiser, comme la peau, le tissu adipeux blanc et le cerveau. En fonction de l'organe étudié, les hormones stéroïdes n'auront pas le même rôle. Pour plus de clarté, seuls les rôles de ces hormones sur les gonades et le SNC seront exposés ici.

#### 4.2.1. Rôles des hormones dans les gonades mâles

Dans les gonades mâles, les hormones stéroïdes sont synthétisées par les cellules de Leydig qui contiennent les différents facteurs de régulation de cette voie de synthèse. Le DHH, le PDGFA, la LH, l'ostéocalcine, le *Fibroblast Growth Factor* (FGF) 9 et l'IGF-I sont des activateurs de la stéroïdogénèse, alors que l'AMH (hormone antimüllérienne), le *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- $\alpha$ , les interleukines 1 et 6 et le *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$  sont des inhibiteurs de la synthèse des hormones stéroïdes. La testostérone peut également s'auto-réguler de manière paracrine/autocrine (Tremblay, 2015). Les cellules de Leydig sont connectées par des jonctions cellulaires faisant intervenir les protéines de la famille des connexines. Récemment, il a été reporté que la fonction stéroïdogénique des cellules de Leydig chez la souris requière la présence de connexines qui sont des éléments constitutifs des jonctions intercellulaires (Li *et al.*, 2013). De plus, la stéroïdogénèse peut également être régulée par une voie neuronale directe entre le cerveau et les testicules, indépendante de l'axe hypothalamo-hypophysaire, et permettant une inhibition rapide de la production de testostérone (Selvage et Rivier, 2003; Selvage *et al.*, 2006). Enfin, dans les cellules de Leydig, la stimulation hormonale enclenche la dynamique mitochondriale, et plus particulièrement la fusion grâce à la mitofusine 2. Ce processus régule la localisation de StAR, et donc la synthèse des hormones stéroïdes (Tremblay, 2015).

La testostérone ainsi que les gonadotrophines (FSH, hormone folliculostimulante et LH, hormone lutéinisante) et l'œstradiol sont les principales molécules régulatrices de la spermatogénèse. La FSH, étant donné son rôle dans le contrôle du développement testiculaire et de la taille des cellules de Sertoli, influe directement sur la taille du testicule adulte et donc sur la production de spermatozoïdes. L'œstradiol, quant à elle, joue un rôle dans la viabilité des cellules germinales et la fonction des cellules de Sertoli *via* la voie ER $\alpha$  (*Estrogen Receptor alpha*). La stimulation des cellules de Leydig par la LH permet la sécrétion de testostérone qui permet l'initiation et le maintien de la spermatogénèse. En son absence, les spermatocytes restent bloqués au stade pachytène (Hakkarainen *et al.*, 2018). Lors de la puberté, la testostérone produite en quantités importantes permet le développement des caractères sexuels secondaires comme la croissance testiculaire ou encore la maturation des tubules séminifères. Sous l'influence de la testostérone, les cellules de Sertoli se différencient en tubules séminifères, et vont pouvoir être interconnectées par des jonctions serrées afin d'établir la BHT (*voir paragraphe 4.1.3*).



**Figure 17 : Facteurs influençant la stéroïdogénèse dans les testicules.**

La stéroïdogénèse a lieu principalement dans les cellules de Leydig. Plusieurs facteurs sont capables de réguler ce métabolisme, en le stimulant ou en l'inhibant. D'après la littérature, la LH, DHH, l'ostéocalcine, PDGFA, FGF9 et IGF1 sont des facteurs stimulateurs alors qu'au contraire, l'AMH, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  et les IL-1 et 6 sont des facteurs inhibiteurs. Depuis peu, il a été découvert qu'il existe une voie directe entre le cerveau et les testicules, indépendante de l'axe hypothalamo-hypophysaire, et permettant une inhibition rapide de la production de testostérone. Enfin, les protéines connexines intervenant dans les jonctions cellulaires entre les cellules de Sertoli et de Leydig sont également requises pour la stéroïdogénèse (Selvage et Rivier, 2003; Selvage *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2013; Tremblay, 2015). Illustration réalisée à l'aide site internet Biorender.com.

*Abréviations additionnelles* : LH : hormone lutéinisante ; DHH : *Desert HedgeHog* ; PDGFA : *Platelet Derived Growth Factor A* ; FGF : *Fibroblast Growth Factor* ; IGF : *Insulin-like Growth Factor* ; AMH : hormone antimüllérienne ; TNF : *Tumor Necrosis Factor* ; TGF : *Transforming Growth Factor* ; IL : interleukine

#### 4.2.2. Rôle des donneurs de méthyle dans la stéroïdogénèse et la fertilité

Le rôle des folates dans la fertilité a largement été décrit. En effet, un déficit d'apport en vitamines B9/B12 est responsable d'une diminution de la taille et de la fonction des glandes sexuelles, entraînant une altération de la production des hormones sexuelles et une réduction de la spermatogénèse, pouvant alors aboutir à l'infertilité (Evans, 1928; Bezold *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 2005). En effet, la diminution des concentrations en vitamines B9 et B12 résulte en une accumulation d'Hcy dans le testicule, résultant alors en une promotion du stress oxydatif ou du réticulum endoplasmique, responsable d'altérations des spermatozoïdes (Zhang *et al.*, 2021). Parmi ces modifications, on retrouve notamment une diminution de leur concentration, une augmentation de la fragmentation de leur ADN et de l'apoptose, ainsi qu'une altération de la mobilité (Tyagi *et al.*, 2005). Ces carences peuvent également entraîner des difficultés lors de la fécondation *in-vitro* (Chen *et al.*, 2001; Boxmeer *et al.*, 2009; Vujkovic *et al.*, 2009; Safarinejad *et al.*, 2011; Banihani, 2017).

Différentes publications sur un modèle porcin ont montré une hypométhylation de l'ADN dans le foie, une diminution des concentrations circulantes d'œstradiol, de testostérone et de LH associées à une altération de l'activité enzymatique de CYP19A1, une diminution du nombre de cellules germinales, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la MS dans les cellules de Leydig en cas de carence en folates (Halsted *et al.*, 2002; Wallock-Montelius *et al.*, 2007). De même, chez le rat, le *ratio* SAM/SAH est diminué dans les testicules des animaux carencés en donneurs de méthyle (Shivapurkar et Poirier, 1983). Les concentrations de bétaïne et choline sont également associées à une augmentation de l'hypométhylation de l'ADN et des risques d'infertilité (Vanderhout *et al.*, 2021).

En plus des déficits nutritionnels, il existe également une mutation du gène codant pour la *MTHFR*. La mutation 677TT est associée à une fragmentation de l'ADN du sperme, de l'azoospermie et de l'infertilité (Vanderhout *et al.*, 2021). Chez la femme, le déficit nutritionnel est également responsable d'une diminution de la fertilité, du fait de la réduction de la concentration en œstradiol et d'une altération de la prolifération cellulaire lorsqu'elles ont recourt à une stimulation ovarienne. Cette carence est également à l'origine de problèmes de maturation ovocytaire (Szymański et Kazdepka-Ziemińska, 2003; Twigt *et al.*, 2011). Une étude récente a mis en évidence une corrélation positive dans les concentrations sériques en calcitriol (vitamine D3), en acide folique et en vitamine B12 chez les femmes ayant recourt à la fécondation *in-vitro* (Rogenhofer *et al.*, 2019). Aucune corrélation n'a encore été montrée pour l'homme.

D'après les travaux menés par Henning et ses collaborateurs, la carence en donneurs de méthyle diminue la concentration en NADP (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et de NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) dans plusieurs tissus (Henning *et al.*, 1997). Or, l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse, telles que les enzymes HSD et les CYP est dépendante de la présence de ces cofacteurs (**Figure 16** ; Agarwal et Auchus, 2005). Une altération des rapports NADPH/NADP+ ou NADH/NAD+ pourrait donc entraîner une diminution de leur activité avec pour conséquence une altération de la stéroïdogénèse. De plus, l'expression de ces enzymes peut être impactée au cours du vieillissement. En effet, il a été montré qu'avec l'âge, des souris transgéniques surexprimant CYP19A1 ont une hypertrophie et une hyperplasie des cellules de Leydig, conjointement à une diminution de la taille des testicules, ainsi qu'une augmentation de l'inflammation liée à la forte expression du CD68 et la surproduction du TNF $\alpha$  (Li *et al.*, 2006). L'absence d'expression de l'aromatase engendre une « féminisation » des gonades du fait de l'augmentation de la production d'œstradiol. Ce phénomène peut être associé au développement de la cryptorchidie<sup>1</sup>, du cancer du testicule et de perturbations de la spermatogénèse (Abney, 1999).

De manière générale, il est admis que les apports nutritionnels des parents sont liés aux chances de conception et à la fertilité (Vanderhout *et al.*, 2021). Ceci est d'autant plus important dans le cadre des protocoles d'aide à la procréation comme l'insémination artificielle et la FIV. La procréation médicalement assistée (PMA) existe depuis le début des années 1980 et plus de 8 millions de nouveaux nés sont nés grâce à cette aide, avec plus des 2/3 depuis 2005. En Europe, environ 2 millions d'enfants

---

<sup>1</sup> Cryptorchidie : trouble de la migration testiculaire.

sont nés grâce à ces techniques entre 1997 et 2017 (Zegers-Hochschild *et al.*, 2014; Ishihara *et al.*, 2015; Wyns *et al.*, 2021). Sur l'ensemble des femmes ayant recours à la PMA, seules 30 à 40% arrivent au terme de la grossesse (Gaskins *et al.*, 2019). A l'heure actuelle, il n'existe pas de recommandations nutritionnelles d'adressant aux hommes, bien que diverses études aient montré l'importance de leurs habitudes alimentaires dans la fertilité (González-Rodríguez *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2019; Grieger, 2020; Vanderhout *et al.*, 2021).

A notre connaissance, aucune donnée n'existe dans la littérature quant aux éventuelles interactions entre la carence en donneurs de méthyle d'origine paternelle et la synthèse des hormones stéroïdes chez la descendance.

#### 4.2.3. Rôles des hormones stéroïdes au niveau du SNC

La synthèse des hormones stéroïdes se fait dans les glandes hormonales stéroïdiennes : glandes surrénales pour ce qui concerne les glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes, et les gonades pour les hormones sexuelles. Cependant, les travaux menés par l'équipe E.E. Baulieu en 1981 ont mis en évidence une synthèse *de novo* d'hormones stéroïdes dans le cerveau (Corpéchet *et al.*, 1981). Cette production locale d'hormones stéroïdes (ou neurostéroïdes) est appelée NSG. En effet, plusieurs enzymes clés de ce processus sont exprimées dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et les bulbes olfactifs (Furukawa *et al.*, 1998; Zwain et Yen, 1999; Kim *et al.*, 2002; Tsutsui, 2006).

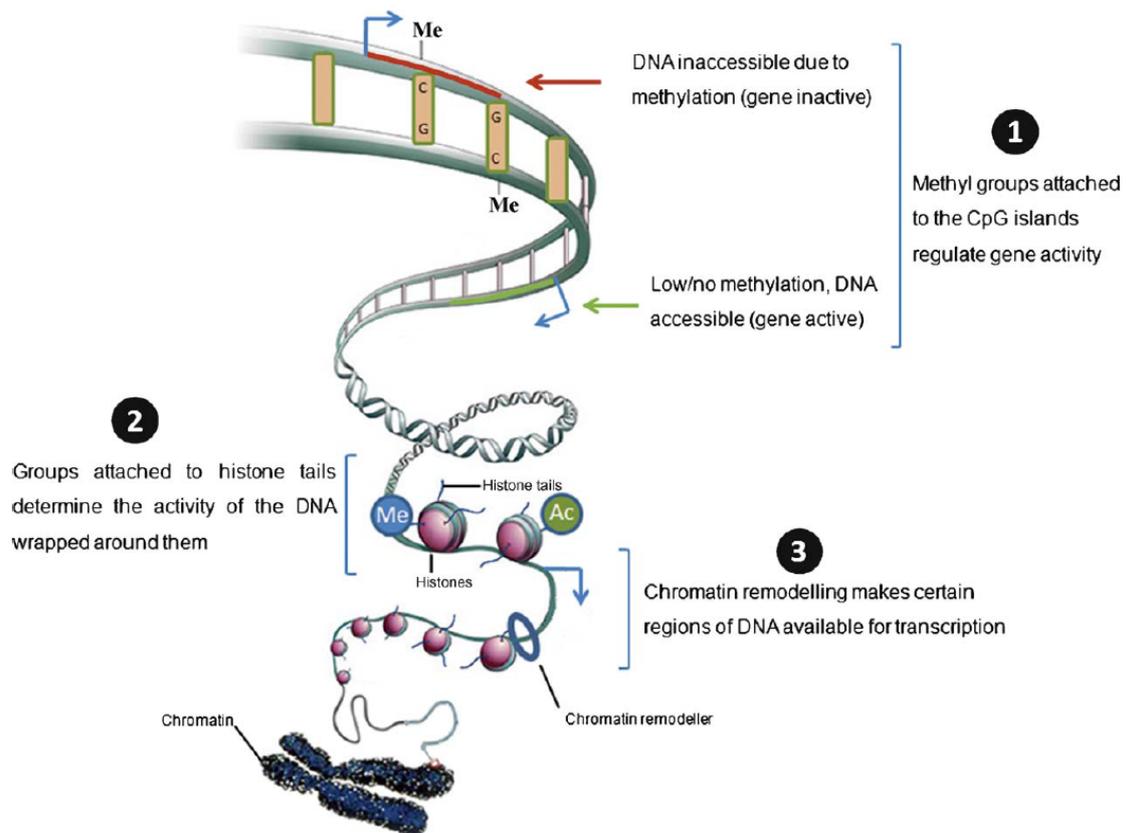
La régulation de l'entrée du cholestérol par la protéine StAR correspond à une étape limitante dans la synthèse des hormones stéroïdes. Ce processus permet la survie des neurones, notamment du fait que le cholestérol permet le maintien fonctionnel et structural de leur membrane cellulaire (Sierra, 2004). La synthèse des hormones stéroïdes est régulée par le récepteur à la LH, qui, *via* une cascade de signalisation PKA ou PKC-dépendante, permet la régulation de facteurs de transcription (dont SF-1 (*Steroidogenic Factor-1*)), induisant eux-mêmes l'expression de nombreuses enzymes de la stéroïdogénèse (Manna *et al.*, 2009). La principale fonction des neurostéroïdes est de moduler l'excitabilité des récepteurs membranaires et les canaux ioniques (Grube *et al.*, 2018). Une fois liés à leurs récepteurs, les neurostéroïdes vont pouvoir assurer diverses fonctions cérébrales essentielles comme la plasticité neuronale (Diotel *et al.*, 2018), la neurogenèse ou encore la plasticité synaptique (Tsutsui *et al.*, 2011; Tsutsui, 2012; Rossetti *et al.*, 2016). Les œstrogènes, la progestérone ainsi que la testostérone sont impliquées dans la synaptogenèse et la spinogenèse, ainsi que dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. La progestérone et d'allopregnénolone sont des agonistes indirects des récepteurs GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) ce qui leur confère un effet anxiolytique reporté par certains auteurs (Wirth, 2011). Ces hormones possèdent également un rôle neuroprotecteur (Diotel *et al.*, 2018), notamment en cas d'agression du tissu cérébral qui peut conduire à une activation de la NSG au niveau des astrocytes. Les hormones stéroïdes retrouvées dans le SNC proviennent aussi bien de la production périphérique que de la synthèse locale, c'est pourquoi elles sont nommées stéroïdes neuroactifs.

Dans les conditions physiologiques, il existe une différence de concentration des stéroïdes dans les différentes régions cérébrales en fonction du sexe. Par exemple, CYP19A1 est plus exprimée dans l'amygdale par rapport aux autres régions cérébrales chez le rat mâle, de même pour la StAR dans le cervelet des femelles (Giatti *et al.*, 2020). Le contenu en cholestérol dans le cerveau est également marqué par une différence mâle/femelle, notamment dans le cortex préfrontal et l'hippocampe (Segatto *et al.*, 2013). Enfin, plusieurs études ont mis en évidence un impact de la concentration circulante de stéroïdes et du sexe sur les conséquences liées à des dommages cérébraux (Alkayed *et al.*, 1998; Roof et Hall, 2000; Liao *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2006; Girijala *et al.*, 2017).

#### 4.3. Mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la transmission paternelle

Étant donné les liens étroits entre nutrition et fertilité, il est essentiel de s'intéresser au(x) mécanisme(s) de transmission du père. Il a été montré que les effets de l'alimentation du père s'observent dans la génération F1 et les suivantes, ce qui laisse penser que des molécules sont transmises *via* le sperme et influent sur l'expression génique chez la descendance. D'après la littérature, le mécanisme le plus probable provient des marques épigénétiques véhiculées par le sperme. On retrouve les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN ou encore des modifications de la chromatine (Anway *et al.*, 2005). De plus, il existe aussi un mécanisme de transmission faisant intervenir les petits ARNs comme les micro-ARN (miARNs) ou encore les fragments dérivant d'ARNt (tRFs) (Sharma, 2019).

D'après la littérature, 3 hypothèses de transmissions sont évoquées : (i) la méthylation de l'ADN ; (ii) la modification des histones, et (iii) les petits ARNs non codants (sncRNAs) (**Figure 18**). L'ensemble de ces processus peuvent interférer entre eux et peuvent être transférés aux générations futures sans intervention de mécanismes génétiques, et entraîner des conséquences à court- et long-terme (Rando, 2012; Nilsson *et al.*, 2018; Klastrup *et al.*, 2019).



**Figure 18 : Modèles de transmission d'informations épigénétiques.**

Plusieurs hypothèses de transmission par le sperme coexistent. La première concerne la méthylation de l'ADN (1) qui, si elle est présente, va empêcher la transcription des gènes. La deuxième implique les modifications post-traductionnelles des histones (2). Parmi ces modifications, on retrouve notamment l'acétylation (Ac) et la méthylation (Me). La troisième hypothèse porte sur le remodelage de la chromatine (3). Enfin, il existe une dernière hypothèse se rapportant aux petits ARNs non codants (sncRNAs) (image issue de Rajender *et al.*, 2011).

#### 4.3.1. Hypothèse de transmission n°1 : la méthylation de l'ADN

Il s'agit de l'hypothèse la plus étudiée à l'heure actuelle. Le processus de méthylation est possible grâce à la SAM qui est utilisée comme donneur de groupement  $-CH_3$  pour presque toutes les réactions de transméthylation. Le niveau cellulaire de SAM est dépendant du fonctionnement du cycle des folates et de la méthionine (*voir paragraphe 1.1*). C'est pourquoi, un déficit en vitamines B9/B12 influence les modifications épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN (Guéant *et al.*, 2013). Ces réactions peuvent être dans des régions promotrices (îlots CpG) et impacter la transcription des gènes en rendant les promoteurs inaccessibles aux facteurs de transcription (**Figure 18(1)**). La méthylation de l'ADN est un phénomène dynamique. Les marques sont effacées et réajoutées à 2 reprises, la première fois dans les cellules germinales lors de la gamétogenèse, la seconde fois lors de l'implantation du zygote dans l'endomètre. Cette modification est régulée par les DNMTs qui permettent l'ajout du groupement méthyle en région 5' des cytosines présentes dans les îlots CpG. Parmi ces enzymes, DNMT3A et DNMT3B sont responsables de méthylations *de novo*, alors que DNMT1 permet le maintien de l'état de méthylation. Par rapport aux autres organes, les testicules possèdent un profil de méthylation de l'ADN bien particulier : on retrouve l'expression de DNMT3L qui n'a pas d'activité de méthylation mais est indispensable pour la méthylation globale des cellules germinales (Rajender *et al.*,

2011; Tajima *et al.*, 2016). En effet, les travaux d'Oakes et ses collaborateurs ont mis en évidence une corrélation entre l'état de méthylation de l'ADN dans les îlots non-CpG avec le contenu en GC dans différentes régions chromosomiques. Cette corrélation est inversée entre les tissus somatiques et le testicule, et l'absence d'expression de DNMT3L ne permet pas d'avoir ce profil de méthylation au niveau du testicule (Oakes *et al.*, 2007).

Il existe une association entre l'infertilité masculine et les paramètres du sperme, et des modifications épigénétiques aberrantes (souvent de l'hyperméthylation) de gènes comme *MTHFR*, *PAX8*, *IGF2*, *H19*, *SNRPN* (Oakes *et al.*, 2007). De même, certains médicaments comme la 5-aza-2-désoxycytidine, ou des perturbateurs endocriniens comme la vinclozoline, affectent les paramètres reproducteurs (mobilité, morphologie, capacités de fécondation et survie de l'embryon) car ils diminuent la méthylation de l'ADN. Ces effets peuvent potentiellement être transmis à la descendance et affecter leur fertilité (Oakes *et al.*, 2007). Des études sur des modèles murins, dont les pères sont soumis à différents régimes alimentaires, ont montré qu'une petite partie des *loci* des spermatozoïdes sont différenciellement méthylés (Carone *et al.*, 2010; Lambrot *et al.*, 2013; Radford *et al.*, 2014; Shea *et al.*, 2015; Holland *et al.*, 2016; Ly *et al.*, 2017) et que seule une partie limitée est maintenue dans les générations suivantes (Sharma et Rando, 2017). Par exemple, dans un modèle murin de régime riche en lipides chez le père, la comparaison de la méthylation de l'ADN avec le transcriptome montre que la méthylation différentielle de l'ADN n'est pas responsable des changements d'expression des gènes (Chen *et al.*, 2016a). En ce qui concerne la carence paternelle en folate, les travaux de Lambrot et ses collaborateurs ont mis en évidence une altération de la méthylation de l'ADN du sperme des pères carencés. La plupart des gènes différenciellement méthylés sont impliqués dans le développement normal, dont celui du SNC et des organes reproducteurs, mais aussi dans le développement de certaines maladies comme les cancers ou des pathologies neurologiques ou psychiatriques (Lambrot *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2017).

#### 4.3.2. Hypothèse de transmission n°2 : la modification des histones

La modification des histones est importante pour les fonctions cellulaires et le développement. Parmi les modifications des histones, on retrouve principalement la méthylation (me), l'acétylation (ac), la sumoylation (sumo), l'ubiquitination (ub), la phosphorylation (ph) (**Figure 18(2)**; Rajender *et al.*, 2011; Millán-Zambrano *et al.*, 2022), ou encore la crotonisation<sup>2</sup> (cr) (Tan *et al.*, 2011). Au niveau du sperme, ces modifications post-traductionnelles sont considérées comme des marques épigénétiques potentiellement transmises à la descendance et pouvant réguler l'expression de gène dès les premières phases de développement de l'embryon (Bendayan *et al.*, 2022).

La marque des histones la plus présente est la méthylation, réalisée *via* les histones méthyltransférases (HMT), et la déméthylation par des histones déméthylases (HDM). On retrouve des histones mono-, di- ou encore tri-méthylées en fonction de l'acide aminé impliqué, et le niveau de méthylation confère un signal épigénétique particulier à la région génique concernée. La présence de

---

<sup>2</sup> Réaction de déshydratation d'un  $\beta$ -cétol ou  $\beta$ -aldol en  $\alpha$ -énone.

cette modification peut induire une répression de l'expression de gènes, comme par exemple, la méthylation de l'histone 3 sur la lysine 9 (H3K9). Au contraire, il se peut que certaines marques soient activatrices, comme dans le cas de H3K4 (Rajender *et al.*, 2011). Dans le cadre d'une carence en folate, il existe un changement du profil de méthylation des H3K4me3 (H3K4 triméthylée) dans le sperme. Ces modifications sont liées à la dérégulation de l'expression de gènes durant les premières phases de développement de la descendance. Les régions possédant davantage de marques H3K4me3 sont localisées préférentiellement à proximité des sites d'initiation de la transcription. Les promoteurs contenant le moins de H3K4me3 sont impliqués dans l'embryogenèse pré- et post-implantatoire, l'organogenèse et le remodelage de la chromatine. De plus, les marques H3K4me3 paternelles persistent pendant le développement jusqu'au stade de la masse cellulaire interne du blastocyste (Lismer *et al.*, 2021). Il a été montré qu'une surexpression de la H3K4 déméthylase (KDM1A, ou LSD1) influe sur la survie et le développement de la descendance (Siklenka *et al.*, 2015).

La 2<sup>ème</sup> marque la plus répandue est l'acétylation des histones, faisant intervenir histones acétyltransférases (HAT) et la désacétylation par les histones désacétylases (HDAC). Globalement, l'acétylation des histones permet de réguler le niveau de transcription des gènes, tout comme l'ubiquitination. En effet, l'ajout de l'ubiquitine sur l'histone H2B permet l'activation de l'expression génique, alors que sur l'histone H2A est répressive. Les phosphorylations des résidus sérine constituent également des marques activatrices, sauf dans le cas du variant H2AX pour lequel la phosphorylation est à l'origine d'une répression génique (Rajender *et al.*, 2011). Il existe bien d'autres modifications des histones qui ne seront pas détaillées ici.

Dans le sperme, ces marques peuvent être modifiées par l'environnement et donc impacter le développement embryonnaire. De même, ces modifications peuvent également impacter tous les processus de PMA car en fonction de la qualité des histones restantes et des modifications post-traductionnelles présentes, cela va influencer le développement fœtal et la santé de la descendance (Bendayan *et al.*, 2022).

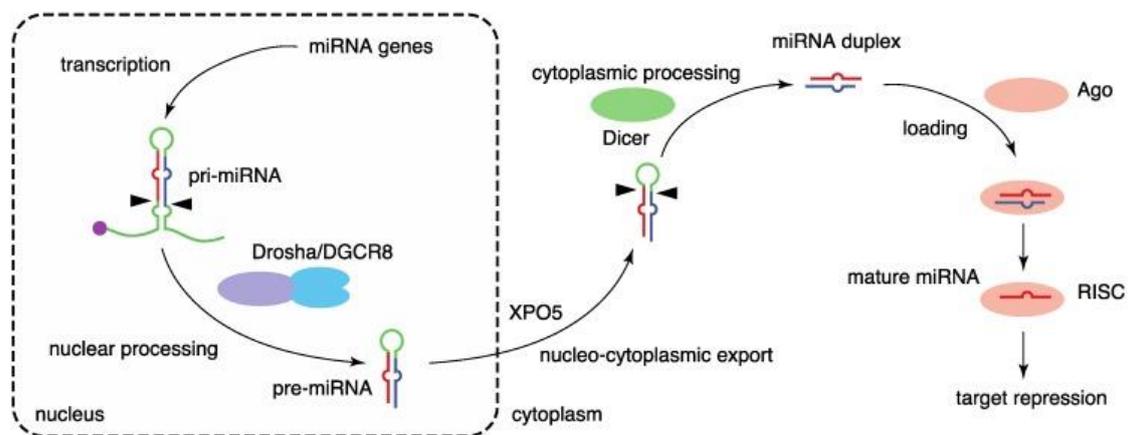
#### 4.3.3. Hypothèse de transmission n°3 : les petits ARNs non codants

La 3<sup>ème</sup> hypothèse de transmission *via* le sperme est liée aux sncRNAs (Lee et Conine, 2022). Lors de la spermiogenèse, il y a éjection d'une partie du cytoplasme et donc du matériel cellulaire comme les ARNs. Cependant, des fragments d'ARNm et plusieurs types de sncRNA restent présents dans les spermatozoïdes matures. Parmi les sncRNA, on retrouve les miARNs, les piwi-ARN (piARNs), les endo-siRNA et des tRFs. De plus, les molécules restantes dans les spermatozoïdes peuvent potentiellement être transférées à l'embryon au moment de la fécondation, pouvant être à l'origine du développement de pathologies ou de malformations (Sharma, 2019).

##### 4.3.3.1. Biogenèse des miARNs

La biogenèse des miARNs est réalisée par les ARN polymérase II à partir de la séquence ADN. Ils sont alors sous forme de pri-miARN (Ha et Kim, 2014). Sous cette forme, il y aura ensuite clivage par le complexe Drosha/DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region 8*) pour former le pré-miARN

(Denli *et al.*, 2004; Alarcón *et al.*, 2015). Ce dernier pourra alors être transporté du noyau au cytoplasme par l'exportine 5 (XPO5) et sera pris en charge et clivé par un autre complexe protéique : Dicer/TRBP (*HIV TAR RNA binding protein*), afin de former le miARN double brin (Denli *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2009). La dégradation d'un des brins sera alors réalisée par le complexe AGO, le brin restant servant alors de guide (Yoda *et al.*, 2010). La structure formée par le brin guide et le complexe AGO correspond au complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), qui a la capacité de cibler les séquences d'ARNm (Yoda *et al.*, 2010) afin d'engendrer la dégradation de l'ARNm, ou d'inhiber la traduction en fonction de la complémentarité de séquence. Lorsque la complémentarité est parfaite, l'ARNm sera dégradé, dans le cas contraire, il y aura inhibition de la traduction (**Figure 19**) (Lund *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2015; Katoh *et al.*, 2015).



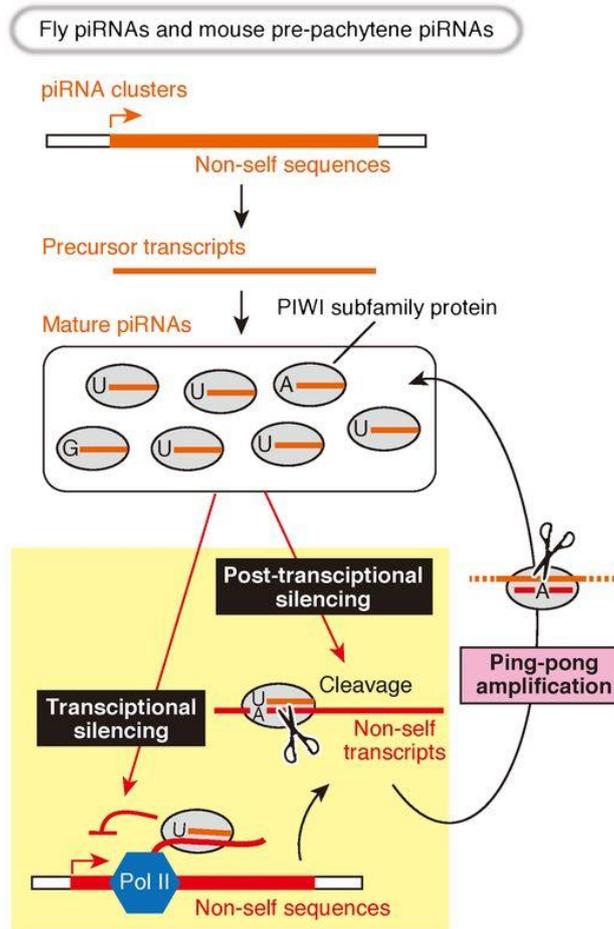
**Figure 19 : Biogenèse des miARNs chez les mammifères.**

La synthèse des miARNs est réalisée par les ARN polymérase II. Cette première étape permet la synthèse d'un pri-miARN qui sera ensuite clivé par le complexe Droscha/DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region 8*) pour former le pré-miARN. Ce dernier pourra alors être transporté du noyau au cytoplasme par l'exportine 5 (XPO5), puis sera pris en charge et clivé par un autre complexe protéique : Dicer/TRBP (*HIV TAR RNA binding protein*) afin de former le miARN double brin. La dégradation d'un des brins sera alors réalisée par le complexe AGO, le brin restant servant alors de guide. La structure formée par le brin guide et le complexe AGO correspond au complexe RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), qui a la capacité de cibler les séquences d'ARNm afin d'engendrer sa dégradation, ou d'inhiber la traduction, et ce en fonction de la complémentarité de séquence. Issue de (Matsuyama et Suzuki, 2019).

#### 4.3.3.2. Biogenèse des piARNs

Contrairement aux miARNs qui ont pour but de réguler les ARNm de l'organisme, les piARNs défendent le génome contre les éléments transposables et, chez certains animaux, régulent également l'expression des gènes ou permettent la lutte contre les infections virales (Gainetdinov *et al.*, 2021). L'origine des piARNs est multiple : ils peuvent dériver des transposons, des ARNm, des ARNt, des lncRNA ou encore des snoRNA. Leur biogenèse varie en fonction du type de cellule étudiée (somatique vs germinale). Dans les cellules germinales (**Figure 20**), la biogenèse démarre par une étape de transcription *via* l'ARN polymérase II, à partir de clusters de piARNs (Chen *et al.*, 2021a; Gainetdinov *et al.*, 2021). Le clivage de ces précurseurs crée une extrémité 5'-monophosphorylée permettant aux protéines PIWI de se lier au pré-pré-piARN. Le complexe formé est alors pris en charge par l'endonucléase PLD6 qui va cliver l'extrémité 3' aux abords de la protéine PIWI. Ce clivage permet de générer un pré-piARN d'une part, et un nouveau pré-pré-piARN d'autre part, capable de se lier à une

nouvelle protéine PIWI afin d'entrer dans une amplification dite « ping-pong ». L'avant-dernière étape est réalisé par la 3'-5' exoribonucléase PNLDC1 chez la souris et permet d'avoir un piARN mature d'une certaine longueur, spécifique de la protéine PIWI liée. L'ajout d'un groupement hydroxyle en 2' par la méthyltransférase SAM-dépendante, HENMT1 chez la souris, termine la maturation du piARN (Gainetdinov *et al.*, 2021).



**Figure 20 : Biogenèse des piRNA dans les cellules de souris.**

Les piRNA sont transcrits par l'ARN polymérase II à partir de clusters. Le clivage de ces précurseurs crée une extrémité 5'-monophosphorylée permettant aux protéines PIWI de se lier au pré-pré-piRNA. Le complexe formé est alors pris en charge par l'endonucléase PLD6 chez la souris, qui va cliver l'extrémité 3' aux abords de la protéine PIWI. Ce clivage permet de générer un pré-piRNA d'une part et un nouveau pré-pré-piRNA d'autre part, capable de se lier à une nouvelle protéine PIWI, c'est ce qui est appelé l'amplification ping-pong. L'avant-dernière étape est réalisé par la 3'-5' exoribonucléase PNLDC1 chez la souris et permet d'avoir un piRNA mature d'une certaine longueur, spécifique de la protéine PIWI liée. L'ajout d'un groupement hydroxyle en 2' par HENMT1 chez la souris conclue la maturation du piRNA. Illustration issue de (Izumi et Tomari, 2014).

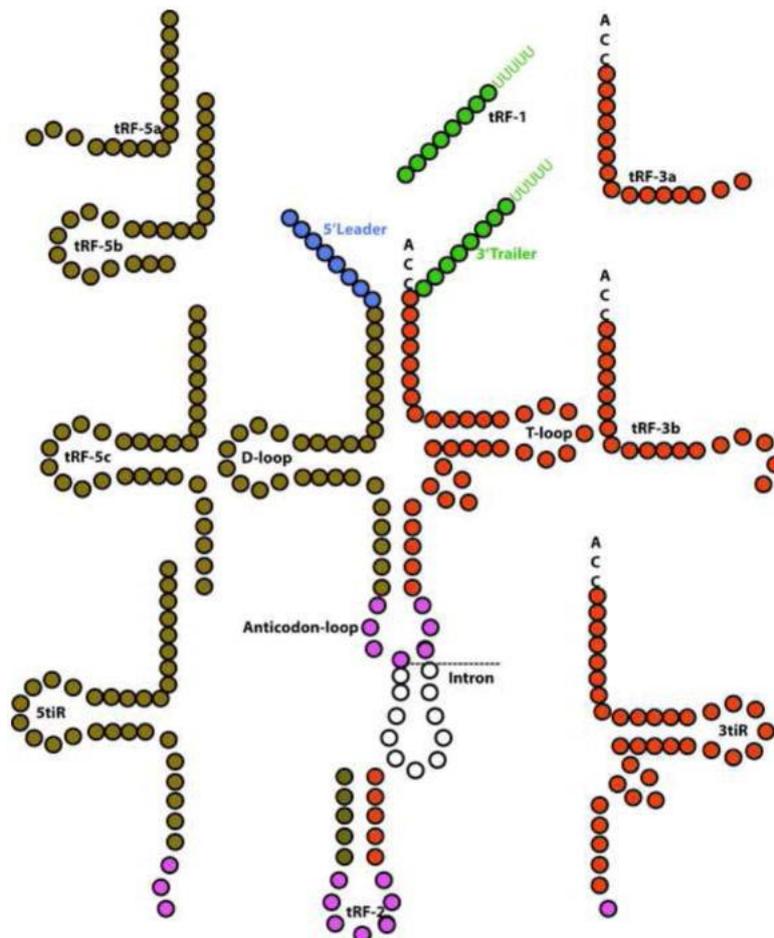
*Abréviations additionnelles* : PLD6 : phospholipase D6 ; PNLDC1 : *PARN Like Ribonuclease Domain Containing Exonuclease 1* ; HENMT1 : HEN méthyltransférase 1

#### 4.3.3.3 Biogenèse des tRFs

Ces dernières années, plusieurs articles se sont consacrés aux tRFs, dérivés des transcrits d'ARNt, et des études récentes montrant l'implication de ces petits fragments d'ARNt dans des fonctions biologiques spécifiques, telles que la suppression de l'expression génétique, la régulation de l'apoptose ou encore l'hérédité épigénétique transgénérationnelle.

La polymérase III permet la transcription des gènes des ARNt en pré-ARNt qui contiennent des bases supplémentaires à leurs extrémité 5' et 3'. Ces bases en région 5' sont appelées séquence *leader*, et séquence *trailer* pour celles retrouvées en 3' (Phizicky et Hopper, 2010). Le clivage de ces séquences est permis par 2 nucléases, la RNase P élimine la séquence *leader*, tandis que la RNase Z clive la séquence *trailer* (Frank et Pace, 1998; Phizicky et Hopper, 2010; Maraia et Lamichhane, 2011). Une séquence « CCA » unique est ajoutée aux extrémités 3' des ARNt précédemment clivés par une ARNt nucléotidyltransférase, ce qui est nécessaire à l'aminocyclation des ARNt (Maraia et Lamichhane, 2011). L'export cytoplasmique des ARNt matures se fait à l'aide d'un récepteur nucléaire d'exportation (Xiong et Steitz, 2006).

À la suite de séquençages haut-débit et d'analyses des petits fragments d'ARN dans plusieurs études, cela a permis la découverte d'une nouvelle classe de petits ARNs correspondant aux fragments d'ARNt (Cole *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Couvillion *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). En fonction de la position du clivage par des ribonucléases, différents types de tRFs sont produits (**Figure 21**). Chaque tRF aura une localisation cellulaire et un/des rôle(s) propre(s) (Kumar *et al.*, 2016).



**Figure 21 : Classification des tRFs.**

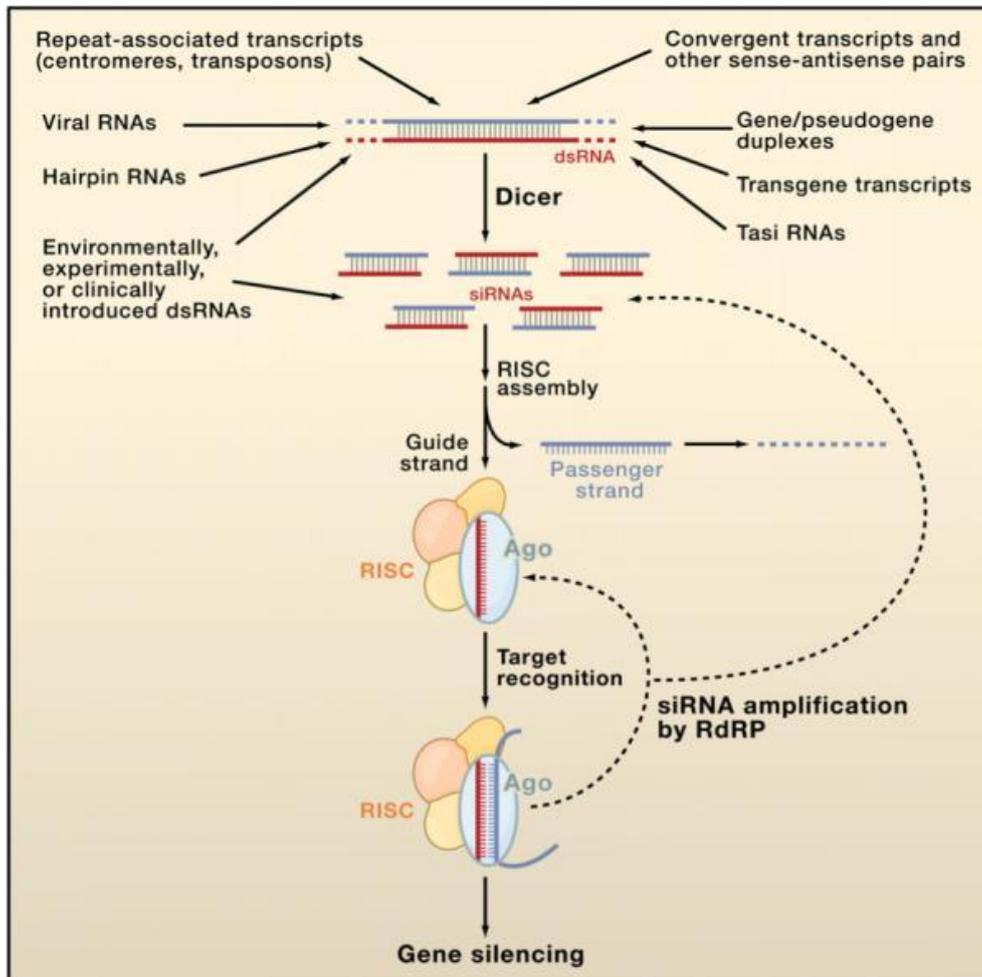
Les tRFs sont produits à la suite du clivage à différentes position de l'ARNt par des ribonucléases. Chaque tRF va avoir une localisation et un rôle propre. Issue de (Kumar *et al.*, 2016).

#### 4.3.3.4. Origine des endo-siRNA

Les petits ARNs interférents endogènes (endo-siARNs) ont longtemps été restreints à *Caenorhabditis elegans*, mais depuis quelques années, des études font état de la découverte de cette catégorie de sncRNA chez la drosophile, mais également dans des ovocytes de souris (Tam *et al.*, 2008; Lucchetta *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2014; Mihalas *et al.*, 2019).

L'atténuation de l'expression des ARNm est un système de régulation basé sur la séquence nucléotidique qui se produit dans de nombreux organismes. Les petits ARNs interférents et les miARNs sont des petits ARN doubles brins jouant un rôle central dans cette régulation de l'expression des ARNm. Comme pour les miARNs, un brin guide va se lier à des séquences complémentaires sur les ARNm cibles et assurer leur dégradation et/ou l'inhibition de leur traduction. Bien que ces petits ARNs partagent de nombreuses caractéristiques structurales et fonctionnelles, les voies de biosynthèse sont différentes. Plusieurs catégories de transcrits peuvent adopter des structures d'ARN double brin (dsRNA) qui peuvent être transformées par Dicer en siRNA (Meister et Tuschl, 2004; Tomari et Zamore, 2005). Bien que la plupart des duplex dsRNA/Dicer soient parfaitement appariés, certains, comme les ARN en épingle à cheveux et les duplex gène/pseudogène, ne le sont pas. Un siRNA se compose d'un brin guide, qui s'assemble en un complexe siRISC fonctionnel, et d'un brin non-guide qui sera dégradé. Toutes les formes de siRISC contiennent le siARN lié à une protéine Ago, et contiennent des facteurs supplémentaires.

Les ARN cibles sont alors reconnus par appariement des bases. Chez de nombreuses espèces, les populations de siARN qui reconnaissent une cible peuvent être amplifiées par l'action d'enzymes ARN polymérase ARN-dépendantes (RdRP), ce qui renforce et perpétue la réaction de réduction de l'expression (**Figure 22**) (Carthew et Sontheimer, 2009).



**Figure 22 : Biogenèse des endo-siARNs.**

La formation des siARN endogènes (endo-siRNA) est permise par plusieurs catégories de transcrits qui peuvent adopter des structures d'ARN double brin (dsRNA) qui seront ensuite transformées par Dicer en siRNA. Un siRNA se compose d'un brin guide, qui s'assemble en un complexe siRISC fonctionnel, et d'un brin non-guide qui sera dégradé. Toutes les formes de siRISC contiennent le siARN lié à une protéine Ago, et contiennent des facteurs supplémentaires. Les ARN cibles sont alors reconnus par appariement des bases. Chez de nombreuses espèces, les populations de siARN qui reconnaissent une cible peuvent être amplifiées par l'action d'enzymes ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP), ce qui renforce et perpétue la réaction de réduction de l'expression. Issue de (Carthew et Sontheimer, 2009).

#### 4.3.3.5. Impact du régime alimentaire sur les sncRNA

Le contenu en petits ARNs du sperme est affecté par le régime alimentaire. En effet, on retrouve des modifications du contenu en ARNt et les fragments de ces derniers, des piARN et des miARNs, principalement concernant les régimes HFD et pauvre en protéines (Klastrup *et al.*, 2019). Il a été montré que ces régimes impactent le contenu du sperme en ARNm ou bien leur expression, mais également le statut en miARNs et en fragments d'ARNt du sperme (Fullston *et al.*, 2013, 2016; de Castro Barbosa *et al.*, 2016; Grandjean *et al.*, 2016; Claycombe-Larson *et al.*, 2020). Par exemple, le régime pauvre en protéines augmente le niveau de tRF-Gly-GCC dans le sperme des souris mâles, avec une diminution de l'expression de ces cibles dans les embryons (Sharma *et al.*, 2016). De plus, des études ont montré qu'une supplémentation en acide folique du père engendre une altération du statut des piARNs dans le sperme (Wu *et al.*, 2019a). Il apparaît de plus en plus clairement que le statut nutritionnel joue un rôle dans la régulation de l'expression de gènes *via* des petits ARNs non codants.

Les miARNs jouent un rôle essentiel dans la spermatogenèse (Kotaja, 2014). Chaque miARN impliqué dans ce processus possède un rôle bien défini : par exemple, le niveau d'expression du miR-146 est diminué lors de la différenciation des spermatogonies qui est induite par l'acide rétinoïque (Huszar et Payne, 2013). L'une des propriétés des spermatogonies est d'être indifférenciées. Le maintien dans cet état serait permis, en partie, grâce aux miR-221 et miR-222 (Yang *et al.*, 2013). Les miARNs sont produits grâce à l'action de l'endoribonucléase DICER. De récentes études ont montré que cette enzyme est directement impliquée dans la transcription des régions satellites (Yadav *et al.*, 2020). Une voie de signalisation dépendante de cette enzyme participe à la régulation de l'organisation et la formation des jonctions cellulaires dans l'épithélium séminifère, en contrôlant les gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire (Korhonen *et al.*, 2015). Tout comme les miARNs, les endo-siARNs peuvent également participer à la spermatogenèse (Zimmermann *et al.*, 2014), mais également les piARNs. Ces derniers peuvent cliver des transcrits lors de la méiose (Goh *et al.*, 2015).

La période périconceptionnelle représente une fenêtre critique de susceptibilité au cours de laquelle toute exposition à des conditions environnementales, *i.e.* stress, polluants, médicaments, nutrition, influence l'épigénome du sperme. Ceci peut entraîner des conséquences néfastes sur la reproduction et mais également la santé de la progéniture. Actuellement, dans les processus de PMA, il arrive qu'il y ait sélection des « meilleurs » spermatozoïdes avant injection dans l'ovocyte. Une étude récente a permis de mettre en lumière que la morphologie du spermatozoïde peut être un marqueur de son profil épigénétique (comme par exemple les miARNs) et de la qualité de son ADN (Bendayan *et al.*, 2022).

## Objectifs et hypothèses de travail

---

L'alimentation est en lien étroit avec la santé et il a été montré qu'une carence en vitamines B9/B12 affecte négativement le développement et le vieillissement de l'organisme. Les effets des carences gestationnelles en donneurs de méthyle sont largement décrits et ont conduit aux recommandations de supplémentation maternelle en période périconceptionnelle dans le but d'éviter le développement du *spina bifida* qui fait partie des DFTN.

Depuis quelques temps, la recherche sur le rôle du père dans la santé de la descendance s'accroît. Durant des années, le père a été limité à son rôle de transmission du matériel génétique *via* le sperme. Ce n'est qu'au cours de cette dernière décennie que des études ont pu montrer que tout comme les mères, le statut nutritionnel des pères peut impacter la progéniture et principalement le développement de pathologies à l'âge adulte. Cela est lié notamment à leurs habitudes de vie et à la potentielle exposition à différents facteurs environnementaux. Les premières publications ont mis en évidence que le régime carencé en folates chez le père affecte l'épigénome du sperme et la spermatogenèse. Les gènes impliqués seraient liés à des fonctions spécifiques de l'organisme et son développement, mais également à celui de pathologies à l'âge adulte. Cela laisse supposer qu'il existe un mécanisme de transmission du père à l'enfant, passant ainsi par les spermatozoïdes et le sperme au moment de la fécondation. Trois hypothèses de transmission épigénétique sont documentées dans la littérature, et concernent la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et le contenu en sncRNA. De plus, parmi les pathologies connues liées à une carence en folate, on retrouve les maladies neurologiques et les troubles cognitifs et moteurs, qui ont été étudiées principalement dans le cadre des carences gestationnelles. Une homéostasie cérébrale en folates est donc indispensable au maintien des fonctions, et est fortement reliée à leur apport cérébral *via* les transporteurs. Les gènes retrouvés dérégulés dans le sperme de pères carencés ont notamment un lien avec le développement cérébral et reproducteur, mais également avec les maladies neurologiques.

Compte-tenu des hypothèses actuelles sur la transmission paternelle, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle des sncRNA, et plus particulièrement les miARNs, les tRFs et piARNs présent dans le sperme, afin d'identifier de potentiels marqueurs et leurs rôles dans le développement de l'organisme (normal et pathologique). Nous souhaitons vérifier l'hypothèse selon laquelle une carence en folate d'origine paternelle altère la spermatogenèse chez la progéniture, et que les perturbations des petits ARNs retrouvées dans le sperme des pères peuvent être à l'origine du développement de pathologies à l'âge adulte chez la descendance, et notamment des maladies neurologiques.

Il existe très peu de données concernant les carences paternelles en donneurs de méthyle et leurs conséquences sur le développement cérébral. Nous nous sommes donc intéressés à l'homéostasie intracérébrale en folates chez la descendance ainsi qu'aux perturbations qui y sont liées. Notre hypothèse est qu'une carence paternelle en donneurs de méthyle perturbe cette homéostasie cérébrale, induisant des modifications d'expression des transporteurs des folates au niveau des

barrières sang-tissu, avec pour conséquences à long terme le développement de pathologies neurologiques.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est d'étudier les effets de l'alimentation des pères, en particulier la carence en donneurs de méthyle, et ses effets sur (i) les marqueurs épigénétiques potentiellement transmis à la descendance *via* le sperme, et (ii) le développement cérébral et les conséquences potentielles à long terme.

Pour répondre à ces objectifs, un nouveau modèle murin de carence d'origine paternelle a été initié au laboratoire, basé sur les précédents modèles de carence gestationnelle. Une première partie des résultats est consacré à la caractérisation de ce nouveau modèle. L'étude des conséquences de cette carence du père sur le développement de la descendance à différents âges à ensuite permis de mettre en évidence des atteintes au niveau des organes reproducteurs ainsi que des paramètres de fertilité. La carence paternelle est également responsable de perturbations du métabolisme cérébral de la descendance, avec une atteinte sexe-spécifique.

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. MODÈLE ANIMAL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

### 1.1. Espèce utilisée

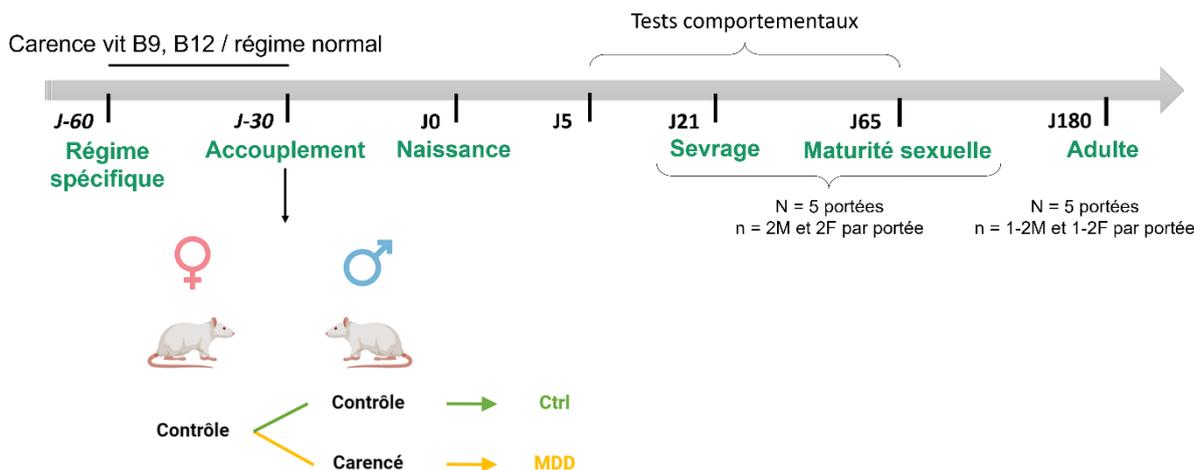
Les expérimentations ont été réalisées sur des rats de la souche *Wistar* Rj:Han (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France). Ces animaux sont maintenus dans une animalerie conventionnelle (N° agrément B54-54-722) à une température ambiante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  et un cycle lumière/obscurité de 12h. Ils ont un accès libre et illimité à la nourriture et à l'eau de boisson. Les expérimentations ont été effectuées selon les recommandations du Comité d'Éthique de Lorraine en matière d'Expérimentation Animale (CELMEA) ainsi que les directives éthiques européennes (2010-63-UE) et françaises (décret 2013-118) (APAFIS #26745).

La souche *Wistar* est non consanguine et polyvalente. Elle a été sélectionnée par Donaldson à l'Institut *Wistar* aux Etats-Unis en 1906. Du fait de sa longévité, il fait partie des modèles de choix pour les études à long terme comme les études sur le vieillissement. Il est également principalement utilisé pour des études de toxicologie, tératologie, physiologie, pharmacologie, oncologie mais également pour des études sur le métabolisme.

### 1.2. Protocole animal

Le protocole comporte des animaux de 8 semaines, dont des mâles témoins (régime contrôle, base u8979 v185, SAFE Diets, Augy, France), des mâles carencés en vitamines B9 et B12 (régime carencé, base u8979 v184, SAFE Diets), et des femelles ayant un régime standard (A04, SAFE Diets) (**Figure 23**). Cela nous a permis de constituer 2 groupes d'animaux : contrôle (Ctrl) et carencé (MDD). Sur chaque portée obtenue, 2 ratons mâles et 2 ratons femelles sont mis à mort à J21, 2 ratons mâles et 2 ratons femelles à J65, et 1 raton mâle et 1 raton femelle à J180. Les pères sont soumis aux différents régimes 1 mois avant accouplement. Les femelles ont gardé le même régime pendant toute la durée de la gestation et de l'allaitement.

A la fin du sevrage, les ratons issus de ces accouplements sont nourris avec le régime standard (A04) jusqu'à leur mise à mort. Dans le cadre de mon projet de thèse, le régime de carence contient 0,382 mg/kg d'acide folique, 0,015 mg/kg de vitamine B12 et 315 mg/kg de choline. Comparées au régime contrôle, ces valeurs sont respectivement diminuées de 6 fois, 4 fois et 7 fois (**Tableau I**).



**Figure 23 : Croisements réalisés dans le protocole animal.**

Le protocole comporte 2 groupes différents. Le groupe des pères témoins (Ctrl) a reçu un régime standard (v185 ; SAFE) et le groupe carencé, un régime déficient en vitamine B9, B12 et appauvri en choline (MDD pour *Methyl Donor Deficiency* ; v184 ; SAFE). Les femelles, quant à elles, ont été nourries avec le régime de maintenance (A04, SAFE). Les descendants sont mis à mort 21 jours après leur naissance, soit à la période de sevrage, à 60 jours, période de maturité sexuelle ; ainsi qu'à 180 jours qui correspond à l'âge adulte.

*Abréviations* : M pour mâle ; F pour femelle

**TABLEAU I : CONCENTRATION EN VITAMINES B9, B12 ET EN CHOLINE DANS L'ALIMENTATION DES ANIMAUX DE NOTRE ÉTUDE**

Composés	Régime standard (Ctrl)	Régime carencé (MDD)
Acide folique	2,26 mg/kg	0,382 mg/kg
Vitamine B12	0,06 mg/kg	0,015 mg/kg
Choline	2140 mg/kg	315 mg/kg

MDD : *methyl donor deficient*

### 1.3. Prélèvements sanguins

Le sang total est récupéré lors de la mise à mort des animaux dans des tubes de prélèvements sanguins adapté au volume de sang total de l'animal. Pour les animaux adultes, des tubes de 4 mL ont été utilisés (**Tableau II** ; Ozyme, Saint-Cyr-L'École, France). Pour les descendants à J21 et J60, des tubes de prélèvements pédiatriques ont été utilisés (Ozyme). Une fois le sang collecté, les tubes sont retournés lentement à raison de 5 fois pour les tubes secs et 10 fois pour les autres tubes. Les tubes héparinés sont centrifugés tout de suite, contrairement aux tubes secs qui sont centrifugés 30 minutes après recueil du sang pour les tubes pédiatriques et 60 minutes pour les tubes adultes.

Pour les tubes de 4 mL, les centrifugations sont réalisées sans frein à 2000  $xg$  (3222 rpm) pendant 10 minutes à température ambiante (Allegra™ X-22R, Beckmann Coulter, Villepinte, France). Les tubes pédiatriques (400 – 600  $\mu L$ ), sont centrifugés sans frein à 10 000  $xg$  (8773 rpm) pendant 5 minutes à température ambiante (Avanti J-26 XP, Beckmann Coulter) (**Tableau II**). Les échantillons de plasmas et de sérums sont ensuite stockés à  $-80^{\circ}C$  jusqu'à l'analyse.

**TABLEAU II : TUBES DE PRELEVEMENTS SANGUINS**

Tubes	Enduit	Plasma Sérum	Volume	Analyses	Centrifugation	Délai	Références (Ozyme)
Pédiatrique	Héparine de lithium	Plasma	400 - 600 µL	Métabolites 1C	10 000 xg, 5min, TA, sans frein	NA	365986
	Sec	Sérum		Hormones		30 min	365968
Adulte	Héparine de lithium	Plasma	4,5 mL	Métabolites 1C	2 000 xg, 10min, TA, sans frein	NA	367376
	Tube sec	Sérum	4 mL	Hormones		60 min	369032

#### 1.4. Isolement des spermatozoïdes

L'isolement des spermatozoïdes est réalisé dans du milieu de culture DMEM (milieu essentiel minimum modifié par Dulbecco, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France ; réf. : D5796) contenant 4,5 g/L de glucose, 0,016 g/L de rouge phénol, 3,7 g/L de bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) et 0,6 g/L de glutamine. A ce milieu, sont ajoutés 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma Aldrich ; réf. : F7524) décomplémenté. Quatre cent cinquante µL de milieu préparé sont placés au centre d'une boîte de Pétri (5cm de diamètre, non coatée) formant une goutte qui est ensuite recouverte avec de l'huile de paraffine fluide (environ 13 mL par boîte ; Savetis, Quévert, France). La boîte est ensuite placée dans un incubateur à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> pendant 20 à 30 minutes.

Après mise à mort des animaux, les organes génitaux sont récupérés et l'épididyme est séparé du testicule. L'épididyme est pesé et mesuré dans sa longueur à l'aide d'un pied à coulisse puis placé dans la boîte de Pétri à 1cm de la goutte de milieu. Des ponts sont réalisés entre le milieu et l'épididyme à l'aide d'une lame de scalpel afin d'en extraire les spermatozoïdes. L'ensemble est à nouveau placé à 37°C pendant 30 minutes. Les études réalisées sur les spermatozoïdes recueillis consistent en la mesure de mobilité par enregistrements vidéo ainsi que la réalisation de frottis.

#### 1.5. Traitement des tissus

##### 1.5.1. Prélèvement et fixation des organes

Les organes sont prélevés après mise à mort des animaux. Une partie est placée en azote liquide pour réaliser les analyses biochimiques et de biologie moléculaire, l'autre étant mise en contact avec un fixateur (méthacarn, formol ou paraformaldéhyde (PFA) 4%).

La fixation avec le Méthacarn (60% (v/v) méthanol pur (Carlo Erba, Val de Reuil, France ; réf. : 414831), 30% (v/v) chloroforme pur (Carlo Erba ; réf. : 438603) et 10% (v/v) d'acide acétique pur (SDS, Peypin, France ; réf. : 0070521)) nécessite un renouvellement du liquide fixateur 3 à 4h après le début de la fixation. Le lendemain, les organes sont conservés dans une solution d'éthanol 70% (v/v) (VWR, Strasbourg, France ; réf. : 20821.365) à 4°C jusqu'à inclusion.

La fixation dans le formol (*Formalin solution*, Sigma Aldrich ; réf. : HT501128) ainsi que le paraformaldéhyde 4% ((m/v ; Sigma Aldrich ; réf. : P6148) dans du tampon phosphate salin 10X (PBS, 1,37 M NaCl ; 26,8 mM KCl ; 101 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 12 H<sub>2</sub>O ; 17,6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7,4)) nécessite 3 lavages successifs de 5 minutes au PBS 1X, sous agitation à 4°C, après une nuit d'incubation sous agitation à 4°C. Ensuite, les organes sont conservés dans de l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à inclusion de ces derniers.

### 1.5.2. Inclusion en paraffine et coupe des organes

Une fois les organes fixés, ils sont placés dans des cassettes d'inclusion (Simport, Boleil, Canada ; réf. : M505). Lorsque l'organe est petit, des mousses sont placées au fond et au-dessus de l'organe pour éviter que celui-ci ne traverse pendant l'étape de paraffinage. L'ensemble des cassettes sont conservées dans de l'éthanol 70% jusqu'à l'étape suivante.

La mise en paraffine s'effectue sur un appareil Leica (Leica, Paris, France ; réf. : ASP300 S) au sein du laboratoire IMoPA (Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire – UMR 7365 CNRS – UL) pour les organes fixés en méthacarn et PFA 4%, et au service de Biopathologie du CHRU de Nancy les organes fixés au formol. Le paraffinage commence par un bain de formol des organes en cassettes, suivi de différents bains à concentrations croissantes d'éthanol (75% - 80% - 90% - 100%) avant un bain de xylène. Les organes sont ensuite mis en contact avec de la paraffine chaude (40 à 65°C), ce qui permet sa pénétration au sein du tissu. Un montage spécifique est ensuite réalisé entre la cassette, l'organe et de la paraffine. Les coupes de 8 µm d'épaisseur des différents tissus sont réalisées à l'aide du microtome (MicroM, ThermoFisher Scientific, Dardilly, France ; réf. : HM325).

## 2. DOSAGES PLASMATIQUES

### 2.1. Dosage des métabolites du métabolisme des monocarbones par LCMS/MS

La séparation des métabolites est réalisée par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) composé d'une colonne (Synergi™ 4 µm Fusion-RP 80Å (dimensions : 150\*3 mm) (Phenomenex, Le Pecq, France ; réf. : H21-258388)), couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) positif après une ionisation par électrospray (ESI).

#### 2.1.1. Conditions pré-analytiques

Le sang est prélevé selon la procédure citée dans le paragraphe 1.3 Les plasmas héparinés sont aliquotés à raison de 100 µL par tube, puis acidifiés avec de l'acide acétique 1N à raison de 1:10 (v/v). Les échantillons sont ensuite congelés jusqu'à l'analyse.

Pour les tissus, 20-50 mg sont prélevés et placés dans 500µL de PBS 1X puis broyés à l'aide d'un micropilon électrique (micropilon : Eppendorf™ réf. : 0030120973 ; moteur : Bel-Art™, réf. : F65100-0000 ; Fisher Scientifique, Illkirch-Graffenstaden, France). Deux cycles de sonication de 15 minutes à 4°C sont ensuite réalisés sur le broyat dont 50µL sont prélevés pour faire les analyses. La

mesure de la concentration en protéines est réalisée sur le restant de broyat. Ces broyats peuvent être conservés jusqu'à 2 semaines maximum avant l'analyse, les échantillons étant conservés à -80°C.

#### 2.1.1.1. Préparation des échantillons et de la gamme standard

Le jour de l'analyse, les échantillons à doser, les contrôles externes (au nombre de 2 par analyse), les standards internes (ou ISTD) ainsi que les standards (**Tableau III**) sont décongelés sur un lit de glace. Une gamme est réalisée à partir des standards. La dilution est réalisée dans la matrice utilisée (plasma lorsqu'il s'agit d'une analyse de plasma, PBS 1X s'il s'agit d'analyses tissulaires).

**TABLEAU III : STANDARDS DES METABOLITES DU METABOLISME DES MONOCARBONES**

Origine	Nom	Concentration initiale (mM)
<b>Cycle de la méthionine</b>	Homocystéine (Hcy)	1
	SAM	1
	SAH	0,5
	Méthionine	20
<b>Cycle des folates</b>	MeTHF	0,25
	Acide folique	0,25
<b>Voie de la transsulfuration</b>	Cystéine	30
	Cystathionine	1
	Glutathion réduit (GSH)	10
<b>Cycle de la choline</b>	Choline	10
	Bétaïne	10
	Glycine	20
	Serine	10
	Diméthylglycine (DMG)	10

#### 2.1.1.2. Préparation des standards internes (ISTD)

Une solution de DTT à 600 mM est préalablement préparée dans du formate d'ammonium 1M. Les standards internes (D3/D4/D9/D11 pour les molécules deutérées ; C13 pour l'isotope carbone13) sont dilués dans cette solution afin d'obtenir les concentrations finales données dans le tableau ci-dessous (**Tableau IV**). Dix µL du mélange ISTD sont ajoutés dans tous les tubes, hormis les tubes considérés comme blanc réactif et blanc matrice et incubés 10 minutes à température ambiante.

**TABLEAU IV : STANDARDS INTERNES UTILISES POUR L'ANALYSE DES METABOLITES DU METABOLISME DES MONOCARBONES**

Nom	Concentration (mM)
D4-Homocystéine	1
D3-SAM	1
D3-SAH	0,5
D3-Méthionine	2
D9-Choline	1
C13-MeTHF	0,25
D11-Bétaïne	5
D2-Cystéine	1
D3-Sérine	5

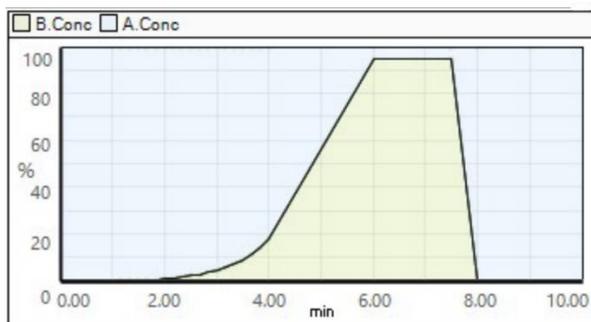
Une solution de méthanol acidifié (méthanol 99,9% (v/v), Carlo Erba ; réf. : 414831 ; acide formique 0,1% (v/v), Sigma Aldrich ; réf. : 33015) est ajoutée dans chaque tube à raison de 1:1. Les tubes sont incubés 30 minutes à 4°C puis centrifugés 30 minutes à 20 000  $xg$  à 4°C.

#### 2.1.2. Mesure sur le spectromètre de masse

Pour réaliser les mesures des échantillons, 25 $\mu$ L du surnageant sont prélevés dans une plaque 96 puits en polypropylène (Costar®, Dutscher ; réf. : 3363) auxquels 100 $\mu$ L d'une solution d'eau acidifiée (eau 99,9% (v/v) ; acide formique 0,1% (v/v)) sont ajoutés avant de souder un film sur la plaque qui sera placée dans le spectromètre de masse (LCMS 8045 ; Shimadzu, Noisiel, France).

La phase mobile est constituée de 2 solvants. Le solvant A correspond à un mélange H<sub>2</sub>O + 0,1% (v/v) d'acide formique ; et le solvant B à un mélange 99,9% d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique. Tout au long du processus, un gradient de ces solutions est utilisé (**Figure 24A**) avec un débit de 0,5 mL/min, une température de 40°C et à une pression d'environ 50 bars. Une prise d'essai de 10 $\mu$ L est utilisée et ionisée par électrospray avant passage dans les différents compartiments. Le temps de rétention des différents métabolites est représenté dans la **Figure 24B**.

A



B

Composé	Choline	Glycine	CTH	Sérine	Bétaïne	Cystéine	D3-SAM	SAM	D4-Hcy
Temps de rétention (min)	5,221	3,762	3,734	3,632	6,44	3,812	3,813	3,7	4,069
Composé	Hcy	D3-Met	Met	GSH	D4-SAH	SAH	C13 MeTHF	MeTHF	DMG
Temps de rétention (min)	3,963	4,702	4,848	4,504	5,927	5,99	8,45	8,342	5,15

**Figure 24 : Gradient de la phase mobile et temps de rétention des composés analysés.**

(A) Le gradient se fait sur une durée de 10 minutes, avec 2 solvants : A (H<sub>2</sub>O + 0,1% acide formique) et B (99,9% acétonitrile + 0,1% acide formique). (B) Temps de rétention des différents composés analysés (en minutes).

*Abbréviations* : CTH : cystathionine ; DMG : diméthylglycine ; GSH : glutathion ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine ; MeTHF : méthyl tétrahydrofolate (THF) ; SAH : S-adénosyl homocystéine ; SAM : S-adénosyl méthionine ; D pour les molécules deutérées ; C13 pour l'isotope carbone13.

### 2.1.3. Analyse des résultats

La quantification des différents métabolites dans les échantillons est réalisée contre une gamme d'étalonnage réalisée dans du plasma (pour les échantillons sanguins) ou du PBS (pour les échantillons tissulaires). Le profil des pics des différents métabolites est vérifié dans l'ensemble des échantillons et de la gamme (**Annexe 4**). Un ajustement est fait à l'aide de l'ISTD qui est ajouté en concentration connue. Le calcul de la concentration de chaque composé dans les échantillons est permis grâce à l'association de l'aire sous la courbe et de la concentration correspondante dans la gamme.

## 2.2. Dosage des hormones par méthode ELISA

### 2.2.1. Dosage des hormones gonado-stimulantes

Les dosages de la FSH et de la LH ont été réalisés par une méthode immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) type sandwich à l'aide des kits de dosage fournis par Elabscience® (FSH : réf. : E-EL-R0391 ; LH : réf. : E-EL-R0026), et selon les recommandations du fournisseur.

Le jour de l'analyse, les échantillons sont décongelés sur lit de glace avant d'être utilisés à température ambiante. Ils sont tout d'abord dilués à 1/10<sup>ème</sup> dans la solution de dilution (*Reference Standard & Sample diluent*).

Pour le dosage de la FSH, les standards sont préparés dans des tubes Eppendorf à partir d'une solution de 200 ng/mL. Pour le dosage de la LH, la solution standard est à une concentration de 100

mUI/mL. Un volume de 100 µL de chaque échantillon et de standard est déposé dans les puits en duplicats puis incubé pendant 90 minutes à 37°C.

Durant cette première incubation, les solutions contenant d'une part l'anticorps biotinylé, et d'autre part le conjugué-HRP, sont préparées selon les recommandations du fournisseur. A la fin de l'incubation, l'ensemble du liquide est jeté, et 100 µL de la solution d'anticorps biotinylé sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 1 heure à 37°C.

A la fin de cette deuxième incubation, 3 lavages successifs de 1 minute avec 350 µL de tampon de lavage sont réalisés. Les puits, éliminés des résidus de tampon, sont ensuite remplis de la solution de conjugué-HRP à raison de 100 µL par puits. Une nouvelle incubation de 30 minutes à 37°C est réalisée, suivie d'un nouveau cycle de 5 lavages successifs. Par la suite, 90 µL de la solution de substrat sont ajoutés dans chaque puits et incubée à 37°C pendant 15 minutes à l'abri de la lumière. L'ajout de 50 µL de la « solution Stop » permet l'arrêt de la réaction. La mesure des absorbances est réalisée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific).

### 2.2.2. Dosage de la testostérone

Le dosage de la testostérone est réalisé à l'aide d'une méthode de détection immuno-enzymatique (ELISA) compétitive de la testostérone libre ou liée (Enzo Life Sciences, Lörrach, Allemagne ; réf. : ADI-900-065). Pour éviter une détection croisée avec les protéines liant la testostérone, un agent réducteur (*Steroid Displacement Reagent*) est ajouté à chaque échantillon à raison de 1:99 volumes, permettant ainsi de quantifier la testostérone libre. Les échantillons sont ensuite dilués à 1/10<sup>ème</sup> dans le diluant fournis pour le kit (*Standard Diluent*). Les solutions standards de la gamme d'étalonnage sont préparées dans des tubes en verre (10\*75 mm ; réf.: 99445) de manière extemporanée. L'ensemble des échantillons sont déposés en duplicats, à raison de 100 µL par puits.

La mesure de la concentration en testostérone des échantillons est réalisée contre plusieurs contrôles nommés « Blanc », « TA (*Total Activity*) », « NSB » et « Bo ». Le puits TA permet de mesurer l'absorbance du conjugué ajouté avant le substrat, le puits NSB permet d'obtenir l'absorbance du 2<sup>ème</sup> anticorps, et le puits Bo correspond à l'absorbance mesurée en présence des 2 anticorps. Les incubations sont réalisées sous agitations à 400 rpm. Après ajout du substrat, la plaque est incubée 1 heure à 37°C sans agitation. La réaction est arrêtée par l'ajout de 50 µL de la « solution Stop ». La lecture de l'absorbance est réalisée à 405 nm (avec une correction à 570 et 590 nm).

### 2.2.3. Analyse des résultats

La concentration en testostérone des échantillons sanguins es déterminée après avoir retranché la valeur moyenne des absorbances des puits « NSB » à celles mesurées contre le blanc. Le pourcentage de testostérone liée est obtenu en divisant la valeur moyenne des absorbances corrigée par la valeur d'absorbance obtenue pour les puits Bo.

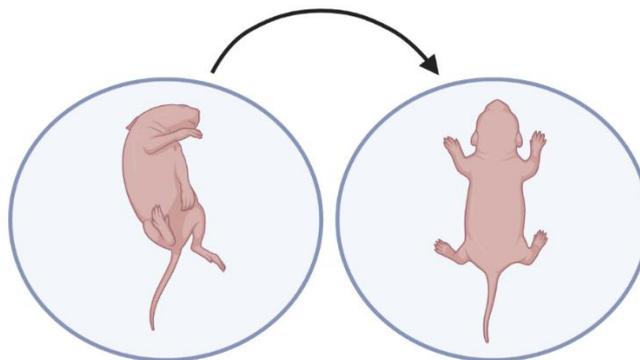
Les concentrations en FSH et LH dans les échantillons sont calculées à partir de la droite d'étalonnage obtenue à partir des mesures des absorbances en fonction des concentrations des standards exprimées en échelle logarithmiques.

### 3. ÉTUDES COMPORTEMENTALES

#### 3.1. Tests comportementaux précoces

##### 3.1.1. Le réflexe de retournement

Le test (**Figure 25**) est réalisé sur la progéniture à 5 jours, 7 jours et 9 jours après la naissance (J5, J7 et J9). Durant toute la durée du test, la mère est séparée de la portée. Deux mâles et 2 femelles ont réalisés le test, pour un total de 4 rats par portée. Le dispositif expérimental correspond à une plaque ronde en verre placée sur une mousse. Les individus y sont délicatement placés sur le dos et aussitôt lâchés et laissés libres de leurs mouvements. Le temps mis par chaque raton pour passer de la position allongée sur le dos à la position avec les 4 pattes planes sur la surface (position quadrupède) est mesuré. À la fin du test, les rats rejoignent la cage maternelle.



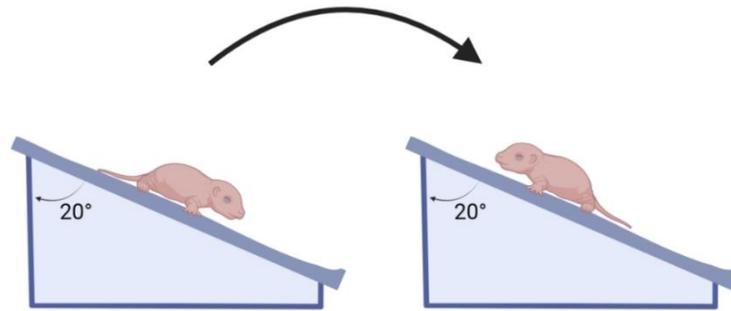
**Figure 25 : Test du réflexe de retournement.**

Les ratons âgés de 5, 7 et 9 jours sont placés sur une plaque en verre plane, non inclinée, sur le dos. Dès qu'ils sont laissés libres de leurs mouvements, le temps de chaque raton pour revenir à la position quadrupède est mesuré. Illustration réalisée à l'aide du site internet Biorender.com.

##### 3.1.2. Test de géotaxie négative

Avec le réflexe de retournement, la géotaxie négative permet de vérifier la coordination ainsi que la fonction motrice de la commande des muscles nécessaires au retournement des ratons.

Comme pour le réflexe de retournement, le test est réalisé sur les ratons J5, J7 et J9. Durant la durée du test, la mère est également séparée de la portée. Individuellement, 2 mâles et 2 femelles ont réalisés le test, pour un total de 4 ratons par portée. Le dispositif expérimental correspond à une plaque en verre maintenue inclinée à 20° et les individus y sont délicatement placés avec la tête en bas. Les ratons sont aussitôt lâchés et laissés libre de leurs mouvements. Le temps mis par chaque raton pour passer de la position « tête en bas » à la position « tête en haut » est mesuré (**Figure 26**). À la fin du test, les petits rejoignent la cage maternelle.

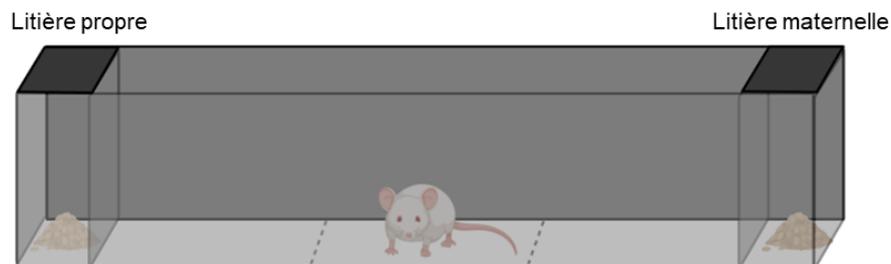


**Figure 26 : Test de géotaxie négative réalisé des ratons.**

Les ratons âgés de 5, 7 et 9 jours sont placés sur une plaque en verre inclinée à 20° avec la tête vers le bas. Dès qu'ils sont laissés libres de leurs mouvements, le temps de chaque raton pour revenir à la position « tête en haut » est mesuré. Illustration réalisée sur le site internet Biorender.com.

### 3.1.3. Test du « Homing »

Le test dit du « Homing » permet d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémoire olfactivo-hippocampique chez les ratons pendant la période de sevrage. Il est basé sur leurs aptitudes à reconnaître et suivre les informations environnementales afin de retrouver leur environnement habituel, c'est-à-dire l'environnement maternel (**Figure 27**). Ce test est réalisé pendant la phase d'allaitement lorsque l'activité exploratoire des ratons commence à se développer (J5).



**Figure 27 : Dispositif utilisé pour le test du Homing.**

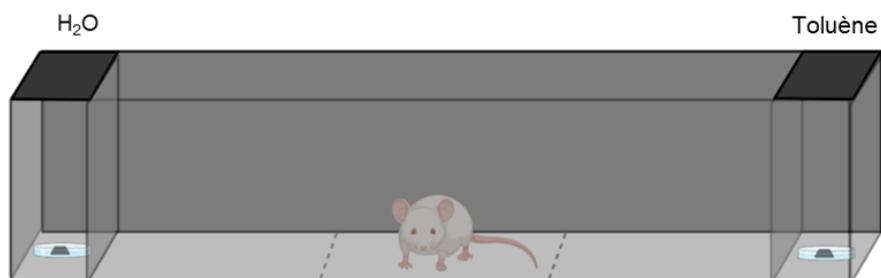
Les ratons âgés de 9, 11 et 14 jours sont placés dans le dispositif du *Homing* avec la tête vers l'une des deux parois. Les traits en pointillés délimitent les différentes zones : zone propre (contenant de la litière propre au bout), la zone intermédiaire (où l'animal est placé au début du test) et la zone maternelle (contenant de la litière provenant de la cage maternelle). Le temps ainsi que le nombre d'entrée dans les différentes zones sont relevés sur une durée totale du test de 5 minutes.

Le dispositif est caractérisé par un couloir linéaire opaque de 10cm de haut. Les 2 extrémités du couloir comprennent respectivement la litière fraîche et la litière maternelle. La répartition des 2 types de litière est aléatoire. La zone de départ se situe au centre, l'animal étant tourné face à l'une des 2 parois du test. Le test se déroule durant l'allaitement à J9, J11 et J14. Chaque individu est placé au centre du couloir et laissé libre de ses mouvements pendant un temps de 5 minutes. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 40% (v/v) entre chaque raton et le dispositif est, ou non, changé d'orientation de manière aléatoire.

Lors de ce test, la latence d'entrée ainsi que le nombre de passage dans les différentes zones (zone « propre », zone intermédiaire et zone maternelle) sont enregistrées. Le premier et le dernier choix de chaque individu sont également notés.

### 3.1.4. Le test de discrimination olfactive

Ce test permet d'évaluer la discrimination olfactive des rongeurs à partir d'un âge où la locomotion est suffisamment développée et où la neurogenèse olfactive est bien développée, c'est-à-dire le jour du sevrage. Il est basé sur le concept d'approche-évitement de sources odorantes et donc sur l'aptitude des animaux à détecter et se positionner par rapport à une odeur inconnue. Ici, nous avons testé le fonctionnement de l'olfaction trigéminal (odeurs d'alerte, toxique) et non pas l'olfaction non-trigéminal (poly-odeurs, odeur usuelle) (**Figure 28**).



**Figure 28 : Dispositif expérimental pour la mesure de la discrimination olfactive.**

Les ratons âgés de 21 jours sont placés dans le dispositif avec la tête vers l'une des deux parois. Les traits en pointillés délimitent les différentes zones : zone propre (contenant du papier buvard imbibé d'eau ultrapure), la zone intermédiaire (où l'animal est placé au début du test) et la zone sale (contenant du papier buvard imbibé de toluène). Le temps ainsi que le nombre d'entrée dans les différentes zones sont relevés sur une durée totale du test de 3 minutes

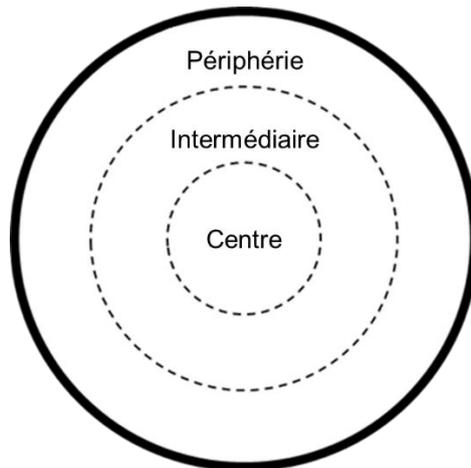
Pour cela, le même dispositif que pour le test du *Homing* a été utilisé, en remplaçant les zones « propre » et « maternelle » par les zones d'odeur neutre (eau) et toxique (toluène). Pour cela, un papier buvard de 1cm x 1cm contenant 15  $\mu$ L soit d'eau ultrapure, soit de toluène pur (Carlo Erba ; réf. : 528231) sont placés dans leur zone respective. Les zones de dépôt sont recouvertes par des couvercles en plastique pour limiter la diffusion des odorants à l'extérieur du dispositif. La zone de départ se situe au centre, l'animal étant tourné face à l'une des 2 parois du test. Le test se déroule au premier jour du sevrage, à J21. Chaque individu est placé au centre du couloir et laissé libre de ses mouvements pendant un temps de 3 minutes. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 40% (v/v) entre chaque raton et le dispositif est, ou non, changé d'orientation de manière aléatoire.

Lors de ce test, la latence d'entrée ainsi que le nombre de passage dans les différentes zones (zone « eau », zone intermédiaire et zone « toluène ») sont enregistrées. Sont également notés le premier et le dernier choix de chaque individu.

## 3.2. Tests comportementaux tardifs

### 3.2.1. Test de l'openfield

Le test de l'openfield est un test classiquement utilisé dans les études comportementales chez le rongeur qui permet d'évaluer les comportements locomoteur et exploratoire, ainsi que l'état émotionnel (Denenberg, 1969). Il s'agit d'un dispositif d'observation libre des comportements animaux dans une enceinte close homogène, sans autre élément particulier (**Figure 29**).



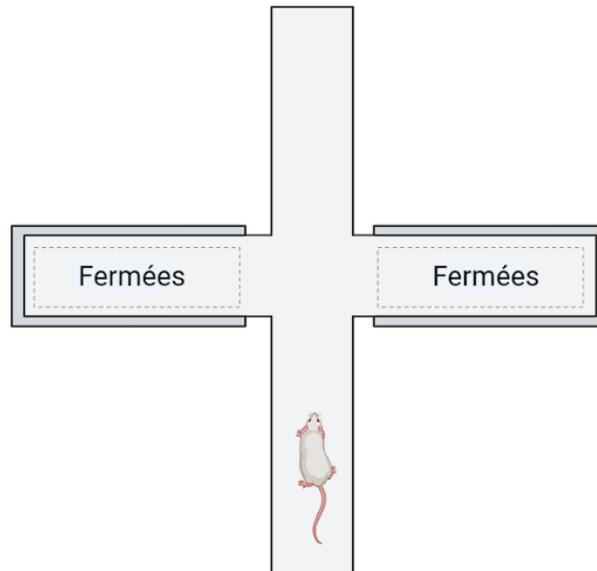
**Figure 29 : Dispositif de l'openfield.**

Le rat âgé de 21 jours est placé au centre du dispositif et laissé libre de ses mouvements pendant 5 minutes. Le temps ainsi que le nombre d'entrées dans les différentes zones, le nombre de redressements, ainsi que le nombre de fèces et d'urines sont évalués. Les traits en pointillés représentent des séparations virtuelles prises en compte par le système de *videotracking*.

Le dispositif se compose d'une arène circulaire de 1m de diamètre et de 35cm de haut. Le sol est constitué d'une plaque en verre. La zone centrale correspond à un cercle de 50cm de diamètre, la zone intermédiaire à un cercle de 100cm de diamètre ; tous les 2 sont « fictifs » c'est-à-dire présents uniquement sur le système de *videotracking*. Chaque animal est délicatement placé au centre du dispositif puis laissé libre de ses mouvements pendant une durée de 5 minutes. Le test se déroule à J21 et le dispositif est nettoyé à l'éthanol 40% entre chaque individu. Les paramètres mesurés sont le nombre d'entrées, le temps passé dans les différentes zones, le nombre de redressements, ainsi que le nombre de fèces et d'urines.

### 3.2.2. Le labyrinthe en croix surélevée

Le labyrinthe en croix surélevé permet l'évaluation du niveau d'anxiété de l'animal sans générer un stress. Il permet une mesure ponctuelle de l'activité nerveuse, liée aux aires cognitives et au système limbique, ce qui peut traduire un état anxieux chez le rongeur. Ce test se base sur 2 caractéristiques des rongeurs de laboratoire : (i) l'exploration naturelle du dispositif et (ii) leur préférence pour un positionnement dans les zones protégées (branches fermées) au détriment des zones libres (branches ouvertes) (**Figure 30**).



**Figure 30 : Dispositif du labyrinthe en croix surélevée.**

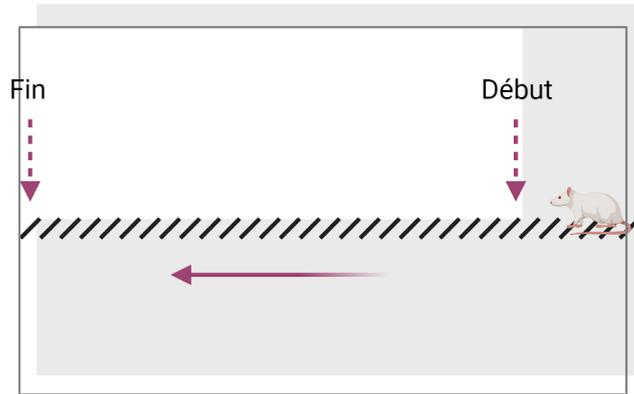
Le rat âgé de 22 jours est placé dans la zone centrale face à une branche ouverte et laissé libre de ses mouvements pendant 5 minutes. Le temps ainsi que le nombre d'entrée dans les différentes zones, le nombre de redressements, ainsi que le nombre de fèces et d'urines sont évalués. Illustration réalisée sur le site internet Biorender.com.

Le dispositif forme une croix à 4 branches organisées à angles droits à 60 cm du sol. Deux des branches, opposées l'une de l'autre, possèdent des murs verticaux (dits « protecteurs ») opaques, ce sont les branches « fermées », alors que les 2 autres branches ne sont constituées que du chemin de progression, ce sont les branches « ouvertes ». Chaque branche fait une longueur de 40 à 50 cm, pour 8 à 10 cm de large. Le centre de la croix est matérialisé par un carré, il s'agit de la zone centrale (ou zone neutre, ou encore zone de choix). Chaque animal est déposé au centre du dispositif, face à une branche non protégée, et est laissé libre de ces mouvements pendant un temps de 3 minutes.

Les paramètres enregistrés grâce au *videotracking* sont le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans les différentes zones. Sont également pris en compte le nombre de *head-deeping*, les fèces et les urines.

### 3.2.3. Test de marche linéaire sur échelle

Le test de marche linéaire sur échelle est basé sur la capacité des animaux à coordonner les mouvements de leurs pattes pour se déplacer linéairement sur des barreaux disposés horizontalement entre 2 parois, l'une opaque et l'autre transparente (**Figure 31**).



**Figure 31 : Test de marche linéaire sur échelle.**

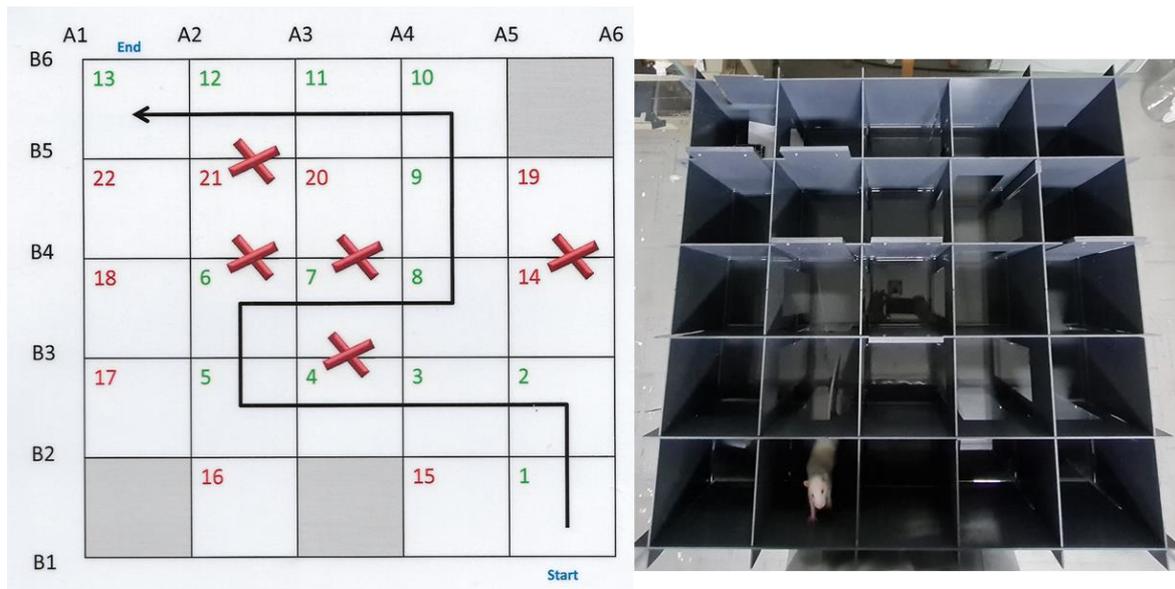
Les animaux âgés de 25 et 60 jours sont placés à l'entrée du dispositif et laissés libre de leurs mouvements. Un petit choc électrique est mis en place pour stimuler l'animal et le faire avancer sur l'échelle. Le début du test correspond au moment où l'animal passe la moitié de son corps au-delà de la partie blanche ; et la fin du test lorsque l'animal pose ses 2 pattes avant sur le dernier barreau. Le temps total mis pour parcourir l'échelle ainsi que le nombre de fois où l'animal trébuche (passage des pattes entre les barreaux) sont mesurés. Tout animal qui n'effectue pas le test correctement (changement de sens, *Freeze*, temps supérieur à 1 minute) est considéré comme étant en échec.

Le dispositif est un couloir de 10 cm de large délimité par 2 parois verticales d'une hauteur suffisante pour que l'animal ne puisse s'échapper par le dessus, ainsi que pour pouvoir créer le vide sous les barreaux d'au minimum 40 cm. L'une des parois est opaque de façon à créer un contraste avec le pelage des animaux, l'autre paroi étant transparente pour pouvoir observer l'animal et réaliser le *videotracking*. Des barreaux en métal lisse sont positionnés entre les 2 parois, dans des trous préalablement percés.

L'animal est déposé à une extrémité du couloir et est laissé libre de ses mouvements. A l'autre extrémité est positionnée une boîte contenant de la litière issue de la boîte d'hébergement. Les individus réalisent le test à J25 et J60. A J25, 4 passages d'habituations sont réalisés avant le test réel, contre 3 passages d'habituations à J60. Le temps total mis pour parcourir l'échelle est mesuré, ainsi que le nombre de fois où l'animal trébuche (passage des pattes entre les barreaux). Un temps maximum de 1 minute est utilisé comme limite à la réalisation du test. De même, les animaux se retournant dans le test (retour au point de départ sans avoir atteint l'autre extrémité) ou qui n'avancent plus (*Freeze*) sont considérés comme ayant échoués au test. A la fin du test, l'animal retrouve sa cage d'hébergement avec ses congénères.

#### 3.2.4. Labyrinthe aquatique

Le test utilisé permet l'étude des capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes puisqu'il se base sur les aptitudes des animaux à mémoriser un parcours (**Figure 32**) avec des repères environnementaux non contrôlés par l'expérimentateur. Ce test se passe dans un milieu aquatique, ce qui assure une bonne motivation des individus.



**Figure 32 : Parcours du labyrinthe aquatique.**

Le labyrinthe aquatique est un dérivé de ceux de Morris et Cincinnati, et permet d'étudier de manière hippocampo-dépendant l'apprentissage et la mémorisation des individus. Le parcours présenté ici a été réalisé par chaque individu, à 2 reprises et sur 5 jours consécutifs (J39 à J43) après 2 jours d'habituation à J35. Des paramètres tels que le temps total pour trouver la sortie, le nombre d'erreurs commises (culs-de-sac et retours en arrière) sont pris en compte

Afin de réaliser le test, 4 à 5 cm d'eau à une température de 24-25°C sont ajoutés au fond du labyrinthe ce qui permet aux animaux de faire de la « pseudo-nage » puisqu'ils peuvent prendre appui au fond du dispositif. Le parcours correspond à un couloir de progression composé d'enchaînements linéaires de 5 à 10 labyrinthes en T imbriqués les uns dans les autres. A chaque extrémité se trouve la zone de départ et la zone de sortie. Il existe des accès en « culs-de-sac » dans lesquels les individus ont une perte d'efficacité comportementale, ainsi qu'un tracé dit idéal dans lequel les individus ont une utilisation optimale de leurs ressources. Avant de réaliser le test proprement dit, il est essentiel d'avoir une période d'habituation. Cette phase permet de prendre connaissance du dispositif ainsi que de la possibilité de s'échapper par une voie unique vers une cage d'élevage chauffée à l'aide d'un cordon. L'habituation des animaux se fait à J35 et selon 2 jours consécutifs. La phase d'apprentissage enregistrée se déroule sur 5 jours consécutifs, de J39 à J43 avec 2 passages par jour et par individu. Comme pour les tests précédents, l'enregistrement est permis par le système de *videotracking*. Des paramètres tels que le temps total pour trouver la sortie et le nombre d'erreurs commises (culs-de-sac et retours en arrière) sont pris en compte.

#### 4. ANALYSES D'IMMUNOHISTOCHEMIE

##### 4.1. Étude histologique des testicules

##### 4.1.1. Le frottis spermatique

Le frottis spermatique est réalisé à la suite du prélèvement des organes génitaux après mise à mort de l'animal. Pour cela, 10 µL de milieu contenant les spermatozoïdes sont déposés sur une lame

de verre. Avec une seconde lame en verre, la goutte est étirée sur l'ensemble de la longueur de la lame. L'ensemble est ensuite laissé à l'air libre pour sécher avant fixation.

Une fois le frottis séché (environ 1 journée à température ambiante), les lames sont plongées dans un cristalliseur contenant un mélange d'éthanol pur (75% (v/v) ; VWR) et d'acide acétique (25% (v/v), SDS) pendant 1h. Ces dernières sont ensuite laissées sous hotte aspirante pendant environ 1h afin qu'elles puissent sécher. Elles sont ensuite conservées à 4°C jusqu'à coloration.

La coloration au Papanicolaou est réalisée grâce à un partenariat avec le département de Biopathologie - Anatomie et Cytologie Pathologiques, dirigé par le Pr. Guillaume Gauchotte, au CHRU de Nancy. Elles sont conservées à 4°C dans une boîte noire pendant toute la durée des analyses. Le jour de l'analyse, les lames sont remises à température ambiante pendant environ 30 minutes. Les images prises sont caractérisées par un nombre suffisant de spermatozoïdes (entre 3 et 20), à raison de 5 images par individus. Ces dernières permettent de mettre en évidence des anomalies de morphologies (absence de la tête, absence ou raccourcissement du flagelle). Les images sont réalisées à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Nikon ELWD 0.3), avec un objectif x10.

#### 4.1.2. Étude morphologique des testicules

Après inclusion des organes, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées. Une coloration Hématoxyline – Éosine – Safran (HES) est ensuite réalisée sur ces dernières afin de distinguer le noyau, les organelles et les composants extracellulaires. Le noyau est coloré en bleu violacé grâce à l'hématoxyline et les protéines sont colorées par l'éosine en rose ou rouge. Cette coloration permet d'apprécier l'organisation du tissu et peut également montrer des changements cellulaires typiques de certains cancers. L'analyse des lames a été réalisée par le Dr. Nicolas Monnin, pharmacien biologiste.

#### 4.2. Analyses de la mobilité des spermatozoïdes

Les vidéos sont réalisées après récupération des spermatozoïdes dans le milieu de culture complété en SVF grâce à un microscope inversé à contraste de phase (Nikon ; réf. : Diaphot ELWD 0.3) auquel est ajouté un appareil photo (Nikon D5100). Pour cela, 10 µL de l'homogénat sont prélevés et placés entre lame et lamelles. Pour chaque individu, 5 à 6 champs différents sont regardés pendant au moins 20sec. L'ensemble de la prise de vidéo n'excède pas les 3 minutes par individu. L'analyse finale de la mobilité des spermatozoïdes a été réalisée par le Dr. Nicolas Monnin, pharmacien biologiste.

## 5. ANALYSES BIOCHIMIQUES

### 5.1. Electrophorèse et Western Blot

#### 5.1.1. Préparation des échantillons

##### 5.1.1.1. Extraction des protéines

Le tissu congelé est maintenu au froid et une partie (environ 10 mg) est placée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Par la suite, 550 µL de tampon RIPA (140 mM NaCl ; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1,4 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 1% (v/v) Igepal ; 0,1% (m/v) sodium dodécylsulfate (SDS) ; 0,5% (m/v) désoxycholate de sodium) et un cocktail d'inhibiteurs (PIC, 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de tampon ; Sigma Aldrich ; réf. : P8340) froids sont ajoutés à chaque tube. Une homogénéisation est réalisée par aspiration/refoulement à l'aide d'une pipette de 1000  $\mu\text{L}$  puis d'une seringue de 1 mL avec une aiguille 26G. Une incubation de 30 minutes sur la glace est ensuite nécessaire. L'ensemble de l'homogénat est ensuite centrifugé pendant 30 minutes à 12 000 rpm (14 400  $xg$  ; Avanti J-26 XP, Beckmann Coulter) à 4°C, ce qui permet de récupérer les protéines du surnageant. Les extraits sont ensuite congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### 5.1.1.2. Mesure de la concentration en protéines

Le dosage s'effectue grâce au kit BCA (*Bicinchonique Acid Assay*, Interchim, Montluçon, France ; réf. : UP40840A) à l'aide d'une gamme étalon obtenue à partir d'une solution de BSA à 2 mg/mL. Les protéines réduisent le cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  en cuivre  $\text{Cu}^+$  en milieu alcalin de manière proportionnelle à la quantité de protéine présente dans l'échantillon. La présence de l'acide bicinchoninique permet alors de colorer la réaction par sa spécificité d'interaction avec le  $\text{Cu}^+$ , formant un complexe pourpre dont l'absorbance est mesurable à 570 nm. Pour cela, 50 volumes du réactif A (acide bicinchoninique) doivent être ajoutés à 1 volume du réactif B (sulfate de cuivre,  $\text{CuSO}_4$ ). Dans une plaque 96 puits, 25  $\mu\text{L}$  de chaque point de gamme et d'échantillon (dilué au 1/10<sup>ème</sup>) sont disposés en triplicats. Sont ensuite ajoutés 200  $\mu\text{L}$  du mélange A+B par puits. La plaque est agitée puis mise en incubation 30 minutes à 37°C. La lecture de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 570 nm (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific).

#### 5.1.2. Analyse des protéines par Western Blot

Vingt à 30  $\mu\text{g}$  de protéines dans du tampon Laemmli 1X et en présence de 600 mM de DTT sont séparées sur gel SDS-PAGE. Le gel de séparation est composé de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, d'acrylamide (pourcentage en fonction de la taille des protéines étudiées ; ROTIPHORESE®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne ; réf. : A121.1), 10% (v/v) de SDS 10%, 10% (m/v) de persulfate d'ammonium (APS) et de TEMED. Le gel de concentration est composé de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, d'acrylamide (0,125% (v/v)), 0,001% (v/v) de SDS 10% (m/v), 0,001% (v/v) d'APS 10% (m/v) ainsi que de TEMED.

Après migration dans du tampon de migration 1X (25 mM de Tris ; 190 mM Glycine ; SDS 0,1% (v/v) ; pH 8,3), les protéines sont transférées par transfert semi-sec dans du tampon de transfert 1X (48 mM de Tris ; 39 mM de Glycine ; 0,001% de SDS 10%) sur une membrane adaptée à l'anticorps (**Tableau V** ; nitrocellulose ou polyfluorure de vinylidène (PVDF) de 0,2  $\mu\text{m}$ , Amersham™ Hybond™, VWR ; réf. respectives : 10600017 et 10600021). Pour la membrane de PVDF, il est nécessaire de l'activer au préalable par un bain d'éthanol pur pendant 30 secondes. Le transfert est réalisé à l'aide du TransBlot® Turbo™ (BioRad) pendant 30 minutes à 25 volts et 1 ampère.

**TABLEAU V : CONDITIONS DE WESTERN BLOT**

Anticorps	Membrane	Blocage	Poids moléculaire	% gel séparation
PCFT	PVDF	BSA	50 kDa	12%
RFC	Nitrocellulose	BSA	65 kDa	12%

À la fin du transfert, il est possible de vérifier la présence des protéines sur la membrane grâce à une coloration au rouge ponceau (Sigma Aldrich ; réf. : P7170). Pour cela, il est nécessaire de rincer la membrane avec de l'eau ultrapure puis de placer le rouge ponceau sur la membrane et mettre en agitation lente pendant 5 minutes.

Le blocage des sites aspécifiques est réalisé pendant 1h sous agitation lente et à température ambiante grâce à une solution de TBST 1X avec du lait 5% (m/v) (Régilait, Saint Martin Belle Roche, France) ou de la BSA 5% (m/v) (Euromedex, Souffelweyersheim, France ; réf. : 04-100-811).

### 5.1.3. L'immunodétection

#### 5.1.3.1. Anticorps primaire et protéine de référence

L'anticorps primaire est dilué dans la solution de blocage utilisée (**Tableau VI**). Il est ensuite placé sur la membrane pendant toute une nuit, à 4°C, sous une agitation lente.

**TABLEAU VI : ANTICORPS PRIMAIRES EN WESTERN BLOT**

Anticorps	Organe	Dilution	Espèce	Fournisseur	Référence
PCFT	Cortex	1/1000	Lapin	Abcam	ab25134
RFC	Cortex	1/500	Lapin	Sigma Aldrich	AV44167

Dans le cas de la protéine de référence, ici la  $\beta$ -actine, l'anticorps est directement couplé à la *horseradish peroxidase* (HRP ; EC 1.11.1.7). Ce dernier, une fois dilué dans la solution de blocage, est placé sur la membrane pendant 1h à température ambiante. Trois lavages de 10 minutes au TBST 1X sous agitation rapide sont ensuite réalisés avant de passer à la révélation.

#### 5.1.3.2. Anticorps secondaire

Avant d'ajouter l'anticorps secondaire (**Tableau VII**), il est nécessaire de faire 3 lavages successifs avec du tampon TBST 1X pendant 10 minutes sous une agitation rapide. L'anticorps secondaire est préalablement dilué au 1/10 000<sup>ème</sup> dans la solution de blocage. Il est ensuite ajouté sur la membrane pour une incubation d'une heure sous agitation douce, à température ambiante. Un nouveau cycle de 3 lavages de 10 minutes avec du tampon TBST 1X est réalisé avant la révélation.

**TABLEAU VII : ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT**

Nom	Espèce	Espèce reconnue	Fournisseur	Référence
Anti-lapin IgG – HRP	Ane	Lapin	Jackson ImmunoResearch	711-035-152

#### 5.1.4. Stripping des membranes

L'étape de stripping est nécessaire si la protéine de référence à un poids moléculaire proche de celle d'intérêt ; ou bien si la membrane est réutilisée pour une autre protéine. Dans ce cas, la membrane est mise en contact avec la solution de stripping (210 mM de glycine ; 3,5 mM de SDS, 0,01% (v/v) de Tween 20) à pH 2,2 pendant 10 minutes sous agitation lente. Cette opération est renouvelée une fois, puis 2 lavages au TBST 1X de 5 minutes sous agitation rapide sont réalisés. La poursuite du protocole se fait à l'étape du blocage.

#### 5.1.5. Analyses des résultats

La détection des bandes se fait grâce à l'ajout de luminol et peroxyde, qui grâce à la présence de l'enzyme HRP, vont émettre de la chimiluminescence, détectable par le système de détection (iBright, ThermoFisher Scientific ; réf. : CL1500). Du luminol et du peroxyde sont mélangés à raison de 1:1 (v/v) (Clarity™ Western ECL Substrate, BioRad, réf. : 170-5061) avant d'être placés sur la membrane préalablement égouttée, pendant 5 minutes à température ambiante et dans le noir. La membrane est ensuite placée sous la caméra du système de détection pour son analyse et l'intensité des bandes de migration est mesurée par la densitométrie grâce au logiciel iBright Analysis Software.

### 5.2. Analyses de biologie moléculaire

#### 5.2.1. Étude de l'expression génique par RT-qPCR

##### 5.2.1.1. Extraction des ARNs

Un échantillon de 5 à 20 mg est prélevé sur l'organe congelé est placé dans un tube avec 1 mL de Trizol (Invitrogen ; réf. : 15596026). Pour les extractions des ARNs des spermatozoïdes, les 1 mL de Trizol sont directement ajoutés sur le culot de spermatozoïdes. La méthode d'extraction a été déterminée après différents tests (Roszkowski et Mansuy, 2021). Quelques allers-retours à la pipette puis avec une seringue et une aiguille sont réalisés afin de disloquer le tissu. Deux cents  $\mu\text{L}$  de chloroforme sont ajoutés avant d'homogénéiser le tube puis de le centrifuger pendant 15 minutes à 12 000  $xg$  à température ambiante. Pour les spermatozoïdes, une incubation de 5 minutes à température ambiante est nécessaire avant la centrifugation. La phase aqueuse contenant les ARNs sont récupérés et placés dans un nouveau tube. Un  $\mu\text{L}$  de glycogène (5mg/mL, Ambion™, ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France ; réf. : AM9510) est ajouté dans les tubes issus des spermatozoïdes, puis 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol sont ajoutés (peu importe l'échantillon). Les échantillons sont ensuite incubés 10 minutes à température ambiante avant une centrifugation de 10 minutes à 12 000  $xg$  à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot rincé avec 200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 70% (v/v) puis centrifugé 10 minutes à 12 000  $xg$  à température ambiante. Les ARNs ainsi récupérés pour les spermatozoïdes sont resuspendus dans 20  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure et stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

Pour ce qui est des extractions sur tissus, le culot est ensuite resuspendu dans 50  $\mu\text{L}$  de mix de digestion contenant la DNase (10% (v/v) tampon 10X (10X TURBO DNase Buffer, Invitrogen ; réf. :

4022G) ; 2 U de DNase Turbo (Invitrogen ; réf. : AM2238) ; 40 U de *RNase Out™ Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen ; réf. : 10777-019)). Les échantillons sont ensuite incubés 30 minutes à 37°C. Cent µL d'eau ultrapure ainsi que 150 µL de phénol-chloroforme acide sont ajoutés dans chaque tube qui seront ensuite vortexés puis centrifugés 3 minutes à 12 000 *xg* à température ambiante. Cent µL de la phase aqueuse supérieure sont prélevés et placés dans un nouveau tube. Vient ensuite l'étape de précipitation des ARNs qui se fait grâce à l'ajout de 2,5 volumes d'éthanol pur et 1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,5). Les tubes sont vortexés et incubés 2h à -20°C. Ils sont ensuite centrifugés 10 minutes à 12 000 *xg* à température ambiante. Les culots obtenus sont rincés à l'éthanol 80% (v/v) puis centrifugés 10 minutes à 12 000 *xg* à température ambiante. Enfin, les culots sont repris dans 20 µL d'eau ultrapure puis dosés.

La quantification des ARNs des échantillons tissulaires uniquement est réalisée par mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific). La valeur à 260 nm permet de calculer la concentration en ARN de l'échantillon, et les valeurs à 230 et 280 nm permettent de vérifier la contamination des échantillons (260/230 pour la présence d'EDTA et/ou de phénol ; et 260/280 pour la présence de protéines et de phénol). L'intégrité des ARNs est vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% non dénaturant et révélation à l'aide du système d'acquisition E-Box (CX5 TS Edge, VWR ; réf. : 733-2832).

#### 5.2.1.2. Rétrotranscription classique en ADNc

La rétrotranscription permet la synthèse de l'ADN complémentaire à partir des ARN extraits. Pour cela, le kit PrimerScript™ RT Master Mix est utilisé (Takara, Saint-Quentin-En-Yvelines, France ; réf. : RR036A) selon les recommandations du fournisseur. Cinq cents ng d'ARN sont rétro-transcrits dans un volume de 10µL. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 15 minutes et l'enzyme est inactivée par une incubation de 5 secondes à 85°C (C1000 Touch™ Thermal cycler, Bio Rad). Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à la prochaine étape.

#### 5.2.1.3. Rétrotranscription spécifique des micro-ARN

La rétrotranscription se fait en 2 étapes. La première consiste à rajouter une queue poly(A) aux ARNs. Le mix de rétrotranscription se compose de 50% (v/v) de tampon 5X (*5X First-Strand Buffer*, Invitrogen ; réf. : 28025013), 2,5 mM d'adénosine triphosphate (ATP ; New England Biolabs, Hitchin, Royaume-Uni ; réf. : P0756S), 100 U de RNase Out et 5 U de poly(A) polymérase (New England Biolabs ; réf. : M0276L). Quatre µL du mix sont mélangés avec 6 µL d'ARNs (si volume constant nécessaire, sinon le volume est ajusté pour avoir 500 ng/µL d'ARN) avant une incubation de 30 minutes à 37°C et une dénaturation de 2 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite directement placés sur la glace.

La seconde étape de rétrotranscription est réalisée à l'aide du 2<sup>ème</sup> mix. Il se compose de 20% (v/v) de tampon 5X, 20mM de DTT (Invitrogen ; réf. : 28025013), 30% (v/v) d'eau, 2mM de dNTP (Invitrogen ; réf. : 10297018), 200 U de M-MLV (Invitrogen ; réf. : 28025013) et 10% (v/v) du primer OTG3 (**Tableau VIII**). Dix µL de ce mix sont alors rajouter aux tubes de la 1<sup>ère</sup> étape avant une incubation

de 50 minutes à 37°C puis 15 minutes à 70°C. Les échantillons sont ensuite utilisés pour la PCR quantitative.

#### 5.2.1.4. PCR quantitative

Une fois les échantillons rétro-transcrits, l'analyse par PCR quantitative peut être réalisée à l'aide du kit TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (Takara ; réf. : RR420A). Pour chaque échantillon, 2 µL sont prélevés puis dilués, auxquels sont rajoutés 12,5 µL de TB Green Premix ExTaq 2X (concentration finale de 1X), 0,2 µM de chaque amorce de PCR (sens et antisens ; Eurogentec, Seraing, Belgique) ainsi que 9,5 µL d'eau stérile purifiée. La première étape de PCR consiste à chauffer les échantillons à 95°C pendant 30 secondes pour activer l'enzyme. Par la suite, les échantillons subissent 40 cycles de PCR (5 secondes à 95°C puis 30 secondes à 60°C) afin d'amplifier les ADNc des gènes de référence ainsi que ceux des gènes d'intérêt (**Tableau VIII**) (CFX Connect™ Real-Time System, Bio Rad). En parallèle, il y a un suivi cycle par cycle du signal fluorescent, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit amplifié. La dernière étape correspond à la réalisation de la courbe de fusion. Cette étape comprend une dénaturation lente des amplicons de 50°C à 95°C.

De plus, à chaque RT-qPCR réalisée, des témoins négatifs de rétrotranscription et de PCR ont été déposés à raison de 2 µL/puits. Le témoin négatif de rétrotranscription correspond à de l'eau et du mix de rétrotranscription ; et le témoin de PCR correspond au mix de PCR auquel est ajouté 2 µL d'eau/puits. Lors de la rétrotranscription, un témoin ARN est également réalisé. Ce dernier contient des ARN (500 ng/µL) et de l'eau, mais pas le mix de rétrotranscription. Une fois rétro-transcrit, le témoin ARN est dilué dans de l'eau avant d'être déposé dans la plaque. Ces témoins sont déposés en duplicats pour chaque tissu et dans chaque condition.

**TABLEAU VIII : AMORCES DE RT-qPCR**

Gene	F / R	5'-3' sequence	Amplicon length	Gene reference
<b><i>Slc46a1</i></b>	F	CTGGGAGATTTCAACGGCCT	188	NM_001013969.1
	R	AAAGCCAGCCAGAAAGGGTT		
<b><i>Slc19a1</i></b>	F	ATCTCCCTGGGCTTCATCCT	165	NM_017299.2 et NM_001035232.1
	R	CTCCAGTTTCTGGGCTCTG		
<b><i>Folr1</i></b>	F	GCCAGGACCGAACTTCTCAA	139	NM_133527.2
	R	GTGCTTCCTGGCTTGTGTTG		
<b><i>Star</i></b>	F	GGTGCCAGGTGTGGGCAAGG	99	NM_031558.3
	R	CCCATGGCCTCCATGCGGTC		
<b><i>Cyp19a1</i></b>	F	CCCCTCAAGGGCAAGATGATA	119	NM_017085.3
	R	TATAGTGACAAGGCAAGACAAATT		
<b><i>Hsd3b2</i></b>	F	TCAGAAGAAGCCTTGCCAGC	174	NM_017265.4
	R	GGCTTCACAAAGCAAGCAGA		
<b><i>Cldn 1</i></b>	F	TGGGGACAACATCGTACTG	166	NM_031699.3
	R	CCCCAGCAGGATGCCAATTA		
<b><i>Cldn 2</i></b>	F	CCAGGCCATGATGGTGACAT	125	NM_001106846.2
	R	CACCCACTACAGCCACTCTG		

<b>Cldn 3</b>	F	TGGGAAGTGGGTTGTACGTG	106	NM_031700.2
	R	TTGGTGGGTGCGTACTTCTC		
<b>Cldn 4</b>	F	ATCCTGAGTTGTTGCTCCC	97	NM_001012022.1
	R	AGTTCATCCACAGGCCTTCC		
<b>Cldn 5</b>	F	TTTATGCCCTGTGTGGGCTT	89	NM_031701.2
	R	CGGCACCGTTGGATCATAGA		
<b>Cldn 11</b>	F	CCTGTATCCGAATGGGCCAC	163	NM_053457.3
	R	AGCGAGTAGCCAAAGCTCAC		
<b>Tjp1</b>	F	CAATGGCGGTGTGTTGAGTT	231	NM_001106266.1
	R	TCACAGTGTGGCAAGCGTAG		
<b>Abcb1a/b</b>	F	TGCAGCATCGCCGAGAACAT	159	NM_133401.2 et NM_012623.3
	R	CGACAGCTGAGTCCCTTTGT		
<b>Abcc1</b>	F	ATGGTGTCAAGGTTTGGGAA	138	NM_022281.2
	R	TGCTGTGCTGCTGTTAGTA		
<b>S100b</b>	F	TAGGACACGGACAGAGGAGG	181	NM_013191.2
	R	GTCAGACATGACCCAGCA		
<b>Rps29</b>	F	ATGGGTCACCAGCAGCTCTA	106	NM_012876.2
	R	GCCCGTATTTACGGATCAGA		
<b>Gapdh</b>	F	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143	NM_017008.4
	R	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA		
<b>Otg3</b>	F	ATGCCATAATACGACTCACTATAGGGAGAAG TACTTTTTTTTTTTTTIV	-	-
<b>Otg4</b>	R	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	-	-
<b>miR-126a-5p</b>	F	CATTACTTTTGGTACGCG	-	MIMAT0000831
<b>miR-127-3p</b>	F	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT	-	MIMAT0000446
<b>miR-340</b>	F	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGC	-	MIMAT0000750

### 5.2.1.5. Analyse des résultats

Pour chaque gène étudié, les couples d'amorces ont été validés sur des dilutions en cascade de l'ADNc. La validation est effective lorsque l'efficacité est comprise entre 95 et 105% et lorsque le  $R^2$  de la droite est supérieur à 0,99. L'expression des ARNm ou des miARNs d'intérêt est calculée par la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Aussi bien pour les ARNm que les miARNs, 2 produits de référence ont été utilisés pour la moyenne géométrique. Pour les ARNm, il s'agit des gènes *RPS29* et *GAPDH*, et pour les miARNs, il s'agit des miR-195-5p et miR-340 pour le cœur, et miR-127-3p et miR 195-5p pour le cortex. Tous les échantillons ont été déposés en triplicats pour les ARNm et en duplicats pour les miARNs.

Après la qPCR, il est possible de vérifier la taille des amplicons grâce à un gel d'agarose (1,5 à 2% (m/v)). Pour cela, les 20  $\mu$ L de dépôt sont complétés avec 4  $\mu$ L de tampon de charge (Loading Dye 6X, Sigma Aldrich), avant d'être déposés dans les puits pour une migration d'environ 1h à 90V. La procédure de réalisation du gel est identique à celle pour vérifier l'intégrité des ARNs.

### 5.2.2. Small RNA seq : analyses des données

Les analyses ont été réalisées sur la plateforme *GenomEast* à l'IGBMC (Institut de Génétique, Biologie Moléculaire et Cellulaire) de Strasbourg. La préparation et la génération de la librairie de petits ARNs est réalisée à partir de 20 à 100 ng d'ARNs totaux et a été permise grâce au kit NEXTFLEX® Small RNA-seq v3 (Bioo Scientific Corp, Austin, USA) compatible avec l'appareil Illumina. L'ensemble des expérimentations ont été faites selon les recommandations du fabricant. Lors de la première étape, les adaptateurs d'ARN ont été séquentiellement ligaturés à chaque extrémité de l'ARN en commençant par l'extrémité 3' polyadénylée, puis l'extrémité 5'. Les petits ARNs ligaturés sont ensuite rétro-transcrits et amplifiés par PCR (cycle : 2 min 95°C, (20 sec 95°C – 30 sec 60°C – 15 sec 72°C)x18, 2 min 72°C) pour créer des constructions d'ADNc. Les amplifications entre 140 et 160 nucléotides de ces dernières ont été isolées sélectivement par purification sur gel d'acrylamide suivie d'une précipitation à l'éthanol. La qualité des bibliothèques d'ADNc a été vérifiée et quantifiée par électrophorèse capillaire. Le séquençage est ensuite réalisé sur un séquenceur Illumina HiSeq 4000 en tant que lectures uniques de 50 bases. L'analyse d'image et l'identification de base ont été effectuées à l'aide de RTA (version 2.7.7) et de bcl2fastq (version 2.20.0.422).

## 6. TESTS STATISTIQUES

Hormis pour le Small RNA-seq, l'ensemble des tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel R (version 4.0.3). La première étape est de vérifier les conditions d'applications des différents tests : normalité des données et homogénéité des variances. Si les données suivent la loi normale, des tests paramétriques seront appliqués (t-test pour  $k=2$  ; ANOVA 1 facteur pour  $k>2$ ,  $k$  étant le nombre de groupes dans l'étude). Si au contraire, les données ne suivent pas la loi normale, des tests non paramétriques sont utilisés (Mann-Whitney (U test) si  $k=2$ , un test de Kruskal-Wallis si  $k>2$ ). Ces tests sont applicables car nous avons des groupes indépendants. Dans les cas où une ANOVA 1 facteur est réalisée, un test post-hoc l'est aussi. Ces tests sont dits « à postériori » car ils ne présupposent pas de l'existence d'une hypothèse expérimentale préalablement définie.

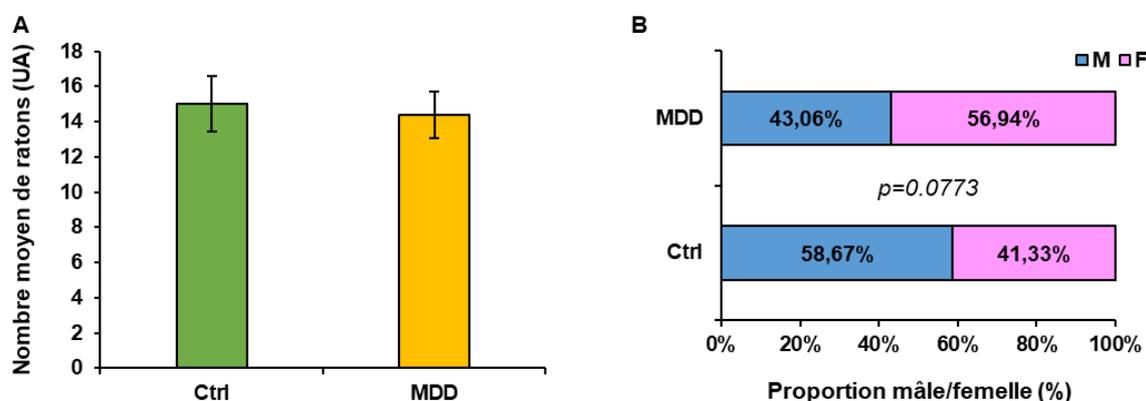
Pour le Small RNA-seq, les analyses statistiques ont été réalisées par un ingénieur bio-informaticien de l'IGBMC de Strasbourg. Pour l'analyse des données relatives aux petits ARNs, les adaptateurs ont été éliminés des lectures totales à l'aide de FASTX\_Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)). Seuls les *reads* élagués d'une longueur comprise entre 15 et 40 nucléotides ont été conservés pour la suite de l'analyse. L'analyse des données a été effectuée selon le pipeline publié ncPRO-seq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23044543>). En bref, les *reads* ont été mappés sur l'assemblage du génome du rat rn6 avec Bowtie (version 0.12.8). Les annotations ont été effectuées avec miRBase (version 22.1) pour les microARN, avec piRBase (version 1.0) pour les piARN et avec Rfam (version 11.0) pour les autres petits ARN non codants. La normalisation et les comparaisons d'intérêt ont été effectuées en utilisant le test d'expression différentielle, proposé par (Love *et al.*, 2014) et implémenté dans le package DESeq2 (version 1.32.0) de Bioconductor.

# RÉSULTATS

# **Partie 1 : Mise en place du modèle de carence paternelle**

## 1. MESURE DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES DES ANIMAUX

Le nombre moyen de ratons par portée ainsi que le pourcentage de mâles et de femelles sont représentés en **Figure 33**. Nos résultats ne montrent aucune influence du régime paternel sur le nombre moyen de ratons dans la portée (**Figure 33A**), ni sur la proportion mâle/femelle (**Figure 33B**).



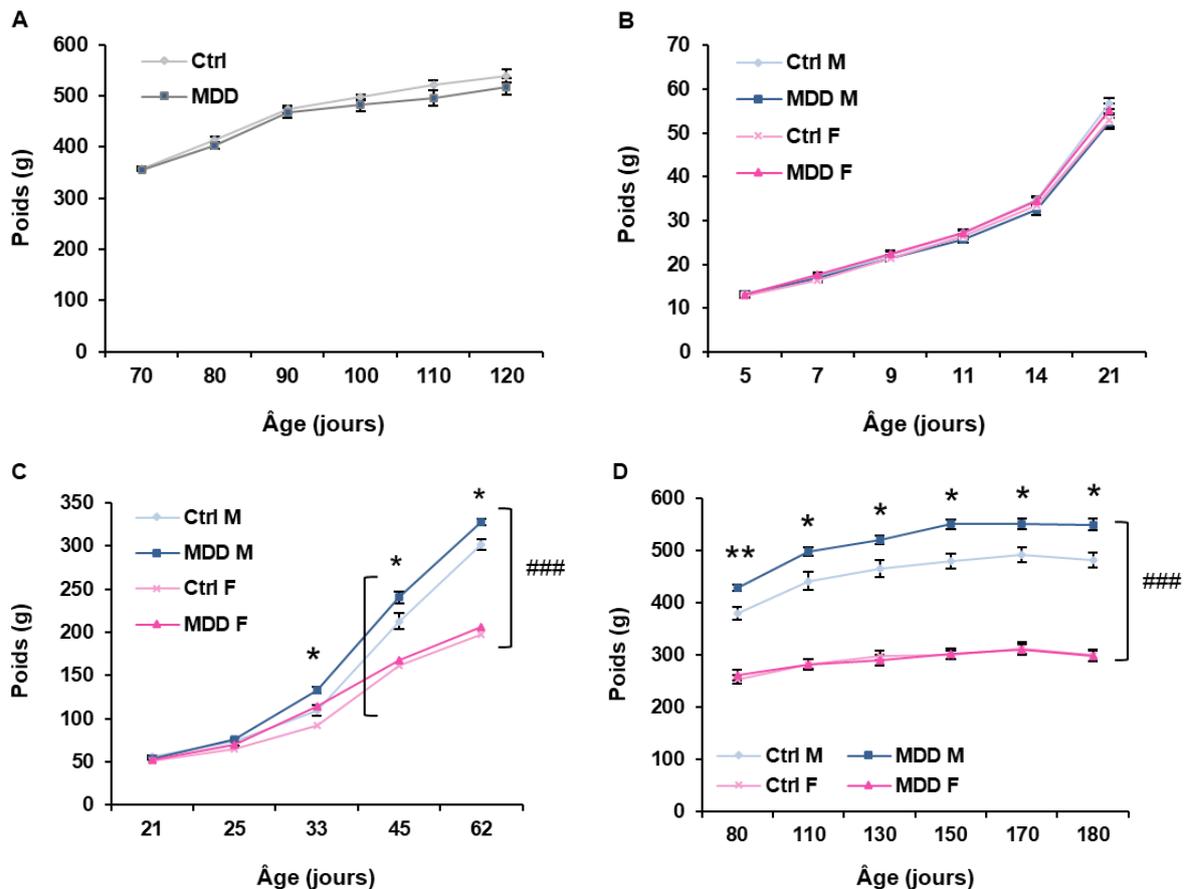
**Figure 33 : Nombre moyen de ratons et proportions mâle/femelle dans la descendance.**

(A) Nombre moyen de ratons dans la descendance, (B) *ratio* mâle/femelle dans la descendance en fonction du régime du père.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=5 ; *t*-test avec des différences non significatives.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; UA : unité arbitraire

Le poids des animaux est suivi de manière hebdomadaire, aussi bien chez les pères que la descendance, le changement de régime pouvant influencer la prise de poids (**Figure 34**). En ce qui concerne les pères, l'évolution du poids du groupe soumis au régime carencé est similaire à celle du groupe témoin (**Figure 34A**). Chaque portée a été répartie en 3 lots correspondant aux 3 stades suivants après la naissance : 21<sup>ème</sup> jour (J21), correspondant à la période de sevrage, 65<sup>ème</sup> jour (J65) correspondant à la maturité sexuelle puis à 180 jours (J180) correspondant à l'adulte mature. Chaque lot a été suivi sur l'évolution des poids et cela en fonction du sexe. Jusqu'au sevrage, la prise de poids des ratons ne diffère pas, ni en fonction des groupes, ni en fonction du sexe (**Figure 34B**). Cela n'est plus le cas à partir de J45 où il existe des différences de poids en fonction du sexe, notamment une augmentation significative du poids des ratons mâles issus de pères carencés comparé à la progéniture mâle des pères témoins (**Figure 34C et 34D**).



**Figure 34 : Évolution du poids corporel des animaux.**

(A) Poids des pères en fonction de l'âge. Évolution du poids de la descendance (B) de J5 à J21, (C) de J21 à J65, et (D) de J80 à J180. Les différences mâles/femelles sont visibles entre crochets. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=4-10. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes :  $t$ -test avec des différences non significatives pour les pères, ANOVA 2 facteurs (poids, sexe) pour la descendance.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle

Le poids des organes prélevés lors de la mise à mort des animaux aux différents âges a également été mesuré (**Tableau IX**). A J21, quel que soit le sexe de la descendance, il n'existe aucune différence significative en ce qui concerne le poids du cerveau, du cœur ou du foie. De même, il n'existe pas de différence pour le poids des ovaires des ratons femelles. En revanche, le poids des testicules des ratons mâles issus des pères carencés est plus petit que celui des ratons issus des pères témoins. A J65, la seule différence observée concerne le poids du cerveau des femelles issues des pères carencés qui est plus élevé que celui des femelles issues des pères témoins. Il en va de même pour le foie des mâles, celui des ratons issus des père carencés étant supérieur à celui des ratons issus des pères contrôles. Pour les autres organes, il n'existe pas de différence significative entre les groupes, mais des différences mâles/femelles qui elles, sont physiologiques. Enfin, à J180, il n'existe aucune différence significative des poids des organes en fonction des groupes, la différence mâle/femelle pour les poids des cerveaux étant maintenue.

**TABLEAU IX : POIDS DES ORGANES AUX DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT DES RATONS**

Âge	Groupe	Cerveau (g)	Cœur (g)	Foie (g)	Testicule (g)	Ovaire (g)
J21	Ctrl M	1,5 ± 0,03	0,30 ± 0,01	2,3 ± 0,08	0,13 ± 0,005	-
	Ctrl F	1,4 ± 0,01	0,29 ± 0,01	2,1 ± 0,06	-	0,03 ± 0,01
	MDD M	1,4 ± 0,04	0,30 ± 0,02	2,1 ± 0,07	<b>0,11 ± 0,004<sup>a</sup></b>	-
	MDD F	1,4 ± 0,01	0,31 ± 0,01	2,2 ± 0,14	-	0,02 ± 0,003
J65	Ctrl M	2,0 ± 0,03	1,31 ± 0,06	8,6 ± 0,25	1,55 ± 0,064	-
	Ctrl F	<b>1,7 ± 0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,82 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>5,6 ± 0,16<sup>a</sup></b>	-	0,05 ± 0,003
	MDD M	2,0 ± 0,02	1,23 ± 0,13	<b>10,2 ± 0,40<sup>a</sup></b>	1,51 ± 0,039	-
	MDD F	<b>1,9 ± 0,03<sup>c</sup></b>	<b>0,89 ± 0,05<sup>b</sup></b>	<b>5,9 ± 0,20<sup>b</sup></b>	-	0,06 ± 0,008
J180	Ctrl M	2,1 ± 0,02	NA	NA	1,84 ± 0,06	-
	Ctrl F	<b>2,0 ± 0,04<sup>a</sup></b>	NA	NA	-	0,07 ± 0,003
	MDD M	2,2 ± 0,03	NA	NA	1,86 ± 0,08	-
	MDD F	<b>2,0 ± 0,02<sup>b</sup></b>	NA	NA	-	0,06 ± 0,003

a : différences significatives avec Ctrl M ; b : avec MDD M ; c : avec Ctrl F ; les valeurs correspondent à la moyenne ± S.E.M. ; N=5, n=5-10. Les graphiques représentent la moyenne ± SEM ;  $p < 0,05$ , ANOVA 2 facteurs (poids, sexe) pour la descendance.

*Abbréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle

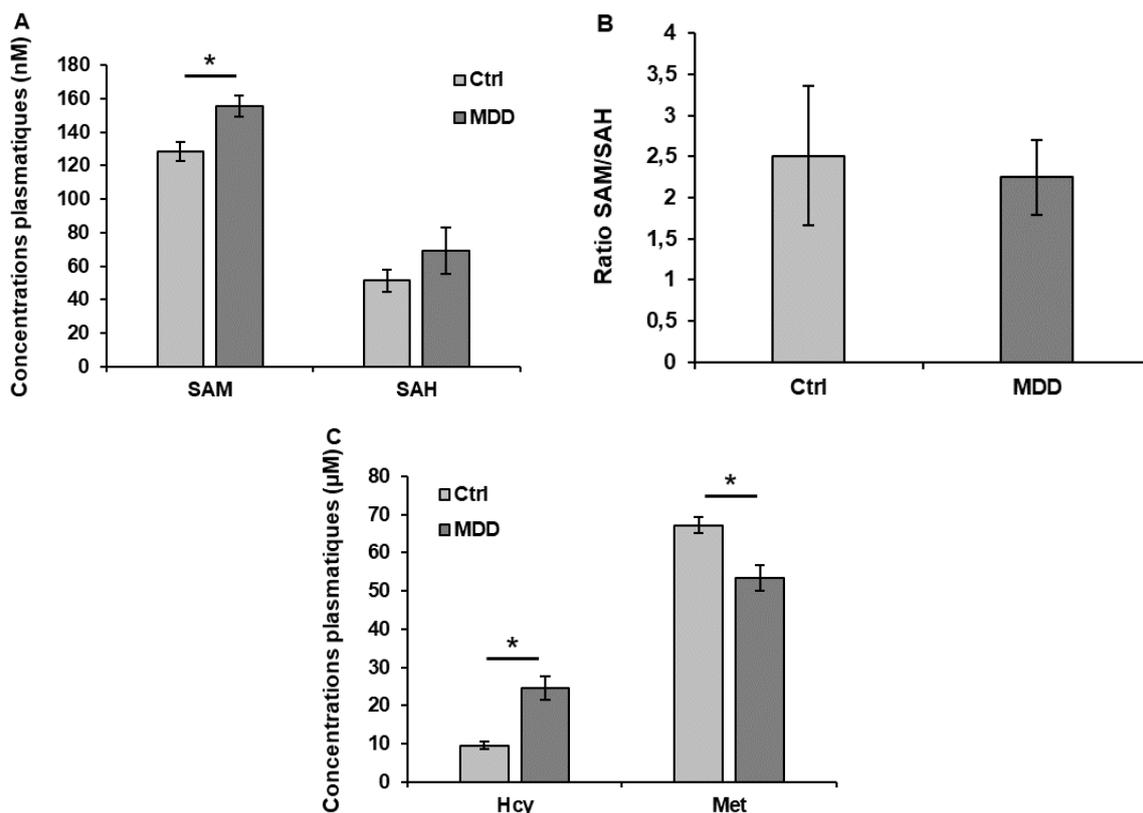
Ces premières données suggèrent que le déficit nutritionnel en donneurs de méthyle chez le père pourrait impacter le développement de la descendance. Pour poursuivre la caractérisation de notre modèle animal, nous avons réalisé les dosages des intermédiaires du métabolisme des monocarbone dans les échantillons plasmatiques et tissulaires.

## 2. MESURE DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES DANS LE PLASMA ET LE FOIE

### 2.1. Dosages plasmatiques

Le dosage plasmatique des métabolites intervenant dans le métabolisme des monocarbone permet de vérifier la carence nutritionnelle effective dans notre modèle. Classiquement, pour étudier le rôle du métabolisme des monocarbone dans une situation physiologique ou pathologique, les composés dosés sont la SAM, la SAH, l'Hcy et la Met. Le *ratio* SAM/SAH représente l'index de méthylation de l'organe ou des cellules étudiés.

Les dosages réalisés montrent une augmentation de la concentration plasmatique en SAM (**Figure 35A**) et une hyperhomocystéinémie (**Figure 35C**) chez les pères carencés par rapport aux pères contrôles. Nous observons également une diminution de la concentration plasmatique en Met dans le groupe carencé vs contrôle (**Figure 35C**). En revanche, il n'existe aucune différence significative pour ce qui concerne les dosages de la SAH (**Figure 35A**) et le *ratio* SAM/SAH (**Figure 35B**).



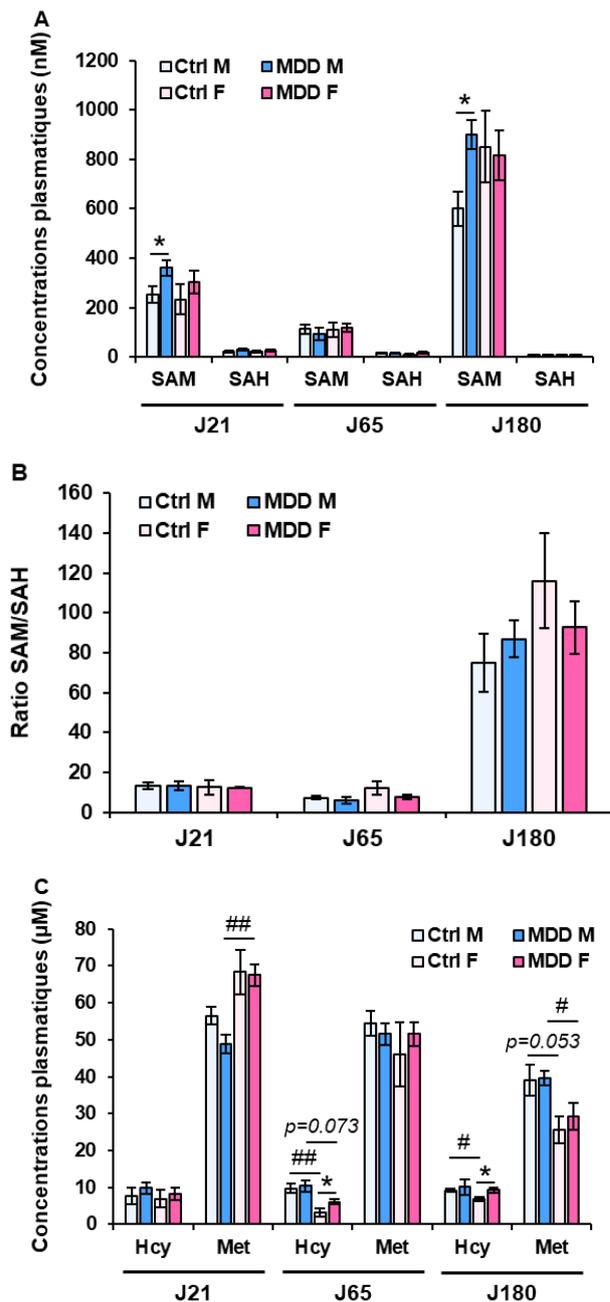
**Figure 35 : Dosages plasmatiques des métabolites 1C chez les pères.**

Concentrations plasmatiques (A) en SAM et SAH, (B) *ratio* SAM/SAH, (C) concentrations plasmatiques en Hcy et Met.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; SAH : S- adénosyl homocystéine ; SAM : S- adénosyl méthionine ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine

Les mêmes dosages ont été effectués chez les ratons à J21, J65 et J180. Une augmentation significative des concentrations plasmatiques en SAM a été mesurée chez les mâles à J21 et J180 (**Figure 36A**). En revanche, il n'y a pas d'impact du régime paternel sur la concentration plasmatique de SAH (**Figure 36A**), tout comme pour le *ratio* SAM/SAH (**Figure 36B**), bien qu'on observe une tendance à la diminution à J180 chez les femelles issues de pères carencés par rapport aux contrôles. En ce qui concerne les dosages plasmatiques d'Hcy, on observe une hyperhomocystéinémie uniquement chez les femelles issues des pères carencés par rapport aux témoins à partir de J65, ce qui suggère un effet sexe-dépendant (**Figure 36C**). Les concentrations plasmatiques en Met ne semblent pas impactées chez la descendance, aucune variation significative n'étant observée. Des variations en fonction du sexe apparaissent pour les concentrations en Hcy et en Met, celles-ci étant plus élevées dans le plasma des mâles à J180 alors que l'inverse est observé à J21. Concernant l'homocystéinémie, elle est plus basse chez les femelles par rapport aux mâles à J65 et J180 (**Figure 36C**).



**Figure 36 : Mesure des concentrations plasmatiques des intermédiaires métaboliques de la voie des monocarbone chez la descendance.**

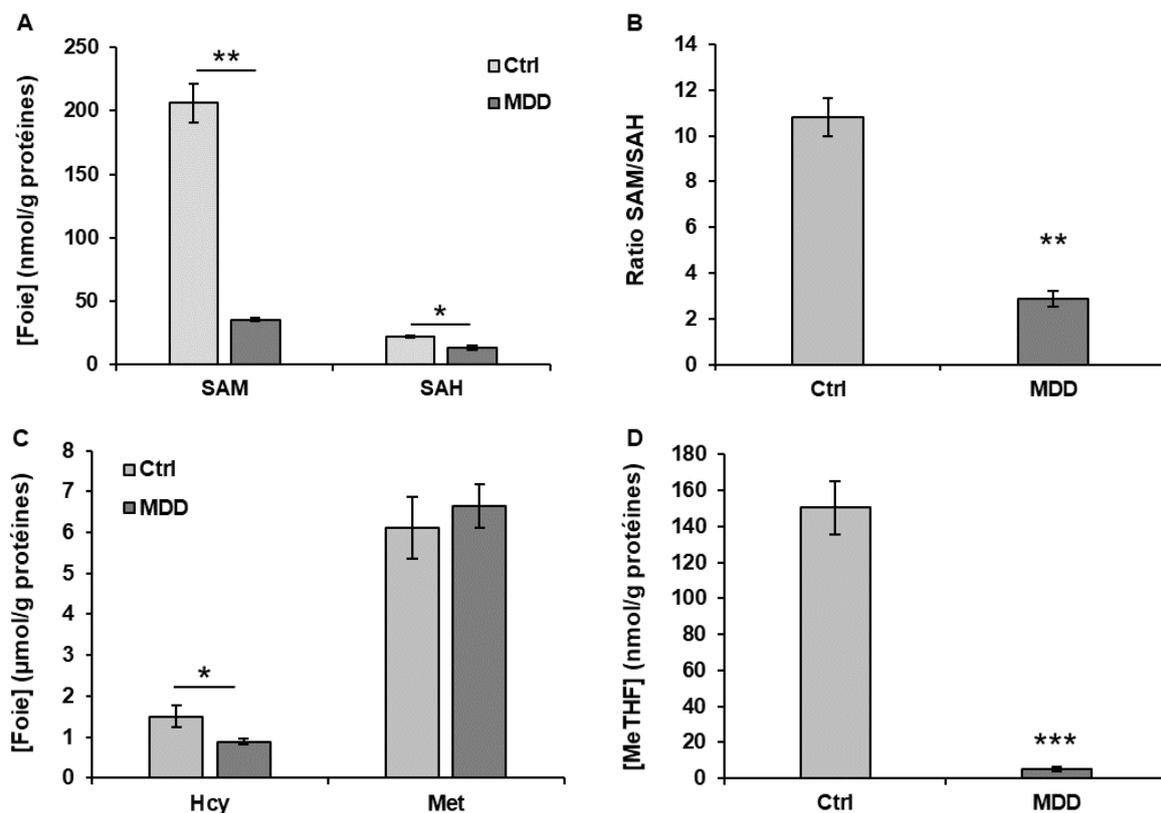
Concentrations plasmatiques (A) en SAM et SAH, (B) *ratio* SAM/SAH, (C) concentrations plasmatiques en Hcy et Met.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (dosage, sexe) pour la descendance.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; SAH : S-adosyl homocystéine ; SAM : S-adosyl méthionine ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine

## 2.2. Dosages dans le tissu hépatique

Le métabolisme des monocarbone est présent dans l'organisme entier mais les muscles et le foie sont les organes principaux où se déroule ce métabolisme (Obeid, 2013). L'analyse du métabolome hépatique des pères rend compte d'une diminution de la concentration en SAM, SAH (**Figure 37A**), du *ratio* SAM/SAH (**Figure 37B**), ainsi que des concentrations en Hcy (**Figure 37C**) et en MeTHF (**Figure 37D**). Ces mesures, conjointement à celles réalisées sur le plasma, permettent de confirmer la carence en donneurs de méthyle des pères du groupe MDD dans notre modèle animal.

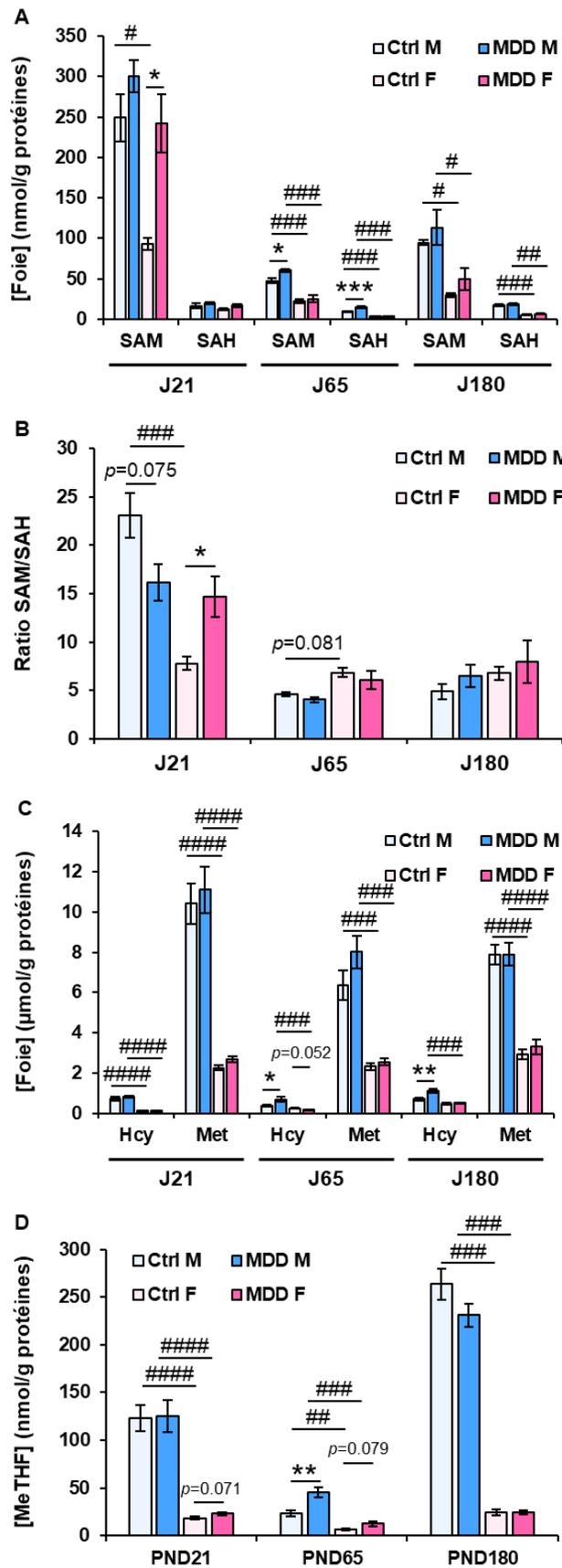


**Figure 37 : Concentrations en métabolites de la voie des monocarbone dans les échantillons hépatiques des pères.**

Les concentrations hépatiques (A) en SAM et SAH, (B) *ratio* SAM/SAH, (C) en Hcy et Met, (D) en MeTHF. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; SAH : s-adenosyl homocystéine ; SAM : s-adenosyl méthionine ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine ; MeTHF : méthyltétrahydrofolate

En ce qui concerne la descendance, les concentrations hépatiques en SAM des femelles à J21 et des mâles à J65 sont augmentées pour les ratons issus des pères carencés par rapport au groupe contrôle. Les différences ne sont plus présentes à J180, aussi bien chez les femelles que les mâles (**Figure 38A**). Les concentrations en SAH ne varient pas quel que soit l'âge des ratons ou leur sexe, si ce n'est que la concentration est augmentée à J65 pour les ratons mâles issus des pères carencés (**Figure 38A**). Le *ratio* SAM/SAH augmente chez les femelles à J21 et tend à diminuer chez les mâles du même âge (**Figure 38B**). Dans le foie des mâles issus de pères carencés, on observe une accumulation d'Hcy à partir de J65 et ce jusqu'à J180, alors qu'elle diminue chez les femelles issues de pères carencés à J65 (**Figure 38C**). Les concentrations en Met ne semblent affectées ni par le régime paternel, ni l'âge et le sexe des ratons (**Figure 38C**). On observe une tendance à l'augmentation de la concentration du MeTHF chez les femelles issues de pères carencés dès J21 et jusqu'à J65. Pour les ratons mâles, cette différence significative est observée à J65 uniquement (**Figure 38D**). Des différences mâle/femelle sont observées et concernent les dosages de la SAM et de la SAH à partir de J65 (**Figure 38A**), mais aussi pour le *ratio* SAM/SAH à J21 et J65 (**Figure 38B**). De plus, les variations de concentrations en Hcy et Met sont plus importantes chez les mâles, quel que soit leur âge (**Figure 38C**). Ceci est également le cas pour les concentrations en MeTHF (**Figure 38D**).



**Figure 38 : Mesure des concentrations hépatiques des intermédiaires métaboliques de la voie des monocarbone chez la descendance.**

Concentrations hépatiques (A) en SAM et SAH, (B) ratio SAM/SAH, (C) concentrations en Hcy et Met, (D) en MeTHF.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (dosage, sexe).

**Abréviations :** Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; SAH : S-adénosyl homocystéine ; SAM : S-adénosyl méthionine ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine ; MeTHF : méthyltétrahydrofolate

### 3. CONCLUSION

Cette première étape nous a permis de mettre en place et de caractériser notre modèle animal de carence en donneurs de méthyle d'origine paternelle. Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées aux effets de ces carences du père sur le développement de la progéniture. Les études antérieures reposent principalement sur une carence en vitamine B9 et la concentration en acide folique dans le régime contrôle est habituellement de 2 mg/kg, tout comme dans nos conditions expérimentales. En revanche, les concentrations en folate dans les régimes carencés varient selon les auteurs de 0 mg/kg (Kim *et al.*, 2011, 2013; Swayne *et al.*, 2012; Mejos *et al.*, 2013; Tomizawa *et al.*, 2015; Sahara *et al.*, 2019), 0,2 mg/kg (McCoy *et al.*, 2018), 0,3 mg/kg (Lambrot *et al.*, 2013; Ly *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017) jusqu'à 0,5 mg/kg (Sabet *et al.*, 2016). Dans notre étude, la concentration retenue était de 0,382 mg/kg d'acide folique dans la nourriture carencée, ce qui est en adéquation avec la littérature.

Ces premiers résultats basés sur les paramètres morphométriques et le dosage des intermédiaires métaboliques de la voie des monocarbones laissent supposer que la carence périconceptionnelle en donneurs de méthyle du père pourrait entraîner des effets à long terme, et selon un effet dépendant du sexe. D'après nos observations, le poids plus élevé des ratons issus des pères carencés, associé à un poids plus faible des testicules, pourraient être associés à des désordres métaboliques et de perturbation de l'homéostasie en folates dans les gonades. Nous avons donc poursuivi notre étude par la mesure des paramètres de fertilité et l'exploration du métabolisme des monocarbones chez les ratons mâles, ainsi que le contenu en petits ARN dans le sperme. Les résultats font l'objet de la deuxième partie de ce chapitre.

**Partie 2 : Conséquences de la  
carence paternelle en donneurs de  
méthyle sur les testicules et la  
fertilité de la descendance**

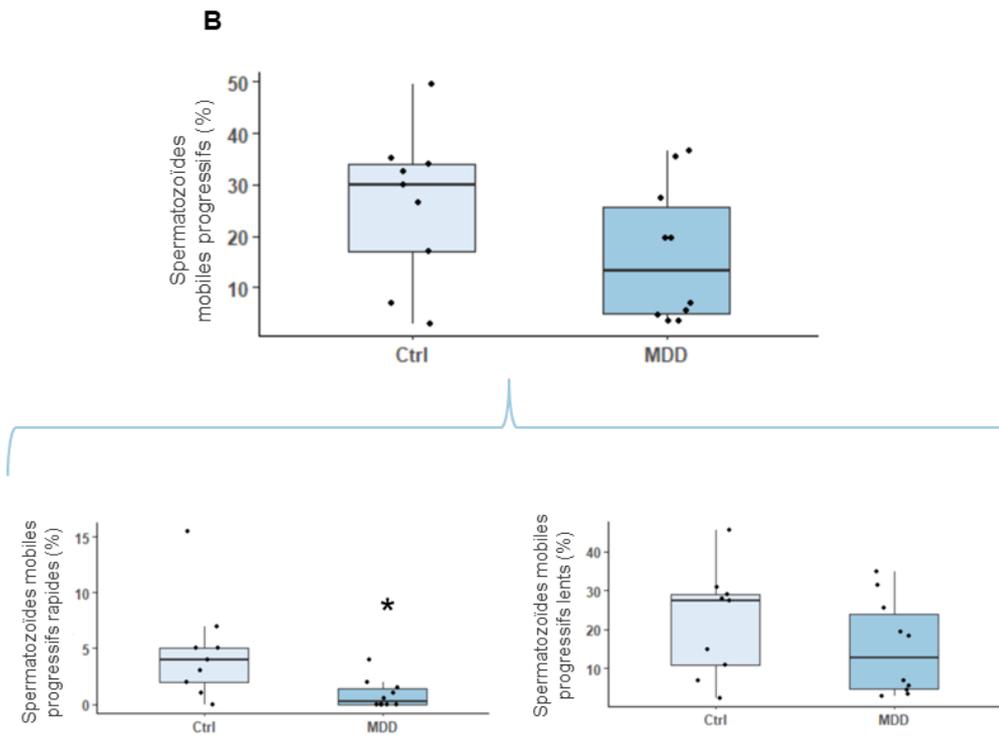
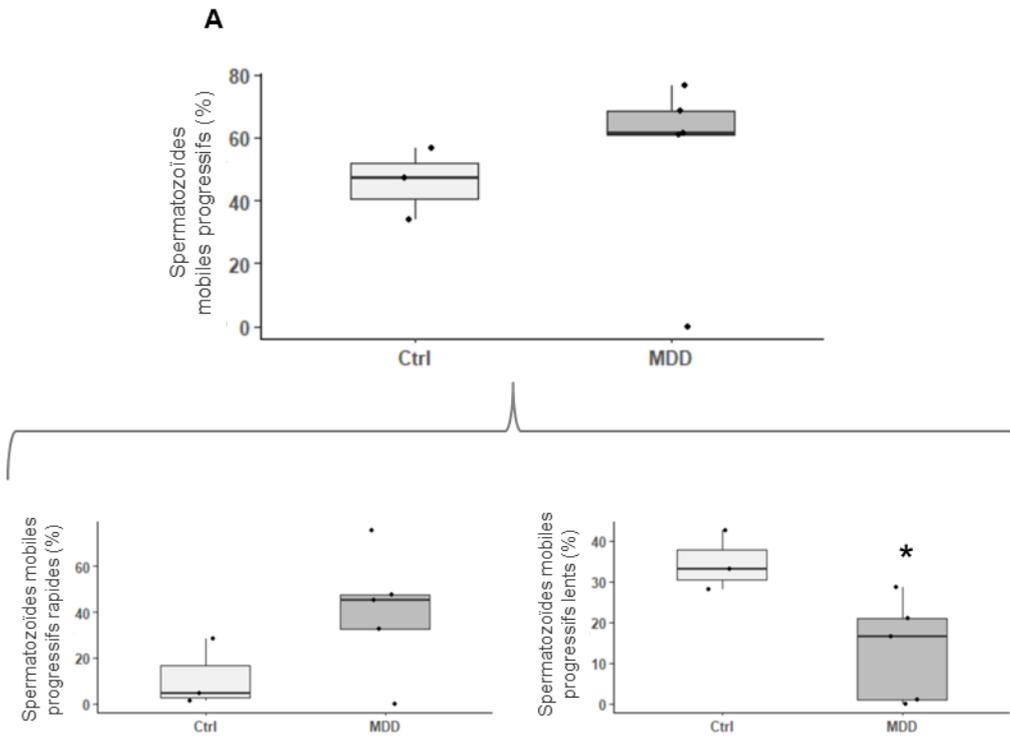
## 1. MESURE DES PARAMETRES DE FERTILITE CHEZ LES PERES ET LA DESCENDANCE

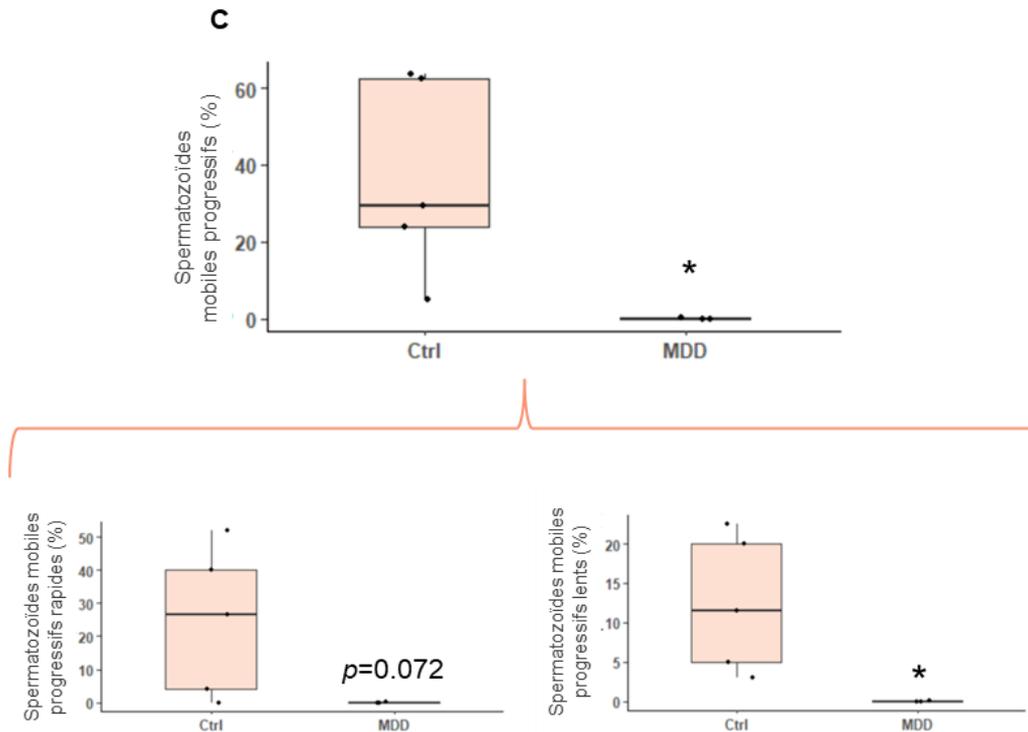
L'analyse de différents paramètres du sperme chez l'Homme repose sur les normes de l'OMS (Cooper *et al.*, 2010) qui regroupent le volume spermatique (mL), la concentration en spermatozoïdes (millions/mL), la mobilité (totale et progressive, exprimée en %), ainsi que le pourcentage de spermatozoïdes à morphologie normale (d'après la classification de Krüger, ou celle de David modifiée avec un seuil à 23%) (Auger *et al.*, 2016). Parmi ces données, seul le volume spermatique n'a pu être déterminé dans notre étude du fait de la méthode de prélèvement des spermatozoïdes. En effet, comme décrit dans la section *Matériel et Méthodes*, les spermatozoïdes sont prélevés directement de l'épididyme après mise à mort de l'animal. L'ensemble de ces analyses a été réalisé en aveugle par un pharmacien biologiste.

La concentration en spermatozoïdes reflète non seulement la production par les testicules mais aussi la perméabilité des canaux post-testiculaires, l'efficacité de contraction des épидидymes et des canaux déférents, l'efficacité de l'érection et de l'éjaculation (Guide de l'OMS 2021 sur l'analyse du sperme). La quantité de spermatozoïdes dans les échantillons utilisés pour réaliser la mobilité ne montre aucune différence chez les pères, ni chez la descendance.

Selon le guide de l'OMS, la mobilité des spermatozoïdes est classée en 4 catégories : les spermatozoïdes progressifs rapides ( $\geq 25 \mu\text{m}/\text{sec}$ ), les progressifs lents ( $5 - 25 \mu\text{m}/\text{sec}$ ), les non progressifs ( $< 5 \mu\text{m}/\text{sec}$ ) et les immobiles. Les 2 catégories de progressifs rapides et lents peuvent être regroupées en une seule : les mobiles progressifs.

Chez les pères, la carence en donneurs de méthyle impacte les spermatozoïdes mobiles progressifs lents uniquement, la mobilité progressive rapide et la mobilité générale n'étant pas affectées (**Figure 39A**). Concernant la descendance à J65, on retrouve les mêmes résultats, à la seule différence que ce sont les spermatozoïdes progressifs rapides qui sont affectés chez les ratons issus des pères carencés vs contrôles (**Figure 39B**). A J180, l'atteinte semble encore plus forte, avec une diminution de la mobilité progressive (rapide et lente) chez les ratons issus des pères carencés (**Figure 39C**).





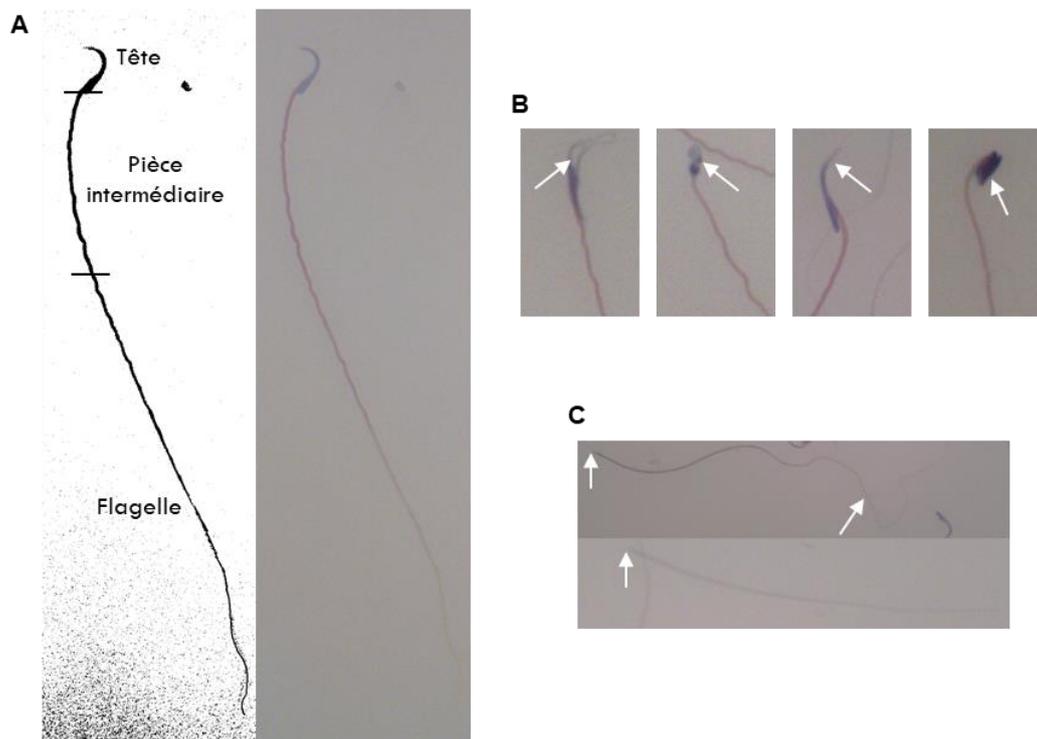
**Figure 39 : Impact de la carence en donneurs de méthyle sur la mobilité des spermatozoïdes.**

La mobilité des spermatozoïdes a été évaluée chez les pères et la descendance à différents âges. Mobilité (A) des pères, (B) de la descendance à J65 et (C) à J180.

Les graphiques représentent les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> Quartile, ainsi que la médiane ; N=5 ; n=5-10 ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé

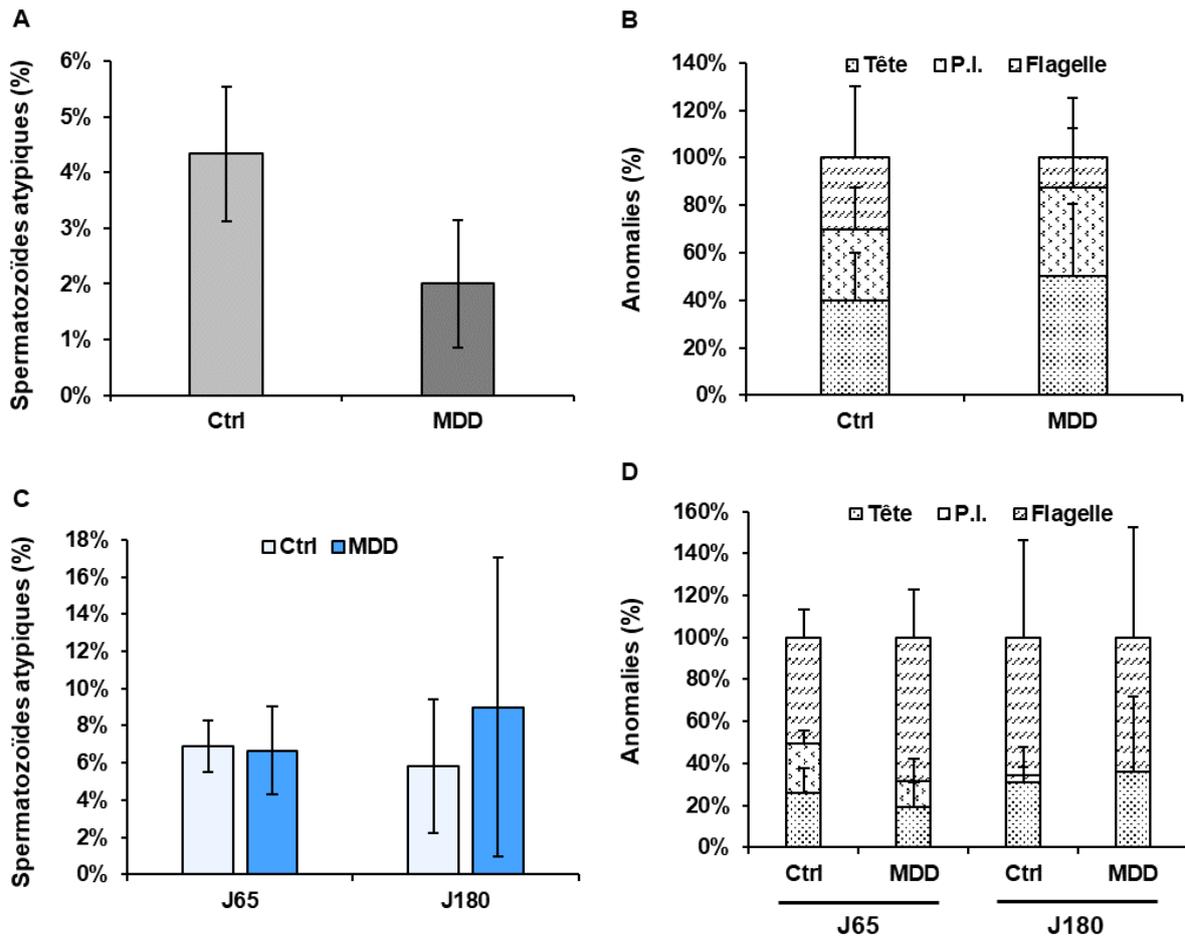
Enfin, le dernier paramètre de fertilité mesuré correspond à la morphologie des spermatozoïdes. Pour cela, les frottis réalisés ont été colorés au Papanicolaou. Cette coloration permet de réaliser une étude morphologique des spermatozoïdes ou spermocytogramme (**Figure 40**). Elle associe l'Hématoxyline de Harris, qui permet de colorer les noyaux cellulaires, à 2 colorants de Papanicolaou, Orange G 6 et EA-50, qui colorent le cytoplasme (Marshall, 1983). L'étude de la morphologie a été réalisée selon la classification de Kruger.



**Figure 40 : Exemple de morphologies spermaticques observées dans le cas d'une carence paternelle en donneurs de méthyle.**

Les spermatozoïdes sont composés de 3 parties différentes : la tête, la pièce intermédiaire et le flagelle. (A) Morphologie physiologique avec une tête en forme de crochet. Anomalies (B) de la tête, (C) de la pièce intermédiaire et du flagelle pouvant être observées.

L'analyse des frottis spermaticques ne révèle aucune différence significative sur la morphologie de ces derniers, aussi bien chez les pères que la descendance à J65 et J180 (**Figure 41A-D**). Les pourcentages de spermatozoïdes typiques et atypiques sont pris en compte ainsi que les anomalies des différentes parties les constituant : la tête, la pièce intermédiaire (P.I.) et le flagelle. Ces résultats sont en accord avec ceux des lames histologiques qui ne montrent aucune altération de la spermatogenèse chez les pères et la descendance (**Figure 42**). Cependant, un passage de cellules germinales dans les tubules séminifères a été observé chez 80% des pères carencés contre 0% chez les pères contrôles, et chez 75% des ratons à J180 du groupe MDD contre 40% chez les ratons du même âge du groupe témoin.

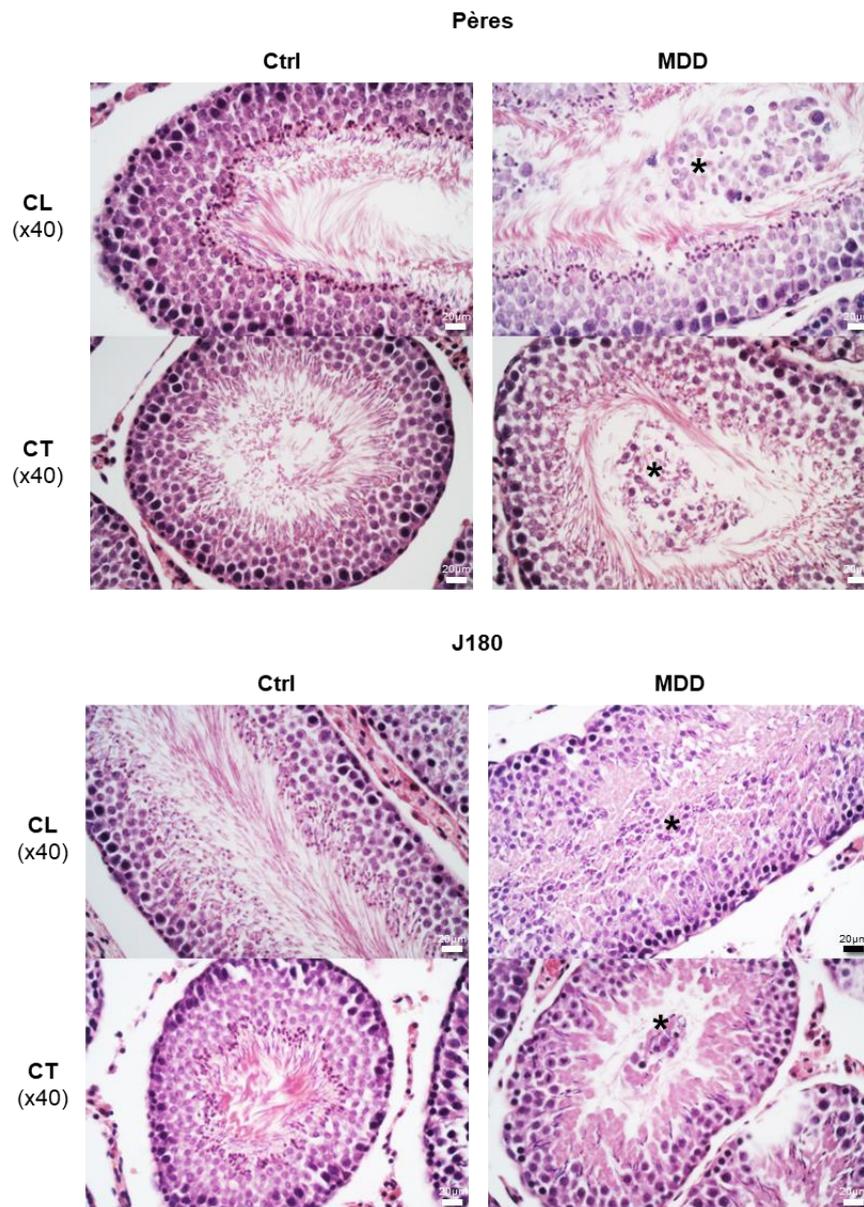


**Figure 41 : Morphologie spermatique des pères et de la descendance à différents âges.**

La morphologie des spermatozoïdes comprend le pourcentage de spermatozoïdes atypiques (A, C) et les anomalies de formation des différentes parties qui le compose (B, D). Les résultats des pères sont présentés en (A, B) et ceux de la descendance en (C, D).

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=3-5 ; n=3-5 ; t-test.

*Abbréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; P.I. : pièce intermédiaire



**Figure 42 : Morphologie des tubules séminifères après coloration histologique HES.**

Les images ont été prises à un grossissement x40. L'échelle présente en bas à droite de chaque image représente 20  $\mu\text{m}$ . L'étoile (\*) correspond au passage des cellules germinales dans la lumière des tubules.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; CL : coupe longitudinale ; CT : coupe transversale ; Sz : spermatozoïdes ; Lu : lumière du tubule

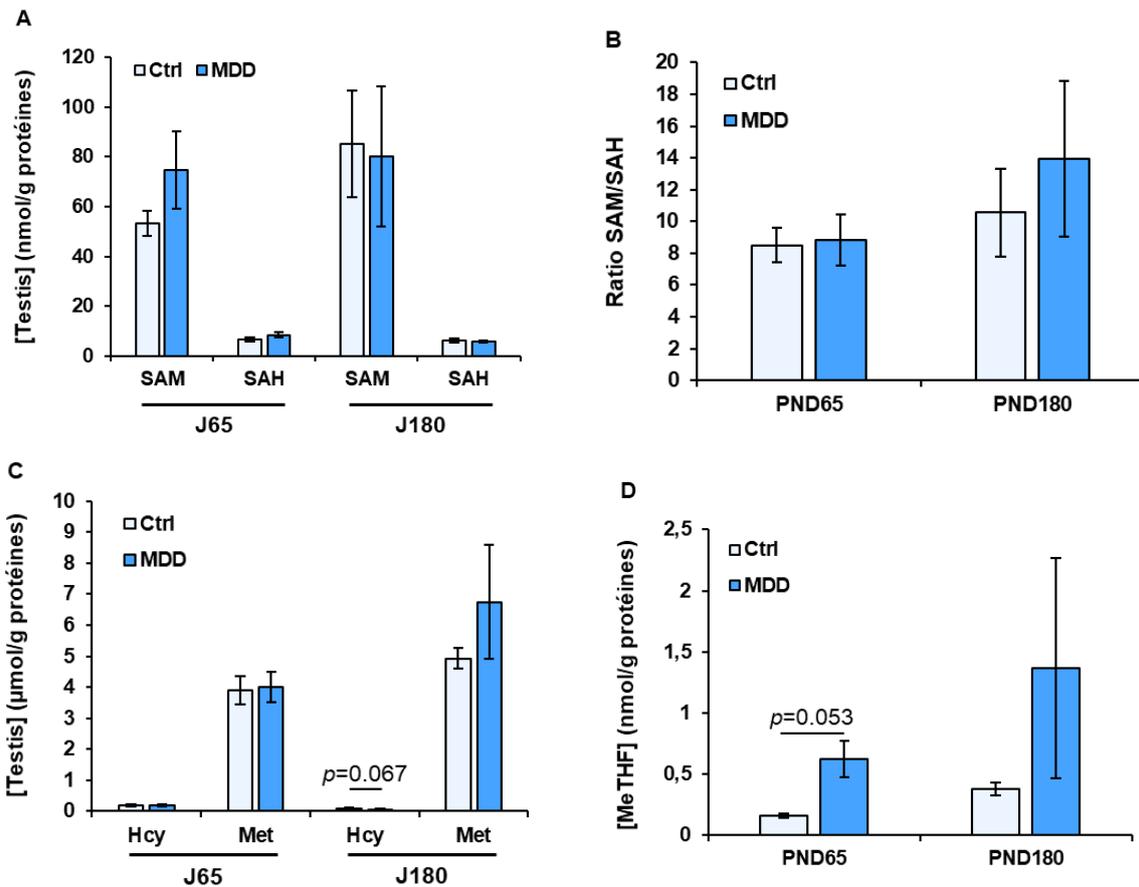
Afin de définir si une carence en donneurs de méthyle peut impacter l'homéostasie en folates dans les testicules, nous avons réalisé les dosages des intermédiaires métaboliques de la voie des monocarbone dans les testicules des pères et de la descendance à J65, ainsi que la mesure du niveau d'expression des transporteurs des folates : *Slc46a1* (PCFT), *Slc19a1* (RFC), et *Folr1* (FR $\alpha$ ) dans les échantillons tissulaires. Nous avons également analysé l'expression de *StAR* et des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, à savoir *Cyp19a1* (P450 Aromatase) et *Hsd3b2* (3b-HSD2), qui interviennent de manière importante dans la spermatogénèse et la régulation de ces voies métaboliques dans les testicules. Les concentrations circulantes en testostérone (T) et hormones gonadotropes (LH

et FSH) ont également été mesurées. Enfin, nous avons également étudié le contenu en petits ARNs dans le sperme des pères et de la descendance afin de mieux comprendre les mécanismes de transmission sous-jacents au développement probable de pathologies à l'âge adulte.

## 2. MESURE DES INTERMÉDIAIRES MÉTABOLIQUES DE LA VOIE DES MONOCARBONES DANS LES TESTICULES

Les dosages tissulaires montrent une tendance à la diminution de la concentration en MeTHF chez les pères carencés par rapport aux pères contrôles ( $p=0.060$ ). En revanche, le *ratio* SAM/SAH ( $p<0.05$ , données non présentées) augmente de manière significative chez les pères carencés.

Chez les rats, les concentrations en SAM et SAH ne montrent pas de variation significative entre les différents groupes (**Figure 43A-C**). Bien qu'il existe une grande variabilité dans les mesures effectuées, les concentrations en MeTHF dans les échantillons de testicules des rats issus des pères carencés tendent à augmenter par rapport aux contrôles (**Figure 43D**). À l'inverse, la concentration en Hcy à J180 dans les testicules des rats issus des pères carencés tend à diminuer par rapport au groupe contrôle (**Figure 43C**).



**Figure 43 : Mesure des concentrations des intermédiaires métaboliques de la voie des monocarbone dans les testicules des ratons à J65 et J180.**

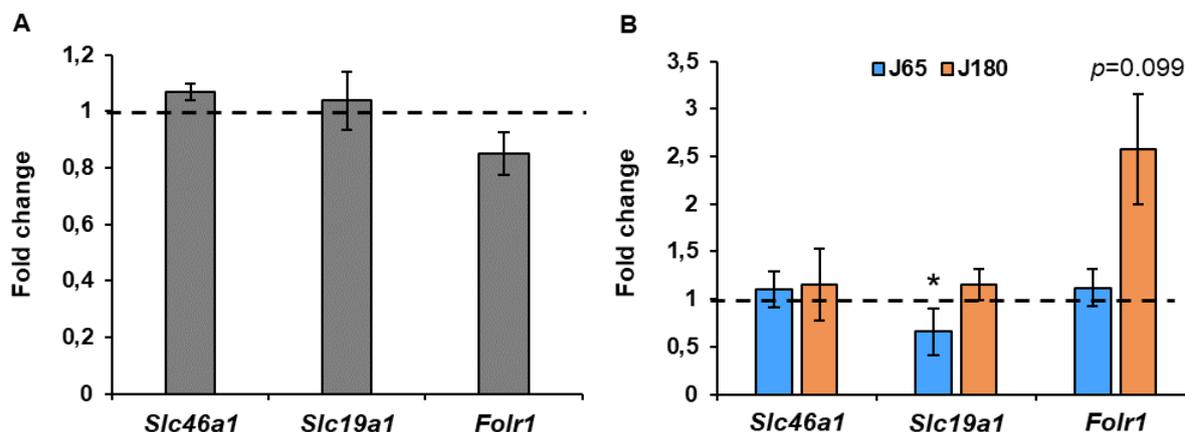
Concentration (A) en SAM et SAH, (B) *ratio* SAM/SAH, (C) concentrations en Hcy et Met, (D) en MeTHF dans les testicules de la descendance.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=4-10. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

*Abbreviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; SAH : S-adenosyl homocystéine ; SAM : S-adenosyl méthionine ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine ; MeTHF : méthyltétrahydrofolate

### 3. NIVEAU D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DES FOLATES DANS LES TESTICULES

Les données de la littérature concernant les modalités d'expression des récepteurs aux folates dans les testicules sont très parcellaires. Les analyses par RT-qPCR réalisées dans les échantillons de testicules des pères ont permis de vérifier la présence des 3 récepteurs (PCFT, RFC et FR $\alpha$ ) dans ces tissus, les niveaux d'expression n'étant pas affectés par la carence (**Figure 44A**). Chez les ratons, la présence de ces 3 récepteurs a pu être confirmée dans les échantillons tissulaires, les niveaux d'expression de *Slc19a1* (RFC) et de *Folr1* (FR $\alpha$ ) étant en augmentation au cours de la croissance entre J65 et J180. De plus, concernant *Folr1* (FR $\alpha$ ), le niveau d'expression à J180 semble plus élevé chez les ratons issus des pères carencés (**Figure 44B**).



**Figure 44 : Mesure du niveau d'expression des récepteurs au folate dans les testicules des pères et de la descendance.**

Niveau d'expression mesuré par RT-qPCR par rapport au groupe contrôle des récepteurs au folate dans les testicules (A) des pères, et (B) de la descendance à J65 et J180.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

*Abréviations* : *Slc49a1* : gène codant pour PCFT ; *Slc19a1* : gène codant pour RFC ; *Folr1* : gène codant pour FR $\alpha$

#### 4. MESURE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN LH, FSH ET TESTOSTERONE

Les concentrations circulantes en LH, FSH et testostérone (T) ont été mesurées dans les plasmas des pères et de leurs descendants (**Tableau X**). En ce qui concerne la LH, nous observons une augmentation de la concentration plasmatique chez les pères carencés, et une diminution chez leur descendance à J180. A l'inverse, les concentrations de FSH sont nettement diminués chez les pères alors qu'ils augmentent de manière significative chez la descendance à J65 et J180. Les mesures des concentrations plasmatiques en T ne semblent pas affectées par la carence, que ce soit chez les pères ou la descendance.

Le calcul des rapports de concentrations LH/T et FSH/T permettent d'estimer, respectivement, les fonctions de production de testostérone des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli. Le rapport LH/T ne montre aucune différence significative chez les pères et les ratons, tout comme le rapport FSH/T chez la descendance. Cependant, le rapport FSH/T diminue fortement chez les pères carencés par rapport aux pères ayant reçu le régime contrôle.

**TABEAU X : MESURES PLASMATIQUES DES CONCENTRATIONS DE LH, FSH ET TESTOSTERONE**

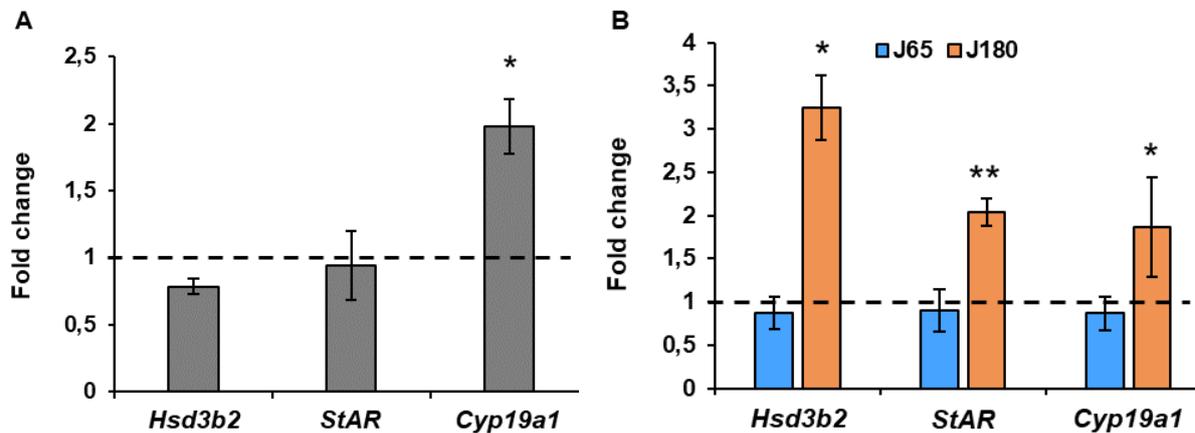
Paramètres	Pères		J65		J180	
	Ctrl	MDD	Ctrl	MDD	Ctrl	MDD
<b>LH (mIU/mL)</b>	4,6 ± 0,25	6,8 ± 0,22 <sup>a</sup>	4,4 ± 1,01	4,2 ± 0,40	4,6 ± 0,43	2,0 ± 0,87 <sup>c</sup>
<b>FSH (ng/mL)</b>	57,4 ± 9,9	6,8 ± 2,4 <sup>a</sup>	25,4 ± 5,2	43,5 ± 3,95 <sup>b</sup>	27,2 ± 7,2	48,3 ± 7,4 <sup>c</sup>
<b>T libre (nmol/L)</b>	10,4 ± 1,5	18,1 ± 3,8	15,15 ± 2,05	14,7 ± 2,6	13,45 ± 2,5	20,4 ± 3,9
<b>Ratio LH/T</b>	2,3 ± 0,75	1,08 ± 0,21	1,3 ± 0,36	0,82 ± 0,18	0,97 ± 0,19	0,81 ± 0,27
<b>Ratio FSH/T</b>	20,0 ± 5,3	2,1 ± 1,05 <sup>a</sup>	6,3 ± 1,7	10,8 ± 2,7	8,9 ± 2,6	9,8 ± 2,9

a : statistiquement différent des pères Ctrl ; b : statistiquement différent des J65 Ctrl ; c : statistiquement différent des J180 Ctrl ; les valeurs correspondent à la moyenne ± S.E.M. ; N=5, n=4-10 ;  $p < 0.05$  : *t*-test. *Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; T : testostérone ; LH : hormone lutéinisante ; FSH : hormone folliculostimulante.

## 5. MESURE DE L'EXPRESSION DE STAR ET DES ENZYMES CLES DE LA STEROÏDOGENESE

Les niveaux d'expression de *StAR*, *Cyp19a1* (P450 Aromatase) et *Hsd3b2* (3 $\beta$ -HSD2) ont été mesurés par RT-qPCR dans les extraits tissulaires des testicules des pères et leur descendance. Chez les pères carencés, s'il n'existe pas de variation d'expression pour les gènes *Hsd3b2* et *StAR*, le niveau d'expression de *Cyp19a1* est 2 fois plus élevé par rapport aux pères témoins (**Figure 45A**).

Concernant la descendance, des différences significatives des niveaux d'expression à J180 de ces 3 paramètres ont été mesurées chez les rats carencés par rapport au groupe contrôle. L'expression du gène *Hsd3b2* est triplée, et augmente d'un facteur 2 dans les cas de pour les gènes *StAR* et *Cyp19a1* (**Figure 45B**), mais dans un degré moindre pour ce dernier.



**Figure 45 : Mesure du niveau d'expression de StAR et des enzymes clés impliquées dans la stéroïdogénèse dans les testicules des pères et de la descendance.**

Niveau d'expression par rapport au groupe contrôle des enzymes de la stéroïdogénèse dans les testicules (A) des pères, et (B) de la descendance à J65 et J180.

Les graphiques représentent la moyenne ± SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

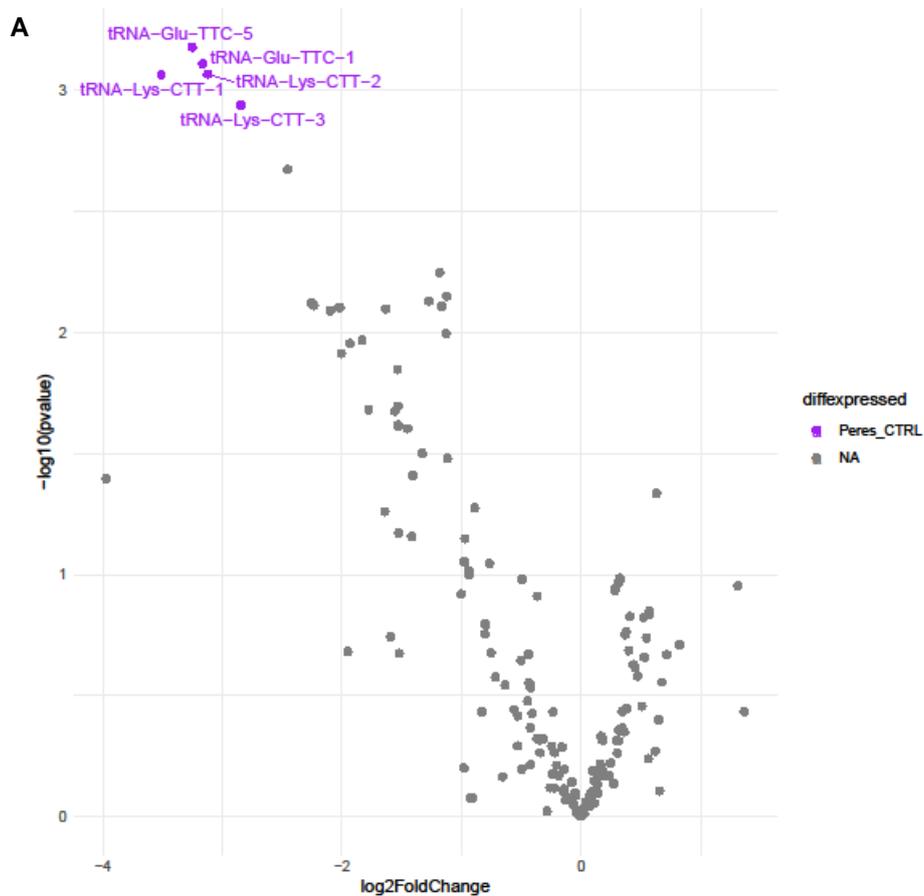
*Abréviations* : *Hsd3b2* : gène codant pour la 3 $\beta$ -HSD2 ; *StAR* : gène codant pour la StAR ; *Cyp19a1* : gène codant pour l'aromatase

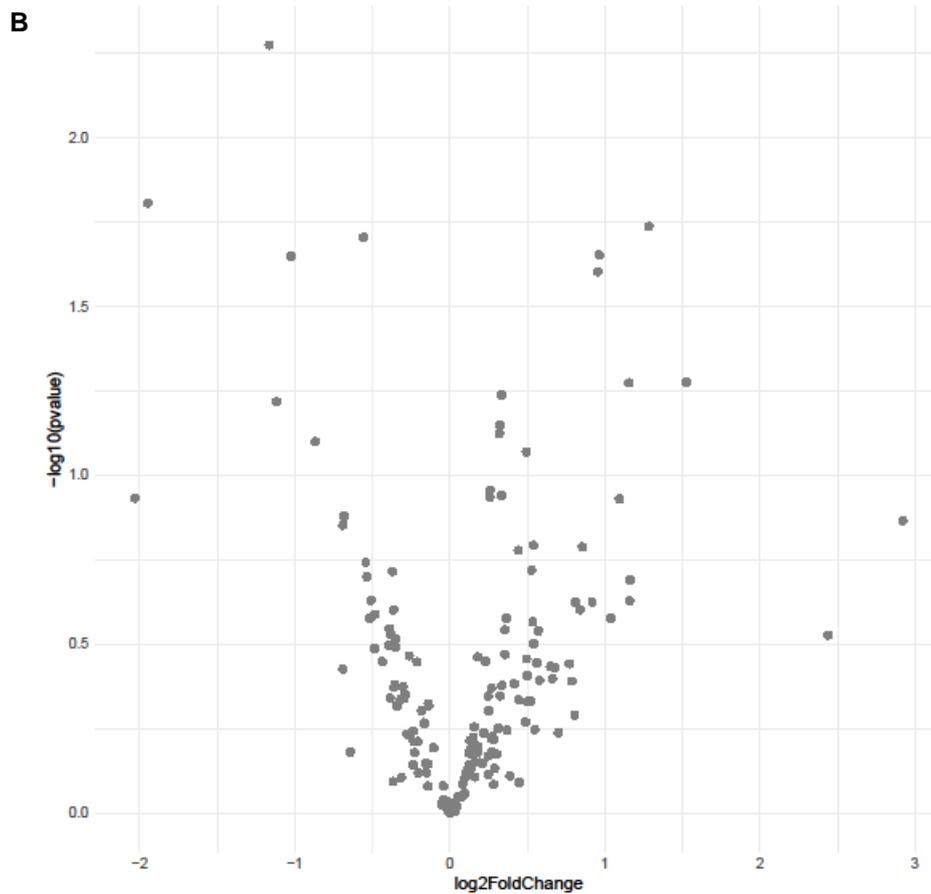
## 6. ANALYSE DU CONTENU EN PETITS ARNS DU SPERME DES PERES ET DE LA DESCENDANCE A J65

Bien que l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes soit essentielle, l'ensemble du contenu du noyau joue un rôle dans la qualité de la reproduction, le développement embryonnaire et la santé de la descendance. Le sperme contient majoritairement des petits ARNs comme les fragments d'ARNt, les miARNs et les piRNA, ainsi que des ARNm. L'étude de ces petits ARNs a été réalisée afin de comprendre quels sont, à plus long terme, les déterminants transmis pouvant influencer le développement de la descendance. La liste des petits ARNs dérégulés a été déterminée à la suite de l'application d'un *cut-off* :  $p\text{-value} < 0.05$ .

L'analyse des piRNA dans le sperme est non concluante du fait de l'absence de *reads* dans les échantillons. En ce qui concerne les fragments d'ARNt et les miARNs, les analyses statistiques différentielles ont pu être réalisées.

Chez les pères, 5 fragments d'ARNt apparaissent dérégulés dans le sens d'une baisse : 2 pour celui du glutamate (Glu) et 3 pour celui de la lysine (Lys) ( $p < 0.05$ ) (**Figure 46A**), alors qu'aucune différence significative n'est observée dans le sperme de la descendance à J65 (**Figure 46B**).





**Figure 46 : Volcano plot des fragments d'ARNt dérégulés dans le sperme.**

Différences d'expression des fragments d'ARNt dans le sperme (A) des pères, et (B) de la descendance à J65. Les graphiques représentent les *volcano plot* (x = fold change ; y = significativité statistique) ; N=4-5, n=1-2. Points colorés (•) : différences statistiquement significatives d'après les tests statistiques appliqués (voir section *Matériel et méthodes*).

*Abréviations* : Ctrl : régime standard

En ce qui concerne les miARNs contenus dans le sperme des pères, 49 miARNs sont dérégulés dont 20 à la hausse et 29 à la baisse par rapport aux pères témoins ( $p < 0.05$ ). Dans le sperme de la descendance, nous retrouvons 13 miARNs dérégulés dont 6 à la hausse et 7 à la baisse par rapport aux descendants des pères contrôles ( $p < 0.05$ ). Les miR-206-3p et miR-129-2-3p sont retrouvés dérégulés chez les pères et la descendance. Pour le premier, il est régulé à la hausse chez les pères et la descendance alors que le deuxième est diminué chez les pères et augmenté chez la descendance (**Tableau XI**).

**TABLEAU XI : LISTE DES MIARNs DEREGULES DANS LE SPERME**

Pères MDD				J65 MDD			
Up	log <sub>2</sub> (FC)	Down	log <sub>2</sub> (FC)	Up	log <sub>2</sub> (FC)	Down	log <sub>2</sub> (FC)
<b>miR-129-2-3p</b>	6,1	<b>miR-206-3p</b>	-4,4	<b>miR-206-3p</b>	2,8	miR-101b-3p	-0,6
miR-205	1,3	miR-1b	-2,7	<b>miR-129-2-3p</b>	6,1	miR-376b-3p	-5,8
miR-221-3p	1,2	miR-1843a-5p	-2,0	miR-298-5p	2,6	miR-883-5p	-4,4
miR-200b-3p	0,9	miR-26b-5p	-0,9	miR-202-5p	2,2	miR-92b-3p	-3,6
miR-221-5p	4,3	miR-142-3p	-2,6	miR-1249	2,7	miR-485-5p	-6,8
miR-346	7,1	miR-3596d	-0,8	miR-298-3p	5,5	miR-293-5p	-3,1
miR-871-3p	1,2	let-7f-5p	-0,8			miR-3065-3p	-2,7
miR-222-3p	0,9	miR-126a-5p	-1,7				
miR-200b-5p	1,3	let-7a-1-3p	-1,2				
miR-200c-3p	0,8	let-7c-2-3p	-1,2				
miR-3585-5p	1,6	miR-30e-5p	-0,7				
miR-872-3p	2,8	miR-98-5p	-1,2				
miR-494-3p	2,5	miR-144-3p	-5,2				
miR-181a-5p	0,7	miR-345-3p	-3,9				
miR-211-5p	3,3	miR-143-3p	-1,2				
miR-3588	0,6	miR-320-3p	-1,3				
miR-125b-5p	0,6	miR-148a-3p	-0,6				
miR-708-5p	5,3	miR-223-3p	-1,0				
miR-27b-5p	2,3	let-7b-5p	-1,3				
miR-652-3p	1,2	miR-203a-5p	-1,3				
		miR-195-5p	-0,9				
		miR-152-3p	-0,9				
		miR-155-5p	-1,4				
		miR-140-5p	-1,4				
		miR-21-5p	-0,5				
		miR-203b-3p	-1,1				
		miR-136-3p	-2,4				
		miR-24-2-5p	-0,8				
		let-7d-3p	-0,9				

Cut-off :  $p < 0.05$

Abréviations : FC : fold change ; miR : miARN ; UP : dérégulés à la hausse par rapport au groupe contrôle ; DOWN : dérégulés à la baisse par rapport au groupe contrôle ; miR en gras : dérégulés chez les pères et la descendance ; MDD : régime carencé.

## 7. CONCLUSION

Cette deuxième étape de notre projet nous a permis de mettre en évidence l'expression des 3 transporteurs des folates dans les testicules, ce qui, à notre connaissance, est très peu décrit dans la littérature. Seuls les travaux de Holm et ses collaborateurs publiés au cours de ces dernières décennies avaient permis de mettre en évidence la présence de FR $\alpha$  dans les organes génitaux de l'homme (Holm *et al.*, 1991, 1993, 1999). Les analyses des intermédiaires métaboliques de la voie des monocarbone dans les testicules de ratons à différents âges constituent également des résultats innovants n'ayant fait l'objet d'aucune publication antérieure. Les variations des concentrations plasmatiques des

gonadotrophines observées pour les pères carencés et leur descendance suggèrent que la carence paternelle en donneurs de méthyle pourrait induire une insuffisance gonadotrope. Enfin, les analyses du *small RNA-seq* montrent que le miR-129-2-3p semble régulé à la hausse aussi bien chez les pères carencés que leur descendance, alors que le miR-206-3p serait régulé à la baisse chez les pères et à la hausse dans le sperme de la descendance, ces 2 miR étant impliqués dans des mécanismes physiopathologiques du système cardiovasculaires et du milieu cérébral.

Ces premiers résultats laissent supposer qu'une carence périconceptionnelle en donneurs de méthyle du père pourrait entraîner des effets à long terme sur la fertilité des ratons. D'après nos observations, les dérégulations de niveaux plasmatiques des hormones ainsi que des miARNs dans le sperme suggèrent que la carence du père en vitamines B9 et B12 pourrait également impacter le développement cérébral de la descendance. Nous avons donc poursuivi notre étude par la mesure des intermédiaires du métabolisme des monocarbones chez les ratons à J65, ainsi que l'expression de transporteurs des folates, associés à des tests comportementaux pour évaluer les capacités cognitives des ratons. Les résultats font l'objet de la troisième partie de ce chapitre.

**Partie 3 : Conséquences de la  
carence paternelle sur le  
métabolisme cérébral des folates  
et le comportement des rats**

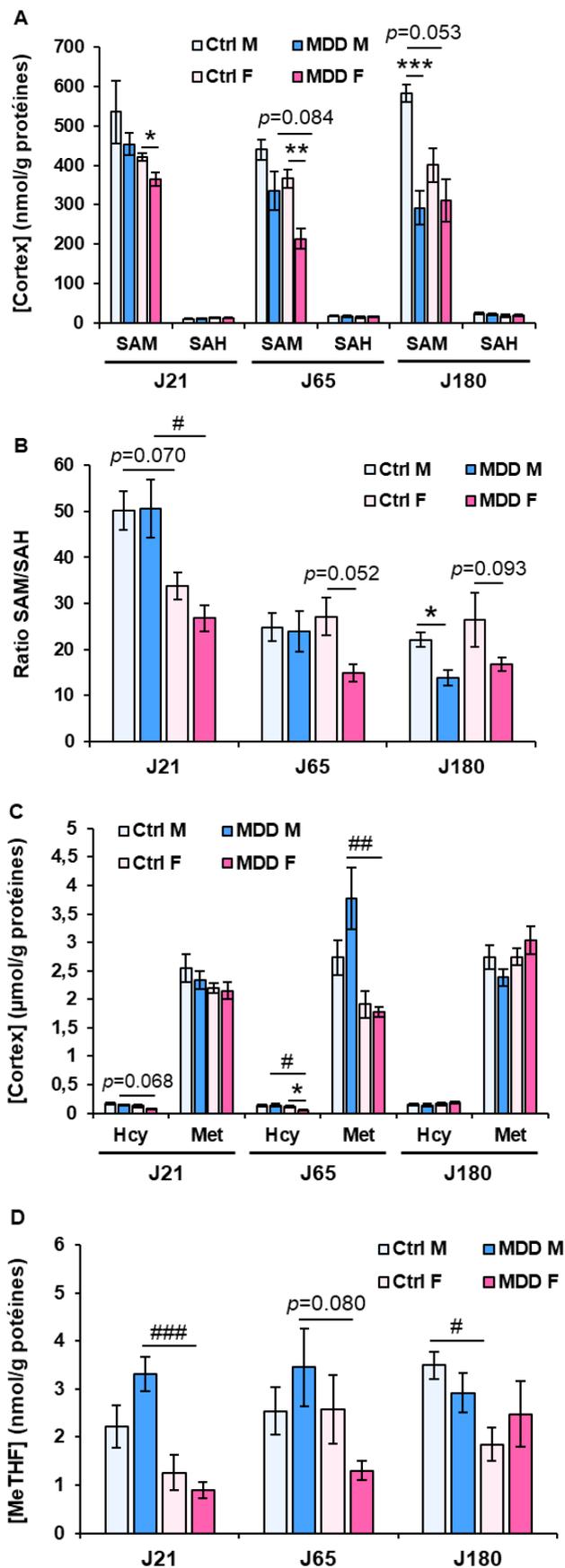
## 1. QUANTIFICATION DES INTERMEDIAIRES METABOLIQUES 1C DANS LE TISSU CEREBRAL DES RATONS

Les dosages des métabolites intervenant dans la voie des monocarbones ont été réalisés dans les échantillons de cortex cérébral des ratons à J21, J65 et J180.

Les concentrations en SAM à J21 et J65 diminuent chez les femelles issues des pères carencés par rapport au groupe contrôle. Cette diminution apparaît plus tardivement, à J180, chez les mâles issus des pères carencés. Aucune différence significative n'est constatée pour les concentrations en SAH, et ce quel que soit l'âge de la descendance (**Figure 47A**). Le *ratio* SAM/SAH est globalement abaissé à J180 chez les ratons du groupe MDD, notamment chez les mâles pour lesquels la variation est significative (**Figure 47B**).

En ce qui concerne les mesures tissulaires des autres métabolites, les concentrations en Met ne montrent aucune variation significative entre les différents groupes. En revanche, la concentration en Hcy chez les femelles du groupe MDD est plus faible par rapport aux femelles témoins à J65 (**Figure 47C**).

Quant au contenu en MeTHF, les valeurs obtenues pour les femelles sont inférieures à celles mesurées pour les mâles de ce même groupe MDD (**Figure 47D**). Des variations en fonction du sexe sont également retrouvées pour les concentrations en SAM, en Hcy et plus particulièrement à J65 chez les ratons carencés, les valeurs mesurées pour ces 2 métabolites étant moins élevées pour les femelles. Cette variation s'observe également pour le *ratio* SAM/SAH à J21.



**Figure 47 : Quantification des intermédiaires 1C dans le cortex cérébral des ratons à différents âges.**

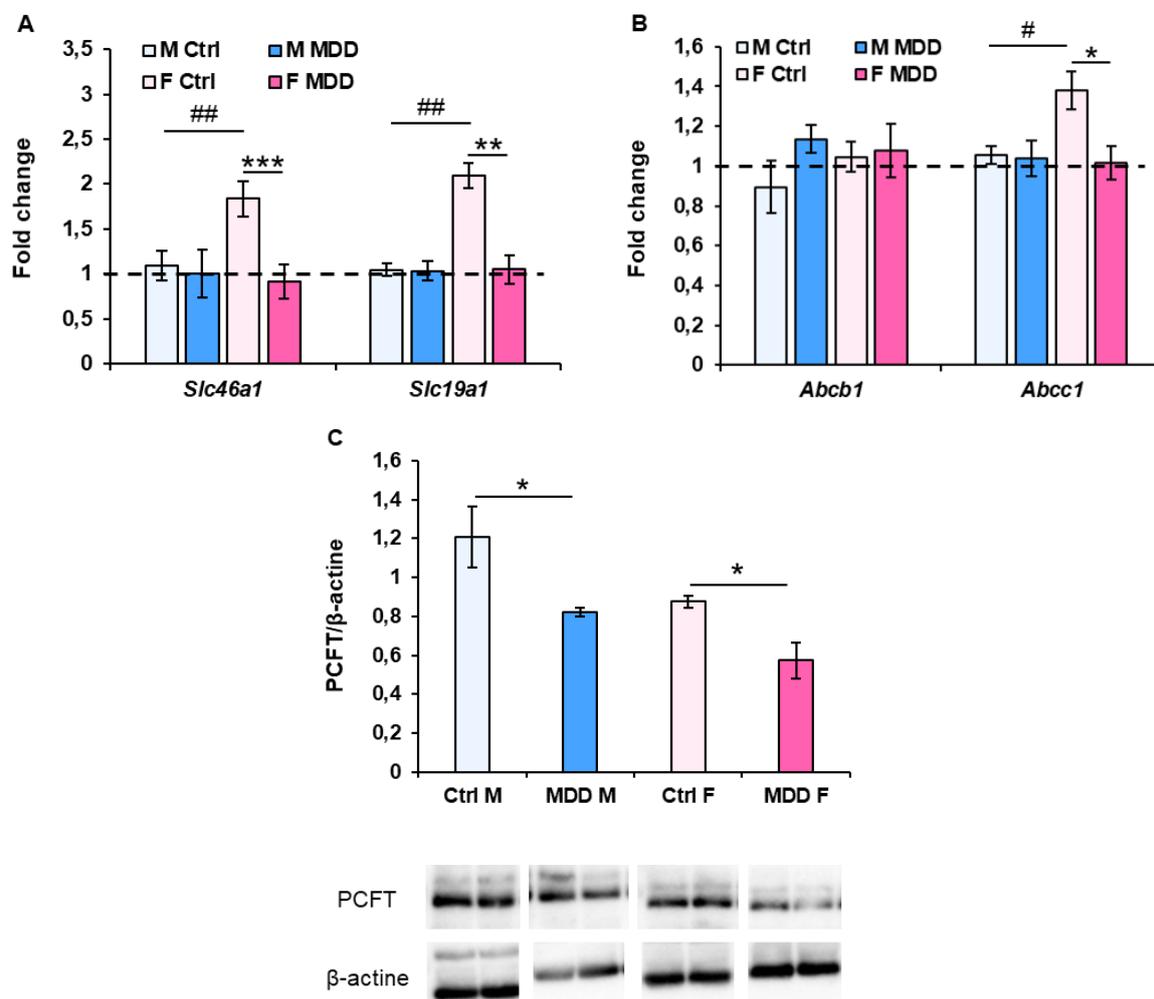
Concentrations (A) en SAM et SAH, (B) ratio SAM/SAH, (C) concentrations en Hcy et Met, et (D) en MeTHF.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=4-10. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (dosage, sexe).

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; SAH : S-adénosyl homocystéine ; SAM : S-adénosyl méthionine ; Hcy : homocystéine ; Met : méthionine ; MeTHF : méthyltétrahydrofolate

## 2. ÉTUDE DU TRANSPORT DES FOLATES DANS LE CERVEAU DES RATONS

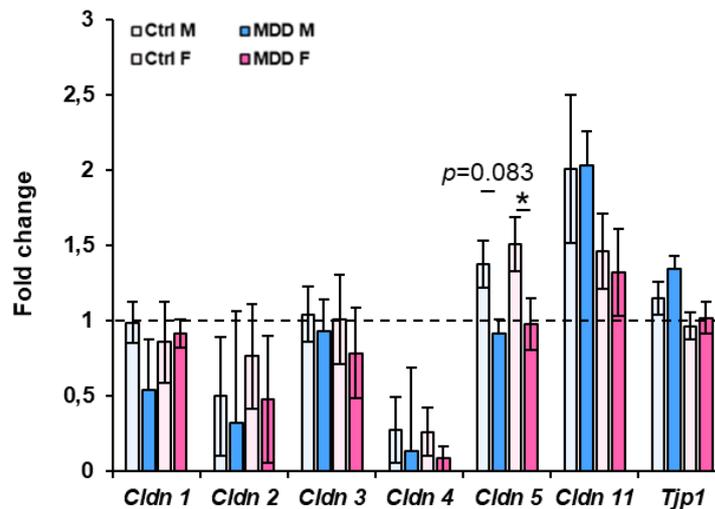
Nous avons analysé l'expression des gènes codant pour les transporteurs des folates exprimés dans la BHE : *Slc46a1* (PCFT) et *Slc19a1* (RFC), ainsi que les transporteurs ABC : *Abcb1* (codant pour la P-gp) et *Abcc1* (codant pour MRP1) qui jouent également un rôle important dans le transfert des folates vers le tissu cérébral. Les mesures effectuées par RT-qPCR montrent une diminution significative du niveau d'expression des 2 transporteurs des folates (**Figure 48A**) ainsi que *Abcc1* (**Figure 48B**) chez les femelles issues des pères carencés. Aucune différence statistique n'est observée en ce qui concerne l'expression du transporteur *Abcb1* (**Figure 48B**). Concernant l'analyse par *Western Blot*, les niveaux protéiques de PCFT sont diminués dans les échantillons des cortex cérébraux de la descendance issue des pères carencés par rapport aux ratons contrôles (**Figure 48C**).



**Figure 48 : Détermination du niveau d'expression des transporteurs dans le cortex des ratons à J65.** Niveau d'expression dans le cortex (A) des récepteurs au folate, (B) des transporteurs ABC. (C) Niveau d'expression de PCFT dans les cortex par analyse *Western Blot*. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (groupe, sexe).

**Abréviations :** Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; *Slc49a1* : gène codant pour PCFT ; *Slc19a1* : gène codant pour RFC ; *Abcb1* : gène codant pour MDR1/P-gp ; *Abcc1* : gène codant pour MRP1

Afin de vérifier l'hypothèse éventuelle d'une altération de la BHE des rats, résultant du régime MDD des pères, nous avons évalué l'expression des claudines et de la protéine ZO-1 dans le cortex cérébral des descendants à J65. Le niveau d'expression de *Cldn5* diminue de manière significative chez les femelles du groupe MDD par rapport au groupe témoin, alors qu'une tendance à la diminution est observée pour les mâles du même groupe. Concernant les autres gènes étudiés, nous n'observons aucune différence significative de l'expression de *Cldn1*, *Cldn2*, *Cldn3*, *Cldn4*, *Cldn11* et de *Tjp1* (gène codant pour la protéine ZO-1) (**Figure 49**).

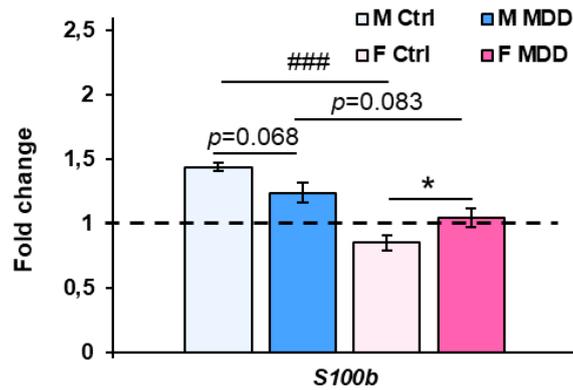


**Figure 49 : Mesure de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la perméabilité de la BHE.**

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (groupe, sexe).

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; *Cldn* : gène codant pour Claudine ; *Tjp1* : gène codant pour ZO-1

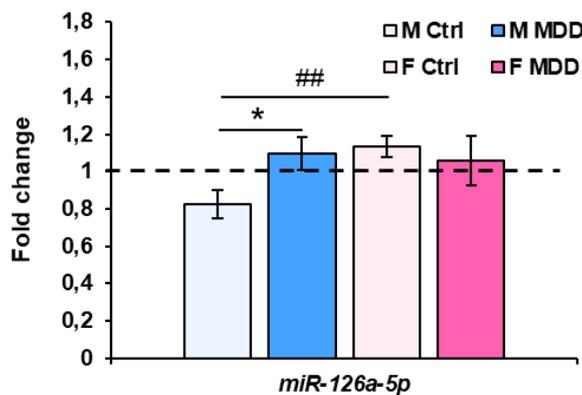
Ces différentes observations suggèrent que la carence d'origine paternelle pourrait impacter l'homéostasie en folates dans le cerveau, consécutive à une altération des modalités de transport des folates et pouvant engendrer une inflammation au niveau cérébral, notamment chez les rats femelles. Nous avons donc mesuré les niveaux d'expression de *S100b*, qui est un marqueur spécifique des phénomènes inflammatoires dans le cerveau. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de *S100b* dans les cortex des femelles du groupe MDD et une tendance à la diminution chez les mâles. Des différences mâle/femelle apparaissent également, les niveaux d'expression étant plus élevés dans le cortex cérébral des mâles contrôles par rapport aux femelles du même groupe (**Figure 50**).



**Figure 50 : Mesure de l'expression de *S100b* dans le cortex de la descendance à J65.**  
 Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$  ; \*\*\*  $p<0,001$  entre les groupes et #  $p<0,05$  ; ##  $p<0,01$  ; ###  $p<0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (groupe, sexe).

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; *S100b* : gène codant pour *S100 $\beta$*

Les travaux de Yu et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que le miR-126a-5p est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la BHE. En effet, lors de processus inflammatoires liés à la démyélinisation, l'expression de ce miR par les cellules de la microglie permet de préserver l'intégrité de la barrière (Yu *et al.*, 2022). De plus, il est également impliqué dans la régulation de la synthèse et la sécrétion de prolactine par l'hypophyse (Zhao *et al.*, 2022). Dans le cadre de notre étude, nous avons mesuré une augmentation significative de l'expression du miR-126a-5p dans le cortex cérébral des mâles issus des pères carencés par rapport aux mâles du groupe contrôle (**Figure 51**).



**Figure 51 : Mesure du niveau d'expression du miR-126a-5p dans le cortex des ratons à J65.**  
 Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$  ; \*\*\*  $p<0,001$  entre les groupes et #  $p<0,05$  ; ##  $p<0,01$  ; ###  $p<0,001$  entre les sexes : ANOVA 2 facteurs (groupe, sexe).

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; miR : miARN

### 3. ANALYSE DU COMPORTEMENT DES RATONS DE LA NAISSANCE A L'AGE ADULTE

Les folates jouent un rôle critique dans le développement cérébral (Craciunescu *et al.*, 2004; Blaise *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2020). Des travaux antérieurs du laboratoire ont pu démontrer qu'une

carence gestationnelle en donneurs de méthyle altère la fonction olfactive (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014b) ainsi que le développement cérébral (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014a; Willekens *et al.*, 2019). En effet, une déficience en folate peut entraîner des complications neurodéveloppementales comme les troubles du spectre autistique (Schlotz *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2012; Surén *et al.*, 2013; Levine *et al.*, 2018), des déficits de l'attention et une hyperactivité (DeVilbiss *et al.*, 2015) mais également des troubles tels que l'anxiété, la dépression, mais aussi l'autisme et la schizophrénie. L'ensemble des tests comportementaux permettront la caractérisation fonctionnelle du modèle de carence d'origine paternelle.

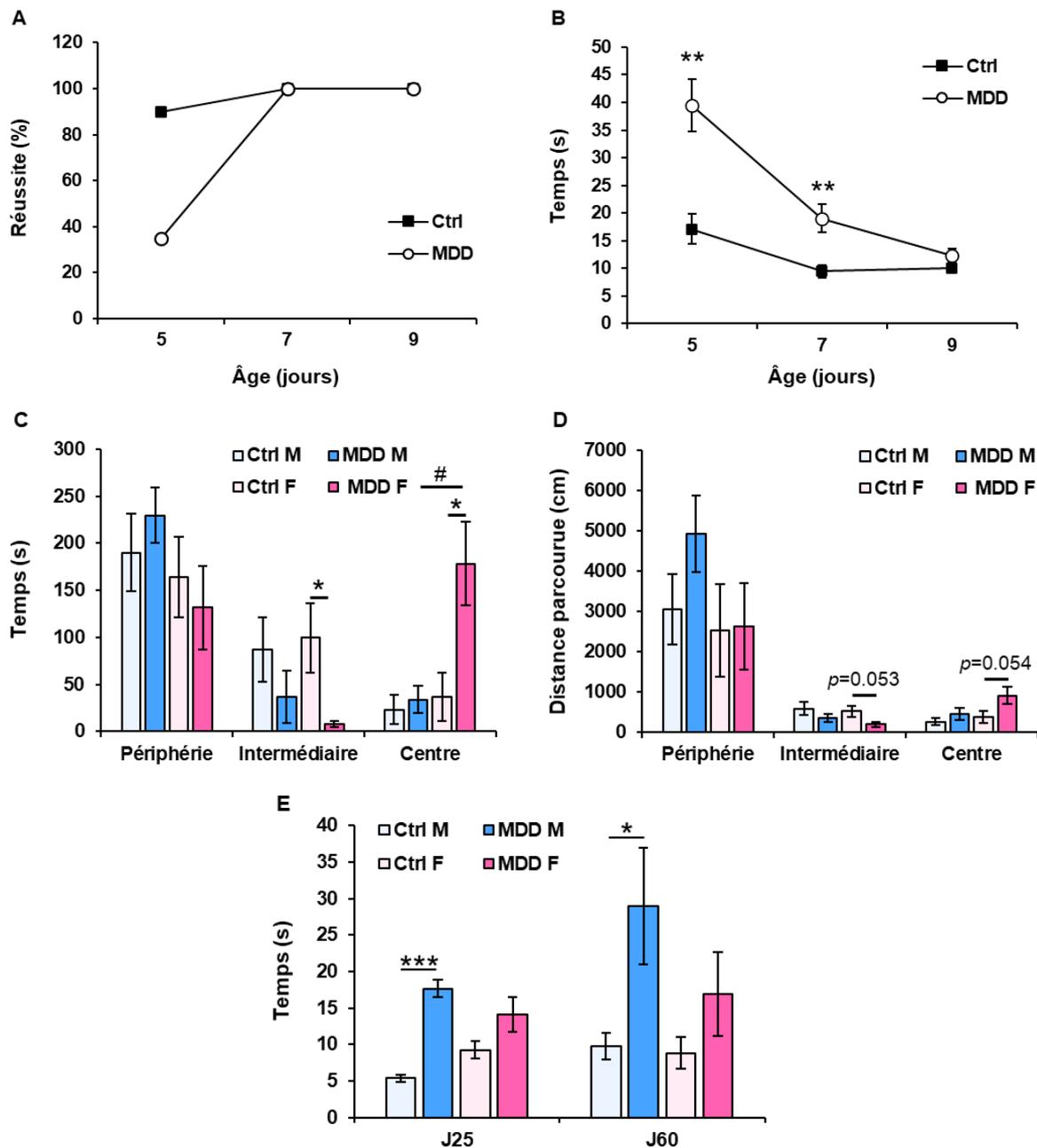
### 3.1. Étude des capacités motrices des ratons

Nous avons étudié les fonctions motrices, dont la locomotion et la coordination des mouvements, chez les ratons, dès l'âge de 5 jours à l'aide du test de la géotaxie négative. Nous avons complété les analyses par la marche sur échelle linéaire et l'*openfield*.

Tout d'abord, la géotaxie négative est un test psychomoteur mettant en jeu la fonction motrice de commande des muscles des membres nécessaires au retournement, ainsi que la coordination des mouvements des membres. Il se base sur le malaise des ratons positionnés la tête en bas sur un plan incliné, ce qui engendre un réflexe de retournement afin de retrouver une position naturelle et préférée qu'est la « tête en haut » (Schroeder *et al.*, 1995). Le réflexe mesuré ici s'acquiert entre la première et la deuxième semaine après la naissance. Les résultats de ce test montrent que les ratons issus des pères carencés réussissent moins le test à J5 par rapport aux ratons du groupe Ctrl (**Figure 52A**), et pour les quelques ratons réussissant à se retourner, le temps nécessaire pour cela est plus que doublé à J5 (**Figure 52B**). A partir de J7, il n'existe plus de différence entre les groupes en termes de réussite du test, cependant les ratons issus des pères carencés mettent toujours deux fois plus de temps à réaliser le test à J7.

Lors du passage des ratons dans le dispositif de l'*openfield*, les femelles issues des pères carencés passent plus de temps dans la zone centrale et moins dans la zone intermédiaire, par rapport aux femelles du groupe Ctrl (**Figure 52C**). Cela concorde avec l'augmentation de la distance parcourue dans les zones susmentionnées (**Figure 52D**). En ce qui concerne les mâles, aucune différence significative n'est observée.

Enfin, le test de marche sur échelle linéaire a été réalisé à 2 âges différents : J25 et J60, chez les mêmes individus. Les femelles du groupe MDD ne présentent aucune différence significative par rapport aux femelles Ctrl, ni en fonction de l'âge. Pour les mâles, nous constatons une augmentation du temps nécessaire pour réaliser le test, aussi bien à J25 qu'à J60. Tout comme pour les femelles, il n'existe pas de différence significative du temps en fonction de l'âge (**Figure 52E**).



**Figure 52 : Évaluation des capacités motrices des rats entre J5 et J60.**

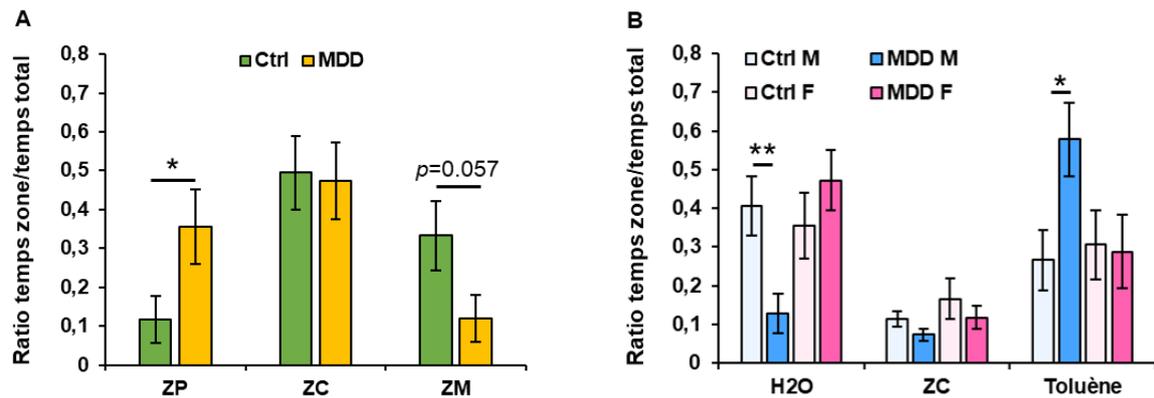
(A) Pourcentage de réussite et (B) temps nécessaire au retournement des rats ; (C) Temps passé et (D) distance parcourue dans les différentes zones de l'openfield ; (E) Temps nécessaire au passage de l'échelle. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=5, n=2-4. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : *t*-test pour la géotaxie négative (A, B), ANOVA 2 facteurs (groupe, sexe) pour l'openfield (C, D), et ANOVA 3 facteurs (groupe, sexe, âge) pour l'échelle (E).

*Abbréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle

### 3.2. Analyse d'autres paramètres comportementaux : l'olfaction, l'anxiété, la mémoire spatiale

La seconde étape de l'analyse comportementale de la descendance a été consacrée à l'étude des performances olfactives, de la mémoire spatiale et des troubles anxieux.

Pour ce qui concerne l'olfaction, 2 tests ont été réalisés à 2 âges différents. Dans le test du *Homing*, nous observons, à J11, une diminution du temps passé dans la zone où se trouve la litière maternelle (ZM) et une augmentation du temps dans la zone avec une litière propre (ZP) pour les rats issus de pères carencés (**Figure 53A**). À J14, il n'existe plus aucune différence significative entre les groupes (données non présentées). Nous avons ensuite procédé au test de discrimination olfactive à J21. Les résultats mettent en évidence une diminution du temps dans la zone où se trouve l'eau et une augmentation dans la zone où se trouve le toluène pour les rats mâles issus des pères carencés. Aucune différence n'est observée pour les femelles (**Figure 53B**).



**Figure 53 : Distribution du temps passer dans les différentes zones lors des tests liés à l'olfaction chez la descendance à J11 et J21.**

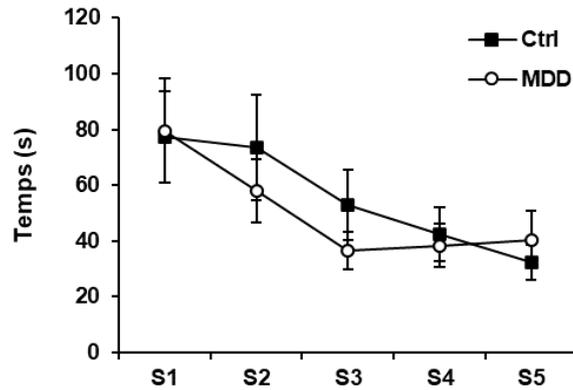
Ratio du temps dans la zone par rapport au temps total (A) du test du « Homing » à J11, (B) du test de discrimination olfactive à J21.

Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  SEM ; N=4-5, n=2-3. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : *t*-test pour le test du Homing (A), ANOVA 2 facteurs (groupe, sexe) pour la discrimination olfactive (B).

*Abbréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; ZP : zone avec odeur neutre/propre ; ZC : zone centrale ; ZM : zone avec odeur maternelle

Pour évaluer l'anxiété des rats, le test du labyrinthe en croix surélevé réalisé à J22 ne montre aucune différence significative pour l'ensemble des paramètres mesurés : temps passé et nombre d'entrées dans les différentes branches (ouvertes, fermées), le nombre de redressement, de *head-deeping*, de fèces et urine (données non présentées).

Concernant la mémoire spatiale, le test utilisé est une adaptation des labyrinthes de Morris et de Cincinnati. Il permet l'étude des capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendantes puisqu'il se base sur les aptitudes des animaux à mémoriser un parcours. avec des repères environnementaux non contrôlés par l'expérimentateur. Comme pour le labyrinthe en croix surélevée, nous n'observons aucune différence en ce qui concerne le labyrinthe aquatique. Le temps, le pourcentage de réussite ainsi que le nombre d'erreur sont similaires entre les groupes (**Figure 54**).



**Figure 54 : Temps nécessaire aux rats pour trouver la sortie du labyrinthe aquatique.**

Temps, en seconde, nécessaire aux rats pour trouver la sortie du labyrinthe aquatique en fonction des séances (S) sur 5 jours consécutifs (1-5) de l'âge de J39 à J43. Le graphique représente la moyenne  $\pm$  SEM ; N=5, n=3-4. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  entre les groupes et #  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$  entre les sexes : *t*-test.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; S : séance/passage des animaux

#### 4. CONCLUSION

Cette troisième partie nous a permis de mettre en évidence l'impact de la carence paternelle en donneurs de méthyle sur le métabolisme cérébral des folates, l'intégrité de la BHE et le comportement de la descendance. Les données obtenues confirment l'hypothèse selon laquelle la carence des pères en période périconceptionnelle pourrait impacter le développement cérébral de la descendance avec un effet dépendant du sexe, déjà mentionné dans les résultats décrits précédemment. Ils suggèrent une plus grande vulnérabilité des rats femelles, notamment en ce qui concerne l'impact sur le niveau d'expression des transporteurs aux folates.

# DISCUSSION

Dans la première partie de notre étude, nous avons mesuré une augmentation du poids corporel des ratons mâles issus des pères carencés par rapport aux mâles témoins, associé à une augmentation du poids du foie à J65 passant de 8,6 g à 10,2 g en cas de carence.

Diverses études se sont intéressées au régime du père en période périconceptionnelle. D'après la littérature, les habitudes alimentaires du père peuvent influencer le poids corporel de la descendance associé à un syndrome métabolique. En effet, des études sur le régime riche en lipides chez le père ont montré une diminution du poids de la descendance dans les premiers jours de vie, tandis qu'il est augmenté à l'âge adulte (Binder *et al.*, 2012a; de Castro Barbosa *et al.*, 2016; Grandjean *et al.*, 2016). De même, l'étude de la restriction calorique chez le père en période périconceptionnelle a permis de mettre en évidence une diminution du poids des ratons après la naissance (McPherson *et al.*, 2016). Dans notre étude, le poids élevé du foie des ratons issus des pères carencés pourrait être associé à une hypertrophie. Les origines d'une hépatomégalie peuvent être diverses, et parmi elles, on retrouve notamment les désordres métaboliques à l'origine de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Il a déjà été montré que suite à une carence en donneurs de méthyle d'origine maternelle, les ratons âgés de 21 jours sont plus susceptibles au développement de la NAFLD, ceci relié à des dérégulations du métabolisme lipidique (McNeil *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015). Dans notre modèle d'étude, la variation de poids du tissu hépatique n'étant pas retrouvée chez les femelles, on peut supposer un effet sexe-dépendant de la carence des pères. Dans le modèle de carence d'origine maternelle développé dans les études antérieures du laboratoire, les ratons issus des mères carencées présentaient au contraire un petit poids et une taille inférieure aux animaux contrôles (Blaise *et al.*, 2005). Ces observations permettent de confirmer qu'une carence d'origine paternelle n'entraîne pas les mêmes conséquences sur la santé de la descendance.

Afin de vérifier si la carence d'origine paternelle engendre des perturbations du métabolisme des monocarbones chez la descendance, nous avons mesuré les niveaux des intermédiaires métaboliques dans le foie des pères et des ratons. Les mesures des intermédiaires métaboliques ont permis, d'une part, de confirmer la carence en donneurs de méthyle chez les pères nourris avec le régime carencé, et, d'autre part, de montrer l'impact transgénérationnel de la carence. En effet, une augmentation de la concentration en Hcy dans le foie a été observée à J65 et J180 chez les ratons mâles issus des pères carencés, et dans le plasma pour la descendance femelle.

Il n'existe aucune donnée dans la littérature relative aux mesures des intermédiaires métaboliques hépatiques dans le cadre d'une carence paternelle en donneurs de méthyle. En revanche, les études antérieures portant sur la carence en donneurs de méthyle d'origine maternelle ont montré une accumulation tissulaire et plasmatique de l'Hcy, reliée à une baisse d'expression de la MS et de la CBS chez la descendance dès le sevrage (Blaise *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'accumulation d'Hcy est observée plus tardivement à J65 chez les ratons carencés. Ces résultats laissent donc supposer que la carence d'origine paternelle entraîne des perturbations plus tardives du métabolisme des monocarbones au cours du développement et semble dépendante du sexe.

Dans notre étude, nous avons également relevé une diminution du poids des testicules à J21 chez les ratons issus des pères carencés, ce qui pourrait signifier qu'il existe des altérations de leur métabolisme (Pi *et al.*, 2008; Leisegang *et al.*, 2019; Rospond *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

Les résultats obtenus dans la deuxième partie de notre étude, ont permis de montrer une nette diminution de la mobilité des spermatozoïdes, associée à des variations des concentrations circulantes de LH et de FSH, ainsi qu'une augmentation de l'expression de *Star* et des enzymes clés de la stéroïdogénèse (*Hsd3b2* et *Cyp19a1*) dans les testicules des descendants des pères carencés. Les analyses du contenu en petits ARNs dans le sperme montrent une diminution de fragments d'ARNt codant pour le Glutamate et la Lysine, mais aussi des dérégulations du contenu en miARNs chez les pères et la descendance.

Depuis quelques années, des études ont montré une diminution de la qualité du sperme liée aux facteurs environnementaux et aux habitudes de vie (Tirpák *et al.*, 2021). Les difficultés liées à la procréation sont nombreuses et diffèrent entre l'homme et la femme, même si la plus fréquente est l'infertilité (Zegers-Hochschild *et al.*, 2017). Cette dernière peut être la conséquence d'une exposition à différents facteurs environnementaux, dont l'alimentation, qui seraient à l'origine de processus épigénétiques liés au sperme.

L'absence de différence, en termes de nombre de spermatozoïdes et de leur morphologie en fonction du régime du père, laisse présupposer qu'il n'existe pas de dysfonctionnement d'origine testiculaire, et/ou de contraction des muscles, et/ou de l'érection. Nous avons cependant observé un passage des cellules germinales dans la lumière des tubules séminifères chez les ratons issus des pères carencés. En revanche, notre étude a permis de mettre en évidence des altérations de la mobilité des spermatozoïdes chez la descendance à différents stades de développement postnatal. Selon d'autres études retrouvées dans la littérature, la carence paternelle en donneurs de méthyle influence l'épigénome du sperme (Lambrot *et al.*, 2013) et entraîne des dérégulations de la spermatogenèse (Swayne *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2017). En revanche, d'autres auteurs ont rapporté que la carence paternelle n'impacte ni le nombre de spermatozoïdes, ni la spermatogenèse, ce qui est en adéquation avec nos résultats (Lambrot *et al.*, 2013). En plus de l'impact sur le testicule, nous avons également noté une diminution tardive de la taille des vésicules séminales et de l'épididyme à J180 (résultats présentés en **Annexe 7**), ce qui est en adéquation avec les travaux de Lambrot et ses collaborateurs, qui montrent que la carence paternelle impacte le développement de l'appareil reproducteur *via* des processus de méthylation des gènes du sperme (Lambrot *et al.*, 2013). L'ensemble de ces résultats laisse supposer que ce déficit périconceptionnel en donneurs de méthyle pourrait être à l'origine de troubles de la fertilité résultant de la diminution de la mobilité des spermatozoïdes et la dérégulation de la spermatogenèse que nous avons observées chez ces animaux.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans ces variations, plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

1. Ces altérations pourraient être dues à un défaut d'homéostasie en folates dans les testicules des ratons. En effet, il est largement admis que les folates et la vitamine B12 jouent un rôle important

dans les paramètres liés à la qualité du sperme tels que la mobilité, le nombre et la morphologie des spermatozoïdes. La carence en donneurs de méthyle, associée à l'hyperhomocystéinémie qu'elle engendre, pourrait avoir des effets délétères sur la production et la qualité du sperme. D'autres auteurs ont montré qu'une carence en folates entraîne des effets pro-oxydants (Banihani, 2017) qui ont pour conséquence une altération de la concentration spermatique, une perturbation de l'ADN et une diminution de la mobilité des spermatozoïdes (Tyagi *et al.*, 2005; Lambrot *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015; Froese *et al.*, 2019). De plus, le contenu en folates au niveau tissulaire dépend des capacités de transport de ces micronutriments. Peu d'études en dehors de la nôtre se sont consacrées à l'étude des transporteurs aux folates dans les testicules, en dehors celles de Holm et ses collaborateurs réalisées chez l'Homme, mettant en évidence leur expression dans le testicule (Holm *et al.*, 1999), la prostate (Holm *et al.*, 1993) et dans le sperme (Holm *et al.*, 1991). D'autres études ont montré que l'expression de FR $\alpha$  est élevée dans de nombreux cancers tels que le carcinome testiculaire (Ross *et al.*, 1994; Elnakat et Ratnam, 2006; Assaraf *et al.*, 2014).

Pour répondre à notre première hypothèse relative au contenu intratissulaire en folates et leurs métabolites, nous avons mesuré des variations de la concentration de MeTHF mais qui restent d'interprétation difficile, au vu des variations analytiques importantes rencontrées au cours du dosage. Chez les rats âgés de 65 jours, issus des pères carencés, la légère augmentation du MeTHF dans les testicules et la diminution de l'expression de *Slc19a1*, laissent supposer qu'il existe une augmentation de l'activité d'un ou plusieurs autres transporteurs pour permettre l'entrée du MeTHF dans les cellules. Le MeTHF peut être internalisé par les 3 types de transporteurs des folates et majoritairement par RFC (codé par le gène *Slc19a1*). Or, l'activité de ce dernier est fortement dépendante des conditions de pH environnantes, avec une affinité pour les folates réduits à pH physiologique qui décroît conjointement avec le pH. La diminution d'expression observée pourrait donc être liée à une diminution du pH au niveau local dans le tissu, engendrant une diminution d'apport du MeTHF qui pourrait être compensée soit par une augmentation de l'expression de FR $\alpha$  (codé par *Folr1*) et de PCFT (codé par le gène *Slc46a1*) que nous avons observée à J180. De plus, PCFT est un co-transporteur de protons avec une activité optimale à pH 5,5.

**2.** Les anomalies spermatiques observées pourraient être liées à des dérégulations de la synthèse des hormones stéroïdes. En effet, la formation et la maturation des spermatozoïdes se fait sous le contrôle des hormones stéroïdes dont le précurseur est le cholestérol (Miller et Auchus, 2011). La testostérone ainsi que les gonadotrophines (FSH et LH) et l'estradiol sont les principales molécules régulatrices de la spermatogenèse (Hakkarainen *et al.*, 2018). Il a été montré que la carence en folate réduit le niveau des hormones sexuelles dans un modèle porcin (Wallock-Montelius *et al.*, 2007). De plus, au niveau cérébral, des études antérieures du laboratoire portant sur le modèle de carence gestationnelle ont pu montrer une altération de la voie de synthèse des hormones stéroïdes dans le cerveau, notamment via une réduction de l'expression de la StAR et de l'aromatase (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014b).

Concernant cette seconde hypothèse liée à la synthèse des hormones stéroïdes, les dosages de FSH et LH s'inscrivent, avec ceux de la testostérone, dans les tests habituellement réalisés pour

apprécier les fonctions de synthèse au niveau testiculaire. Dans notre étude, si le niveau de testostérone plasmatique mesuré ne varie pas en fonction du régime du père, des différences sont observées pour les concentrations en LH et FSH. Indépendamment l'une de l'autre, le LH et la FSH sont capables de stimuler l'activité de l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en œstradiol : l'aromatase (Durham *et al.*, 1985; Carreau *et al.*, 1988; Weniger et Zeis, 1988). L'augmentation de la concentration en FSH que nous avons mesurée pourrait donc être associée à l'augmentation de l'expression de *Cyp19a1* observée dans les testicules.

En revanche, la diminution des concentrations en LH reste difficile à interpréter, d'autant plus qu'elle peut avoir des origines multiples liées à des désordres métaboliques qui ont été décrits précédemment dans des situations de carences en folates. Parmi ces causes probables, nous retrouvons l'obésité et le diabète (Cates *et al.*, 1999; Grossmann, 2018; McCosh *et al.*, 2019; Dwyer et Quinton, 2020; Genchi *et al.*, 2022), l'inflammation (Kalra *et al.*, 1998; Prodam *et al.*, 2021), l'hypothyroïdisme (Maran, 2003; Meikle, 2004; Crawford et Kennedy, 2016; Ambigapathy *et al.*, 2020) ou encore une diminution de l'expression ou de l'activité de l'aromatase (Winters, 2020) et l'hyperhomocystéinémie (Šerý *et al.*, 2012). Une baisse de LH circulante peut également être la conséquence d'une résistance à la leptine ou une diminution de cette dernière (Farooqi *et al.*, 1999) ou être d'origine centrale, liée à des lésions cérébrales (Prodam *et al.*, 2021). Dans notre étude, bien que nous n'ayons pas mesuré d'hyperhomocystéinémie, le contenu en Hcy était plus important à J65 et J180 dans le foie des rats mâles carencés, qui étaient également de poids élevé par rapport aux contrôles. Dans les testicules de ces rats, l'expression de *Cyp19a1* était augmentée à J180.

Tous ces éléments suggèrent que la baisse de LH dans notre modèle d'étude pourrait être liée à un surpoids ou une obésité de nos animaux à l'âge adulte et des dérégulations de la synthèse des hormones liées à la prise alimentaire. En effet, les rats issus des pères carencés ont potentiellement plus de masse grasse favorisant la survenue du diabète, de l'hypertension ou encore du syndrome métabolique. Les études précédentes réalisées dans l'équipe ont montré que l'exposition maternelle à un déficit en donneurs de méthyle entraînait une modification de l'expression hypothalamique de neuropeptides impliqués dans la balance énergétique et la prise alimentaire (Saber Cherif *et al.*, 2019) et plus particulièrement une baisse de l'expression du facteur de transcription SF-1 que nous avons nouvellement localisé dans le cervelet des rats carencés (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014a). Ce facteur de transcription est connu pour son rôle dans la régulation des gènes de la stéroïdogenèse, notamment celui codant pour la StAR et l'aromatase et est habituellement localisé dans l'hypothalamus où il joue un rôle dans la régulation de l'anxiété, des comportements sexuels et du poids corporel *via* la modulation de l'activité physique (Büdefeld *et al.*, 2012). De plus, chez les souris invalidées pour le gène *Sf1*, ont été observées une baisse de la fertilité (Kim *et al.*, 2010) et une augmentation de l'anxiété lorsque ces dernières sont soumises à un stress (Zhao *et al.*, 2008b). Il semblerait donc que la carence paternelle pourrait également engendrer des troubles de la prise alimentaire, mais ceci reste à confirmer par des approches complémentaires.

**3.** Enfin, la diminution de la mobilité des spermatozoïdes pourrait être la conséquence d'une altération du contenu du sperme, et notamment en petits ARNs. Les miARNs jouent un rôle crucial dans

la régulation de la spermatogenèse du fait de leur présence de manière majoritaire dans les spermatogonies par rapport aux autres types cellulaires des testicules (Walker, 2022). Par exemple, le maintien de la pluripotence de ces cellules est permis par le cluster de gène soumis à empreinte *Igf2-H19*, qui est la cible des miARNs de la famille Let-7. Le cluster des miR-221, miR-222, et le miR-202, sont essentiels au maintien des spermatogonies dans un statut indifférencié (Smorag *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016b). Au contraire, l'expression du miR-26b permet de passer du statut indifférencié à spermatogonie (Tu *et al.*, 2018). Outre les miARNs, les autres catégories de sncRNA sont également impliquées dans la fertilité (Sellem *et al.*, 2021).

Quant à notre troisième hypothèse, les analyses du contenu en petits ARNs dans le sperme montrent une altération du contenu en fragments d'ARNt et des miARNs. Tout d'abord 5 tRFs sont augmentés chez les pères carencés par rapport aux pères contrôles. Parmi eux, tRF-Gly-GCC retrouvé dans notre étude, est également augmenté dans le sperme lorsque le père à un régime pauvre en protéines et engendre des dérégulations de ces cibles dans les embryons (Sharma *et al.*, 2016). De même, le régime riche en lipide du père est également responsable d'altération du contenu en fragments d'ARNt dans le sperme (Chen *et al.*, 2016a).

Nos données montrent que le miR-129-2-3p est régulé à la hausse aussi bien chez les pères carencés que leurs descendances. D'après les travaux de Huang et ses collaborateurs, miR-129-2-3p joue un rôle dans la pathogenèse de l'AVC ischémique en diminuant l'expression de SYK et la fonction des plaquettes sanguines (Huang *et al.*, 2019). Il a également pour cible le gène GABRA1 dans les neurones hippocampaux et son expression diminuée a été associée à la suppression des crises d'épilepsie chez le rat (Wang *et al.*, 2021).

Concernant miR-206-3p, il intervient dans la synthèse du BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), ce qui pourrait participer au développement de la dépression et de l'anxiété (Guan *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2023). En effet, des études ont mis en évidence que des changements de sa synthèse ou de la méthylation dans son promoteur IV, seraient impliqués dans la dépression (Keller *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014; Tadić *et al.*, 2014). Les travaux de Li et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que le microbiote intestinal serait capable d'induire une augmentation de l'expression de ce miARN dans le cerveau, conduisant au développement de troubles anxieux par induction d'une dégénérescence mitochondriale et synaptique dans l'hippocampe *via* l'inhibition de la voie Cited2/STK39 (Li *et al.*, 2023). Le miR-206-3p pourrait également intervenir dans la genèse de la plaque d'athérome, son expression étant augmentée dans un modèle de rats diabétiques présentant de l'athérosclérose (Li *et al.*, 2018).

D'après la littérature, le mécanisme de transmission paternelle *via* le sperme se fait probablement par le transfert de marques épigénétiques. Parmi ces marques, on retrouve notamment les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation de l'ADN ou encore des modifications du contenu en petits ARNs (Anway *et al.*, 2005; Sharma, 2019). L'ensemble de ces processus peuvent interférer entre eux et peuvent être transférés aux générations futures sans intervention de mécanismes génétiques, et entraîner des conséquences à court- et long-terme (Rando, 2012; Nilsson *et al.*, 2018; Klastrup *et al.*, 2019). Dans notre étude, nous avons observé un poids du cœur potentiellement plus faible chez la descendance issue des pères carencés, ce qui pourrait

notamment être relié au fait que plusieurs miARNs dérégulés dans le sperme des pères sembleraient jouer un rôle dans le fonctionnement cardiaque, comme cela a déjà pu être reporté dans la littérature (Wagner *et al.*, 2008). De plus, les tests comportementaux réalisés suggèrent des altérations de la fonction cérébrale, ce qui pourrait également être expliqué par la dérégulation de certains miARNs trouvés dérégulés dans le sperme. Dans le contexte de notre étude dans laquelle nous avons montré une augmentation du miR-129-2-3p et une diminution du miR-126a-5p, il semblerait que la carence paternelle entraîne une susceptibilité plus grande à des pathologies cardiaques et cérébrales, selon un mode de transmission *via* le sperme.

D'autres études portant sur l'impact de la nutrition, du père, comme la carence en protéines ou bien un excès d'apport en glucides, ont montré une plus grande vulnérabilité de la descendance vis-à-vis de dysfonctionnements pathologiques cardiovasculaires et métaboliques (Kaati *et al.*, 2002; Watkins et Sinclair, 2014). Concernant les données de la littérature relative à l'impact de la carence paternelle en donneurs de méthyle, seuls les travaux de Lambrot et ses collaborateurs réalisés sur le sperme de la progéniture ont mis en évidence des différences de méthylation de gènes impliqués dans la régulation du développement musculaire et du SNC, ainsi que ceux intervenant dans le développement de pathologies neurologiques et psychiatriques (Lambrot *et al.*, 2013). Il est important de souligner que le miR-129-2-3p appartient au groupe de miARN dont l'expression peut être induite par un stress métabolique (Kálmán *et al.*, 2014), ce qui pourrait constituer un des facteurs à l'origine de son, élévation dans notre étude, au vu des désordres métaboliques observés.

Enfin, le niveau d'expression du miR-202-5p est également augmenté dans le sperme des rats nés des pères carencés. Or, il joue un rôle dans le maintien du statut indifférencié des spermatogonies. En effet, appartenant à la famille let-7, il bloque précocement la différenciation des spermatogonies ainsi que l'initiation de la méiose au cours de la spermatogenèse (Chen *et al.*, 2021b). Son expression élevée pourrait donc être liée aux altérations de la spermatogenèse de nos rats.

La troisième et dernière partie de notre étude était consacrée aux conséquences de la carence en donneurs de méthyle d'origine paternelle sur le comportement de la descendance et l'homéostasie en folates dans le cerveau en développement. Les mesures réalisées sur les échantillons de cortex cérébral montrent des variations différentes entre les rats mâles et femelles. Le *ratio* SAM/SAH était diminué dans le cortex cérébral des mâles à J180 issus des pères carencés ainsi que les concentrations d'Hcy pour les femelles du même groupe à J65. Chez les femelles issues des pères carencés, malgré l'absence de différence significative des concentrations en MeTHF, l'expression des transporteurs aux folates (*Slc46a1* et *Slc19a1*), ainsi que de *Abcc1* à J65 était plus basse par rapport aux contrôles. Ces modifications étaient associées à une augmentation de l'expression de *S100b*, alors que l'expression de la *Cldn5* est diminuée.

Concernant les études comportementales, les altérations de l'olfaction et de la coordination motrice ne sont retrouvées que chez la descendance mâle issue des pères carencés.

Pour la descendance féminine, les résultats montrent un impact plus présent de la carence des pères. En effet, il est probable qu'elles montrent des altérations de la perméabilité de la BHE du fait de

la diminution de l'expression de la *Cldn5* mais également des transporteurs aux folates qui y sont exprimés. Ces problèmes de perméabilité peuvent être à l'origine, ou la conséquence, d'une possible inflammation comme le suggère les augmentations d'expression de *S100b*. La protéine S100B est spécifiquement synthétisée dans le cerveau et sa concentration augmente en réponse à des dommages tissulaires associés à des phénomènes inflammatoires (Lasek-Bal *et al.*, 2019). De plus, cette augmentation de S100B a été associée à perméabilité augmentée de la BHE (Koh et Lee, 2014). D'après les analyses du contenu en petits ARNs du sperme des pères, miR-126a-5p est retrouvé dérégulé à la baisse. Les travaux de Yu et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence qu'il est impliqué dans l'intégrité de la BHE. En effet, lors des processus inflammatoires liés à la démyélinisation, ce miR exprimé par les cellules de la microglie permet de préserver l'intégrité de la barrière (Yu *et al.*, 2022). De plus, il est également impliqué dans la régulation de la synthèse et la sécrétion de prolactine par l'hypophyse (Zhao *et al.*, 2022), et son augmentation permet la diminution du stress oxydant induit par un AVC, provoquant alors une réponse réparatrice (Tan *et al.*, 2021).

Les résultats concernant la descendance masculine pourraient refléter une moins grande vulnérabilité des ratons mâles par rapport aux femelles, face à une carence en donneurs de méthyles du père. Les niveaux d'expression des différents transporteurs étudiés et de *Cldn5* sont similaires aux contrôles suggérant une absence d'altération de la perméabilité de la BHE et des mécanismes de transfert des folates dans le cerveau. Le niveau d'expression de *S100b* tend à diminué et celui du *miR-126a-5p* est augmenté de manière significative. En revanche, d'après les tests comportementaux réalisés, les mâles sont plus sujets à des altérations de l'olfaction et des troubles moteurs suggérant tout de même un impact de la carence paternelle sur les bulbes olfactifs et le cervelet des mâles, structures non étudiées à l'heure actuelle. Des altérations de la neurostéroïdogenèse dans les bulbes olfactifs de manière sexe-dépendante (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014b), des perturbations épigénétiques liées au développement cérébral postnatal des ratons, associées à des troubles cognitifs et moteurs (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014a; Willekens *et al.*, 2019) ont déjà été mises en évidence lors d'une carence gestationnelle en donneurs de méthyle avec des femelles plus affectées que les mâles.

L'ensemble de ces résultats suggère que la descendance féminine des pères carencés serait plus vulnérable donc plus sujette au développement de pathologies neurologiques avec une composante inflammatoire. Hormis son rôle dans la BHE, il est également possible que l'augmentation de l'expression du *miR-126a-5p* dans le cortex des femelles puisse engendrer des défauts de synthèses hormonales, voire des perturbations de la lactogenèse chez les femelles lors de la période de sevrage des ratons.

Les travaux de Lambrot et ses collaborateurs en 2013 ont été pionniers et ont permis de mettre en évidence une altération de la méthylation de gènes impliqués dans le développement cérébral et le comportement (Lambrot *et al.*, 2013). Au regard de cela, nos résultats concernant l'impact sur le comportement des ratons est certain, même si les mécanismes sous-jacents restent encore à être élucidés. D'après la littérature, notre étude apporte une première démonstration des altérations comportementales et biochimiques chez la descendance, dans différents organes et dans le cadre d'une carence paternelle en donneurs de méthyle.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Depuis cette dernière décennie, les études portant sur le statut nutritionnel et l'habitude de vie des hommes en période périconceptionnelle s'accroissent et montrent que tout comme pour les mères, le régime paternel peut avoir un impact sur le développement de la descendance. Ces nouvelles données sont à intégrer dans les approches cliniques, devant l'importance du régime du père au moment de la conception et lors des protocoles de PMA, d'autant plus qu'il a été montré qu'un statut en vitamines B9 défavorable peut conduire à des issues négatives à la suite de fécondations *in-vitro* (Chen *et al.*, 2001; Boxmeer *et al.*, 2009; Vujkovic *et al.*, 2009; Safarinejad *et al.*, 2011; Banihani, 2017).

Dans notre étude, nous avons pu mettre en lumière les effets d'une carence d'origine paternelle en donneurs de méthyle sur le métabolisme des monocarbones dans le foie et les testicules dans lesquels nous avons pu établir la présence des transporteurs aux folates. Nous avons également montré un impact sur la mobilité des spermatozoïdes et le contenu en ARN du sperme, notamment des dérégulations de l'expression de miARNs impliqués dans des processus cardio-cérébro-vasculaires. De plus, nous avons mis en évidence que cette même carence paternelle affecte les mécanismes permettant le maintien de l'homéostasie cérébrale en folates de manière sexe-dépendante, pouvant avoir des effets potentiels à long terme. Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives et confortent notre hypothèse selon laquelle la carence paternelle en donneurs de méthyle entraînerait des conséquences délétères sur la santé de la progéniture à plus long terme.

Nous avons observé dans un premier temps que seuls les rats mâles ont un poids corporel plus élevé associé à une hépatomégalie, suggérant un syndrome métabolique qu'il conviendrait de confirmer par des investigations complémentaires, notamment en mesurant les paramètres du métabolisme lipidique et glucidique dans le plasma des animaux. La prévalence des maladies métaboliques varie en fonction du sexe et, chez les hommes, la masse grasse est plus étroitement liée à la prévalence du syndrome métabolique comparé aux femmes (Lind *et al.*, 2017). L'effet protecteur des estrogènes et des hormones ovariennes a largement été décrit dans la littérature (Ford, 2005). Ceci pourrait justifier l'absence de différence de poids entre les rats femelles issues des pères carencés. Le syndrome métabolique est également fortement corrélé à l'activité gonadique, notamment au niveau du métabolisme des stéroïdes (Blaak, 2001; Mansour *et al.*, 2017) et, dans notre modèle expérimental, les rats carencés présentaient des testicules de plus petit poids, associé aux niveaux d'expression abaissés de la protéine StAR et de l'aromatase. L'ensemble de ces observations nous a donc incités à poursuivre notre travail par l'exploration des paramètres de fertilité de nos rats.

Nos travaux ont permis de confirmer l'importance de l'impact de la carence paternelle sur le contenu en petit ARN dans le sperme de la descendance, sachant que chaque miARN possède ses gènes cibles et des rôles spécifiques. Une étude du niveau d'expression dans le cerveau des rats des 2 miARNs communément dérégulés (miR-129-2-3p et miR-206-3p) chez les pères et la descendance, ainsi qu'une étude plus approfondie des cibles potentielles des autres miARN permettront une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires dans lesquels ils interviennent au cours du développement. Lors de l'analyse des paramètres de fertilité, nous avons constaté un passage des cellules germinales dans la lumière des tubules séminifères chez les rats issus des pères carencés, suggérant une altération de la BHT. Cette barrière représentée par les

jonctions intercellulaires étanches des cellules de Sertoli contribue au bon déroulement de la spermatogenèse en bloquant le passage de molécules et en donnant un privilège immun aux cellules germinales (Skinner, 1987; Chakraborty *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2014). Il serait intéressant d'explorer l'intégrité de cette barrière, notamment en ce qui concerne l'expression des marqueurs de jonctions cellulaires spécifiques de la BHT tels que la *Cldn3* ou la *Cldn11*.

Au vu des variations observées pour les concentrations circulantes en LH et en FSH, l'exploration de l'axe gonadotrope devra être poursuivie par des investigations complémentaires, notamment en mesurant les concentrations plasmatiques de l'inhibine B, de l'œstradiol, voire de la prolactine, ainsi qu'une étude des récepteurs à la LH et à la FSH dans les testicules. Ceci permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, avec de possibles altérations du rétrocontrôle des hormones sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique, d'autant plus que la LH tout comme la FSH sont capables de réguler l'expression de l'aromatase, qui était plus élevée dans les testicules de nos rats nés de pères carencés par rapport aux contrôles.

Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur les gonades et les paramètres de fertilité de la descendance mâle afin de vérifier l'hypothèse de transmission *via* le sperme. Mais qu'en est-il des rats femelles ? Les publications concernant la carence paternelle retrouvées dans la littérature ne font état d'aucune donnée concernant les paramètres liés à la reproduction de la descendance féminine. Des études antérieures menées auprès des femmes sous stimulation ovarienne montrent que la carence gestationnelle des folates influence la fertilité et la réponse folliculaire (Twigt *et al.*, 2011), notamment en affectant la méthylation du gène de l'aromatase. L'exploration des hormones sexuelles des rats femelles associée au métabolisme des stéroïdes devrait permettre de vérifier l'impact de la carence d'origine paternelle sur l'activité ovarienne.

Les atteintes cérébrales que nous avons observées montrent également un effet lié au sexe, puisque les femelles présentaient un contenu en MeTHF abaissé par rapport aux mâles, une altération de l'expression des transporteurs des folates présents dans la BHE ainsi que de la *Cldn5*. L'ensemble de ces données laisse entrevoir une possible atteinte de l'intégrité de la BHE qu'il reste à confirmer par des expérimentations complémentaires comme des analyses en immunohistochimie sur coupes cérébrales pour localiser les atteintes de la barrière dans les différentes régions cérébrales. Des études fonctionnelles sur microvaisseaux isolés des cerveaux des rats des différents groupes permettront de mesurer les modalités de transport des folates. En dehors des conséquences sur la BHE, l'expression accrue de *S100b* suggère une atteinte plus étendue au niveau du tissu cérébral, d'autant plus que les miARNs que nous avons retrouvés dérégulés dans le sperme des rats sont impliqués dans des pathologies cardio-cérébro-vasculaires, notamment l'ischémie cérébrale.

Les atteintes comportementales observées chez nos animaux lors des tests de discrimination olfactive et *l'openfield* devraient être complétées par des analyses en immunohistochimie et métabolique en ciblant les régions concernées, en l'occurrence les bulbes olfactifs et l'hippocampe, d'autant plus qu'une atteinte de ces structures a déjà été mise en évidence lors de nos études précédentes de carence gestationnelle en donneurs en méthyle (El Hajj Chehadeh *et al.*, 2014b, a; Willekens *et al.*, 2019).

Enfin, en dehors des défauts d'apport alimentaire, l'origine de la carence en folates des pères serait également liée à l'exposition aux polluants environnementaux et notamment les ligands du facteur de transcription AhR, qui pourrait interagir avec l'expression des transporteurs des folates. Or, une étude préliminaire des cibles de miR-1843a-5p retrouvé parmi les miARN dérégulés dans le sperme des pères, a permis de montrer son action sur l'expression de AhR, le miR-129-2-3p interagissant plutôt avec son répresseur, AhRR. Une carence paternelle d'origine nutritionnelle concomitante à une exposition à des polluants environnementaux, pourrait donc avoir un effet synergique sur la santé de la descendance. Cette hypothèse fait l'objet d'un nouveau projet en cours qui a pour objectif d'étudier l'interaction de la carence en donneurs de méthyle et de l'exposition à un ligand du AhR en période gestationnelle sur le développement cérébral de la descendance.

## Références bibliographiques :

---

- Abbott NJ, Rönnbäck L and Hansson E** (2006) Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **7** 41–53.
- Abney TO** (1999) The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids* **64** 610–617.
- Agarwal AK and Auchus RJ** (2005) Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency. *Endocrinology* **146** 2531–2538.
- Alam C, Hoque MdT, Finnell RH, Goldman ID and Bendayan R** (2017) Regulation of Reduced Folate Carrier (RFC) by Vitamin D Receptor at the Blood-Brain Barrier. *Molecular Pharmaceutics* **14** 3848–3858.
- Alam C, Aufreiter S, Georgiou CJ, Hoque MdT, Finnell RH, O'Connor DL, Goldman ID and Bendayan R** (2019) Upregulation of reduced folate carrier by vitamin D enhances brain folate uptake in mice lacking folate receptor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116** 17531–17540.
- Alam C, Kondo M, O'Connor DL and Bendayan R** (2020) Clinical Implications of Folate Transport in the Central Nervous System. *Trends in Pharmacological Sciences* **41** 349–361.
- Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N and Tavazoie SF** (2015) N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* **519** 482–485.
- Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ and Hurn PD** (1998) Gender-Linked Brain Injury in Experimental Stroke. *Stroke* **29** 159–166.
- Aluri S, Zhao R, Lubout C, Goorden SMI, Fiser A and Goldman ID** (2018) Hereditary folate malabsorption due to a mutation in the external gate of the proton-coupled folate transporter SLC46A1. *Blood Advances* **2** 61–68.
- Amawi H, Sim H-M, Tiwari AK, Ambudkar SV and Shukla S** (2019) ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1141** 549–580.
- Ambigapathy JS, Kamalanathan S, Sahoo J, Kumar R and Perumal NL** (2020) Effect of Thyroxine Replacement on Leydig Cell and Sertoli Cell Function in Men with Hypothyroidism. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **24** 265–269.
- Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS and Alvord WG** (2006) Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* **22** 327–331.
- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M and Skinner MK** (2005) Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science (New York, N.Y.)* **308** 1466–1469.
- Araki R, Nishida S, Nakajima Y, Iwakumo A, Tachioka H, Kita A and Yabe T** (2021) Low folate induces abnormal neuronal maturation and DNA hypomethylation of neuronal differentiation-related genes in cultured mouse neural stem and progenitor cells. *Heliyon* **7** e08071.
- Armulik A, Genové G and Betsholtz C** (2011) Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* **21** 193–215.
- Assaraf YG** (2006) The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* **9** 227–246.

- Assaraf YG, Leamon CP and Reddy JA** (2014) The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resistance Updates* **17** 89–95.
- Auger J, Jouannet P and Eustache F** (2016) Another look at human sperm morphology. *Human Reproduction (Oxford, England)* **31** 10–23.
- Ballabh P, Braun A and Nedergaard M** (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* **16** 1–13.
- Banihani SA** (2017) Vitamin B12 and Semen Quality. *Biomolecules* **7** 42.
- Barker CF and Billingham RE** (1977) Immunologically privileged sites. *Advances in Immunology* **25** 1–54.
- Barrionuevo F, Burgos M and Jiménez R** (2011) Origin and function of embryonic Sertoli cells. *Biomolecular Concepts* **2** 537–547.
- Baumeier C, Kaiser D, Heeren J, Scheja L, John C, Weise C, Eravci M, Lagerpusch M, Schulze G, Joost H-G et al.** (2015) Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851** 566–576.
- Bendayan M, Caceres L, Saïs E, Swierkowski-Blanchard N, Alter L, Bonnet-Garnier A and Boitrelle F** (2022) Human Sperm Morphology as a Marker of Its Nuclear Quality and Epigenetic Pattern. *Cells* **11** 1788.
- Bezold G, Lange M and Peter RU** (2001) Homozygous methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and male infertility. *The New England Journal of Medicine* **344** 1172–1173.
- Binder NK, Hannan NJ and Gardner DK** (2012a) Paternal Diet-Induced Obesity Retards Early Mouse Embryo Development, Mitochondrial Activity and Pregnancy Health. *PLoS ONE* **7** e52304.
- Binder NK, Mitchell M and Gardner DK** (2012b) Parental diet-induced obesity leads to retarded early mouse embryo development and altered carbohydrate utilisation by the blastocyst. *Reproduction, Fertility and Development* **24** 804.
- Bjornstad P, Laffel L, Lynch J, El ghormli L, Weinstock RS, Tollefsen SE and Nadeau KJ** (2019) Elevated Serum Uric Acid Is Associated With Greater Risk for Hypertension and Diabetic Kidney Diseases in Obese Adolescents With Type 2 Diabetes: An Observational Analysis From the Treatment Options for Type 2 Diabetes in Adolescents and Youth (TODAY) Study. *Diabetes Care* **42** 1120–1128.
- Blaak E** (2001) Gender differences in fat metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **4** 499–502.
- Blaise S, Alberto J-M, Nédélec E, Ayav A, Pourié G, Bronowicki J-P, Guéant J-L and Daval J-L** (2005) Mild Neonatal Hypoxia Exacerbates the Effects of Vitamin-Deficient Diet on Homocysteine Metabolism in Rats. *Pediatric Research* **57** 777–782.
- Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto J-M, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant J-L and Daval J-L** (2007) Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats. *The American Journal of Pathology* **170** 667–679.
- Blanchette M and Daneman R** (2015) Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of Development* **138 Pt 1** 8–16.
- Blom HJ and Smulders Y** (2011) Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **34** 75–81.

- Boxmeer JC, Smit M, Utomo E, Romijn JC, Eijkemans MJC, Lindemans J, Laven JSE, Macklon NS, Steegers EAP and Steegers-Theunissen RPM** (2009) Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertility and Sterility* **92** 548–556.
- Brune N, Andrich J, Gencik M, Saft C, Müller T, Valentin S, Przuntek H and Epplen JT** (2004) Methyltetrahydrofolate reductase polymorphism influences onset of Huntington's disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum* 105–110.
- Büdefeld T, Tobet SA and Majdic G** (2012) Steroidogenic factor 1 and the central nervous system. *Journal of Neuroendocrinology* **24** 225–235.
- Butterworth CE and Tamura T** (1989) Folic acid safety and toxicity: a brief review. *The American Journal of Clinical Nutrition* **50** 353–358.
- Carapeto PV, Ornellas F, Mandarim-de-Lacerda CA and Aguila MB** (2018) Liver metabolism in adult male mice offspring: consequences of a maternal, paternal or both maternal and paternal high-fructose diet. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* **9** 450–459.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD et al.** (2010) Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell* **143** 1084–1096.
- Carpenter KJ** (2012) The discovery of vitamin C. *Annals of Nutrition & Metabolism* **61** 259–264.
- Carreau S, Papadopoulos V and Drosdowsky MA** (1988) Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology* **122** 1103–1109.
- Carthew RW and Sontheimer EJ** (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136** 642–655.
- de Castro Barbosa T, Ingerslev LR, Alm PS, Versteyhe S, Massart J, Rasmussen M, Donkin I, Sjögren R, Mudry JM, Vetterli L et al.** (2016) High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Molecular Metabolism* **5** 184–197.
- Cates PS, Forsling ML and O'byrne KT** (1999) Stress-induced suppression of pulsatile Luteinising hormone release in the female rat: role of vasopressin. *Journal of Neuroendocrinology* **11** 677–683.
- Chakraborty P, William Buas F, Sharma M, Smith BE, Greenlee AR, Eacker SM and Braun RE** (2014) Androgen-dependent sertoli cell tight junction remodeling is mediated by multiple tight junction components. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **28** 1055–1072.
- Chambers TJG, Morgan MD, Heger AH, Sharpe RM and Drake AJ** (2016) High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. *Scientific Reports* **6** 31857.
- Chandler CJ, Wang TT and Halsted CH** (1986) Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* **261** 928–933.
- Chang X** (2007) A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Reviews* **26** 15–37.
- Chen Q, Ng V, Mei J and Chia SE** (2001) [Comparison of seminal vitamin B12, folate, reactive oxygen species and various sperm parameters between fertile and infertile males]. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research* **30** 80–82.

- Chen Z-S, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H and Kruh GD** (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Research* **62** 3144–3150.
- Chen H, Ge R-S and Zirkin BR** (2009) Leydig cells: From stem cells to aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* **306** 9–16.
- Chen G, Broséus J, Hergalant S, Donnart A, Chevalier C, Bolaños-Jiménez F, Guéant J-L and Houlgatte R** (2015) Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Molecular Nutrition & Food Research* **59** 293–302.
- Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng G -h., Peng H, Zhang X, Zhang Y et al.** (2016a) Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* **351** 397–400.
- Chen J, Cai T, Zheng C, Lin X, Wang G, Liao S, Wang X, Gan H, Zhang D, Hu X et al.** (2016b) MicroRNA-202 maintains spermatogonial stem cells by inhibiting cell cycle regulators and RNA binding proteins. *Nucleic Acids Research* gkw1287.
- Chen S, Ben S, Xin J, Li S, Zheng R, Wang H, Fan L, Du M, Zhang Z and Wang M** (2021a) The biogenesis and biological function of PIWI-interacting RNA in cancer. *Journal of Hematology & Oncology* **14** 93.
- Chen J, Gao C, Lin X, Ning Y, He W, Zheng C, Zhang D, Yan L, Jiang B, Zhao Y et al.** (2021b) The microRNA miR-202 prevents precocious spermatogonial differentiation and meiotic initiation during mouse spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)* **148** dev199799.
- Cheng CY and Mruk DD** (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological Reviews* **82** 825–874.
- Chida N, Hirono H and Arakawa T** (1972) Effects of dietary folate deficiency on fatty acid composition of myelin cerebroside in growth rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **108** 219–224.
- Choo VL, Viguioliouk E, Blanco Mejia S, Cozma AI, Khan TA, Ha V, Wolever TMS, Leiter LA, Vuksan V, Kendall CWC et al.** (2018) Food sources of fructose-containing sugars and glycaemic control: systematic review and meta-analysis of controlled intervention studies. *BMJ* k4644.
- Chowdhury S, Lecomte V, Erlich J, Maloney C and Morris M** (2016) Paternal High Fat Diet in Rats Leads to Renal Accumulation of Lipid and Tubular Changes in Adult Offspring. *Nutrients* **8** 521.
- Claycombe-Larson KG, Bundy AN and Roemmich JN** (2020) Paternal high-fat diet and exercise regulate sperm miRNA and histone methylation to modify placental inflammation, nutrient transporter mRNA expression and fetal weight in a sex-dependent manner. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **81** 108373.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM and Deeley RG** (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science (New York, N.Y.)* **258** 1650–1654.
- Cole C, Sobala A, Lu C, Thatcher SR, Bowman A, Brown JWS, Green PJ, Barton GJ and Hutvagner G** (2009) Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs. *RNA (New York, N.Y.)* **15** 2147–2160.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT et al.** (2010) World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* **16** 231–245.

- Corley BT, Carroll RW, Hall RM, Weatherall M, Parry-Strong A and Krebs JD** (2018) Intermittent fasting in Type 2 diabetes mellitus and the risk of hypoglycaemia: a randomized controlled trial. *Diabetic Medicine* **35** 588–594.
- Corpéchet C, Robel P, Axelson M, Sjövall J and Baulieu EE** (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78** 4704–4707.
- Couvillion MT, Sachidanandam R and Collins K** (2010) A growth-essential Tetrahymena Piwi protein carries tRNA fragment cargo. *Genes & Development* **24** 2742–2747.
- Craciunescu CN, Brown EC, Mar M-H, Albright CD, Nadeau MR and Zeisel SH** (2004) Folic Acid Deficiency During Late Gestation Decreases Progenitor Cell Proliferation and Increases Apoptosis in Fetal Mouse Brain. *The Journal of Nutrition* **134** 162–166.
- Craciunescu CN, Johnson AR and Zeisel SH** (2010) Dietary choline reverses some, but not all, effects of folate deficiency on neurogenesis and apoptosis in fetal mouse brain. *The Journal of Nutrition* **140** 1162–1166.
- Crawford M and Kennedy L** (2016) Testosterone replacement therapy: role of pituitary and thyroid in diagnosis and treatment. *Translational Andrology and Urology* **5** 850–858.
- da Cruz RS, Carney EJ, Clarke J, Cao H, Cruz MI, Benitez C, Jin L, Fu Y, Cheng Z, Wang Y et al.** (2018) Paternal malnutrition programs breast cancer risk and tumor metabolism in offspring. *Breast Cancer Research* **20** 99.
- Czeizel AE and Dudás I** (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *The New England Journal of Medicine* **327** 1832–1835.
- Daneman R and Prat A** (2015) The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7** a020412.
- Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud P-O, Scherrmann J-M, De Waziers I and Declèves X** (2008) ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* **107** 1518–1528.
- Davis DP, Douglas DJ, Smith W, Sise MJ, Vilke GM, Holbrook TL, Kennedy F, Eastman AB, Velky T and Hoyt DB** (2006) Traumatic Brain Injury Outcomes in Pre- and Post- Menopausal Females Versus Age-Matched Males. *Journal of Neurotrauma* **23** 140–148.
- De Bock M, Vandenbroucke RE, Decrock E, Culot M, Cecchelli R and Leybaert L** (2014) A new angle on blood-CNS interfaces: A role for connexins? *FEBS Letters* **588** 1259–1270.
- Declèves X, Strazielle N, Scherrmann J-M and Ghersi-Egea J-F** (2014) Drug Metabolism at the Blood–Brain and Blood–CSF Barriers. In *Drug Delivery to the Brain*, pp 101–124. Eds M Hammarlund-Udenaes, ECM de Lange and RG Thorne. New York, NY: Springer New York.
- Denenberg VH** (1969) OPEN-FIELD BEHAVIOR IN THE RAT: WHAT DOES IT MEAN? *Annals of the New York Academy of Sciences* **159** 852–859.
- Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF and Hannon GJ** (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432** 231–235.
- Desai A, Sequeira JM and Quadros EV** (2016) The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* **126** 31–42.

- Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A and Matherly LH** (2012) The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biology & Therapy* **13** 1355–1373.
- DeVilbiss EA, Gardner RM, Newschaffer CJ and Lee BK** (2015) Maternal folate status as a risk factor for autism spectrum disorders: a review of existing evidence. *British Journal of Nutrition* **114** 663–672.
- Dhers L, Ducassou L, Boucher J-L and Mansuy D** (2017) Cytochrome P450 2U1, a very peculiar member of the human P450s family. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **74** 1859–1869.
- Dimofski P, Meyre D, Dreumont N and Leininger-Muller B** (2021) Consequences of Paternal Nutrition on Offspring Health and Disease. *Nutrients* **13** 2818.
- Diotel N, Charlier TD, Lefebvre d’Hellencourt C, Couret D, Trudeau VL, Nicolau JC, Meilhac O, Kah O and Pellegrini E** (2018) Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. *Frontiers in Neuroscience* **12** 84.
- Douaud G, Refsum H, de Jager CA, Jacoby R, Nichols TE, Smith SM and Smith AD** (2013) Preventing Alzheimer’s disease-related gray matter atrophy by B-vitamin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** 9523–9528.
- Durham CR, Zhu H, Masters BS, Simpson ER and Mendelson CR** (1985) Regulation of aromatase activity of rat granulosa cells: induction of synthesis of NADPH-cytochrome P-450 reductase by FSH and dibutyryl cyclic AMP. *Molecular and Cellular Endocrinology* **40** 211–219.
- Dutour R and Poirier D** (2017) Inhibitors of cytochrome P450 (CYP) 1B1. *European Journal of Medicinal Chemistry* **135** 296–306.
- Dwyer AA and Quinton R** (2020) *New Aspects in Hypogonadism*. Frontiers Media SA.
- Ebara S** (2017) Nutritional role of folate: Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies* **57** 138–141.
- El Hajj Chehadeh S, Dreumont N, Willekens J, Canabady-Rochelle L, Jeannesson E, Alberto J-M, Daval J-L, Guéant J-L and Leininger-Muller B** (2014a) Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **307** E1009–E1019.
- El Hajj Chehadeh S, Pourié G, Martin N, Alberto J-M, Daval J-L, Guéant J-L and Leininger-Muller B** (2014b) Gestational methyl donor deficiency alters key proteins involved in neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs of newborn female rats and is associated with impaired olfactory performance. *British Journal of Nutrition* **111** 1021–1031.
- Elnakat H and Ratnam M** (2004) Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56** 1067–1084.
- Elnakat H and Ratnam M** (2006) Role of folate receptor genes in reproduction and related cancers. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* **11** 506–519.
- Eloranta JJ, Zair ZM, Hiller C, Häusler S, Stieger B and Kullak-Ublick GA** (2009) Vitamin D3 and its nuclear receptor increase the expression and activity of the human proton-coupled folate transporter. *Molecular Pharmacology* **76** 1062–1071.
- Emborski C and Mikheyev AS** (2019) Ancestral diet transgenerationally influences offspring in a parent-of-origin and sex-specific manner. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **374** 20180181.

- Engelhardt B and Sorokin L** (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology* **31** 497–511.
- Evans HM** (1928) The Effect of Inadequate Vitamin B upon Sexual Physiology in the Male. *The Journal of Nutrition* **1** 1–21.
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA and O’Rahilly S** (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *The New England Journal of Medicine* **341** 879–884.
- Finkelstein JD and Martin JJ** (2000) Homocysteine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **32** 385–389.
- Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ and Scheper RJ** (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *The American Journal of Pathology* **148** 1237–1247.
- Ford ES** (2005) Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* **28** 1769–1778.
- Fowler B** (2001) The folate cycle and disease in humans. *Kidney International. Supplement* **78** S221-229.
- Frank DN and Pace NR** (1998) Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annual Review of Biochemistry* **67** 153–180.
- Froese DS, Fowler B and Baumgartner MR** (2019) Vitamin B12 , folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **42** 673–685.
- Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW and Lane M** (2012) Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Human Reproduction* **27** 1391–1400.
- Fullston T, Teague EMCO, Palmer NO, DeBlasio MJ, Mitchell M, Corbett M, Print CG, Owens JA and Lane M** (2013) Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F<sub>2</sub> generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *The FASEB Journal* **27** 4226–4243.
- Fullston T, Ohlsson-Teague EMC, Print CG, Sandeman LY and Lane M** (2016) Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring’s Sperm. *PLOS ONE* **11** e0166076.
- Furukawa A, Miyatake A, Ohnishi T and Ichikawa Y** (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *Journal of Neurochemistry* **71** 2231–2238.
- Gainetdinov I, Colpan C, Cecchini K, Arif A, Jouravleva K, Albosta P, Vega-Badillo J, Lee Y, Özata DM and Zamore PD** (2021) Terminal modification, sequence, length, and PIWI-protein identity determine piRNA stability. *Molecular Cell* **81** 4826-4842.e8.
- Gaskins AJ, Nassan FL, Chiu Y-H, Arvizu M, Williams PL, Keller MG, Souter I, Hauser R, Chavarro JE, and EARTH Study Team** (2019) Dietary patterns and outcomes of assisted reproduction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **220** 567.e1-567.e18.
- Genchi VA, Rossi E, Lauriola C, D’Oria R, Palma G, Borrelli A, Caccioppoli C, Giorgino F and Cignarelli A** (2022) Adipose Tissue Dysfunction and Obesity-Related Male Hypogonadism. *International Journal of Molecular Sciences* **23** 8194.

- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G and Hoffler U** (2010) Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity. *Biology of Reproduction* **82** 96–104.
- Gherzi-Egea JF, Minn A and Siest G** (1988) A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sciences* **42** 2515–2523.
- Gherzi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Cuny G, Siest G and Minn A** (1993) Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochemical Pharmacology* **45** 647–658.
- Gherzi-Egea JF, Leininger-Muller B, Suleman G, Siest G and Minn A** (1994) Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *Journal of Neurochemistry* **62** 1089–1096.
- Gherzi-Egea J-F, Saudrais E and Strazielle N** (2018) Barriers to Drug Distribution into the Perinatal and Postnatal Brain. *Pharmaceutical Research* **35** 84.
- Giatti S, Boraso M, Melcangi RC and Viviani B** (2012) Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *Journal of Molecular Endocrinology* **49** R125-134.
- Giatti S, Diviccaro S, Serafini MM, Caruso D, Garcia-Segura LM, Viviani B and Melcangi RC** (2020) Sex differences in steroid levels and steroidogenesis in the nervous system: Physiopathological role. *Frontiers in Neuroendocrinology* **56** 100804.
- Gibbons CH** (2019) Basics of autonomic nervous system function. *Handbook of Clinical Neurology* **160** 407–418.
- Girijala RL, Sohrabji F and Bush RL** (2017) Sex differences in stroke: Review of current knowledge and evidence. *Vascular Medicine* **22** 135–145.
- Goh WSS, Falciatori I, Tam OH, Burgess R, Meikar O, Kotaja N, Hammell M and Hannon GJ** (2015) piRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. *Genes & Development* **29** 1032–1044.
- Gonen N and Assaraf YG** (2010) The obligatory intestinal folate transporter PCFT (SLC46A1) is regulated by nuclear respiratory factor 1. *The Journal of Biological Chemistry* **285** 33602–33613.
- González-Rodríguez LG, López-Sobaler AM, Perea Sánchez JM and Ortega RM** (2018) [Nutrition and fertility]. *Nutricion Hospitalaria* **35** 7–10.
- Govic A, Penman J, Tammer AH and Paolini AG** (2016) Paternal calorie restriction prior to conception alters anxiety-like behavior of the adult rat progeny. *Psychoneuroendocrinology* **64** 1–11.
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B and Lazzarini RA** (1999) CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* **99** 649–659.
- Grandjean V, Fourré S, De Abreu DAF, Derieppe M-A, Remy J-J and Rassoulzadegan M** (2016) RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Scientific Reports* **5** 18193.
- Gregers J, Christensen IJ, Dalhoff K, Lausen B, Schroeder H, Rosthøj S, Carlsen N, Schmiegelow K and Peterson C** (2010) The association of reduced folate carrier 80G>A polymorphism to outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia interacts with chromosome 21 copy number. *Blood* **115** 4671–4677.

- Grieger JA** (2020) Preconception diet, fertility, and later health in pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* **32** 227–232.
- Griswold MD** (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9** 411–416.
- Griswold MD** (2016) Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews* **96** 1–17.
- Grossmann M** (2018) Hypogonadism and male obesity: Focus on unresolved questions. *Clinical Endocrinology* **89** 11–21.
- Grube M, Hagen P and Jedlitschky G** (2018) Neurosteroid Transport in the Brain: Role of ABC and SLC Transporters. *Frontiers in Pharmacology* **9** 354.
- Guan W, Xu D-W, Ji C-H, Wang C-N, Liu Y, Tang W-Q, Gu J-H, Chen Y-M, Huang J, Liu J-F et al.** (2021) Hippocampal miR-206-3p participates in the pathogenesis of depression via regulating the expression of BDNF. *Pharmacological Research* **174** 105932.
- Guéant J-L, Namour F, Guéant-Rodriguez R-M and Daval J-L** (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in Endocrinology & Metabolism* **24** 279–289.
- Guilland J-C and Aimone-Gastin I** (2013) [Vitamin B9]. *La Revue Du Praticien* **63** 1079, 1081–1084.
- Guo Y, Li J-M, Xiang Y, Li Y-Y, Huang J, Deng X-Z and Yang Z-W** (2019) Quantitative (stereological) study of the epididymis and seminal vesicle in the rat from young to old. *Andrologia* **51** e13247.
- Ha M and Kim VN** (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **15** 509–524.
- Hakkarainen J, Zhang F-P, Jokela H, Mayerhofer A, Behr R, Cisneros-Montalvo S, Nurmio M, Toppari J, Ohlsson C, Kotaja N et al.** (2018) Hydroxysteroid (17 $\beta$ ) dehydrogenase 1 expressed by Sertoli cells contributes to steroid synthesis and is required for male fertility. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **32** 3229–3241.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M and Attwell D** (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508** 55–60.
- Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Niemelä O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S and James SJ** (2002) Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** 10072–10077.
- Han J, Liu L, Meng L, Guo H, Zhang J, Han Z-Q and Hong Z-Y** (2021) Effect of Polymorphisms of ABCB1 and MTHFR on Methotrexate-Related Toxicities in Adults With Hematological Malignancies. *Frontiers in Oncology* **11** 759805.
- Hao S-L, Ni F-D and Yang W-X** (2019) The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene* **706** 201–210.
- Henning SM, Swendseid ME, Ivandic BT and Liao F** (1997) Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets. *Free Radical Biology & Medicine* **23** 936–942.
- Herrmann W** (2001) The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **39** 666–674.
- Hirono H and Wada Y** (1978) Effects of dietary folate deficiency on developmental increase of myelin lipids in rat brain. *The Journal of Nutrition* **108** 766–772.

- Holland ML, Lowe R, Caton PW, Gemma C, Carbajosa G, Danson AF, Carpenter AAM, Loche E, Ozanne SE and Rakyan VK** (2016) Early-life nutrition modulates the epigenetic state of specific rDNA genetic variants in mice. *Science* **353** 495–498.
- Holm J, Hansen SI and Høier-Madsen M** (1991) A high-affinity folate binding protein in human semen. *Bioscience Reports* **11** 237–242.
- Holm J, Hansen SI and Høier-Madsen M** (1993) High-affinity folate binding in human prostate. *Bioscience Reports* **13** 99–105.
- Holm J, Hansen SI, Høier-Madsen M, Christensen TB and Nichols CW** (1999) Characterization of a high-affinity folate receptor in normal and malignant human testicular tissue. *Bioscience Reports* **19** 571–580.
- Hooijberg JH, Jansen G, Assaraf YG, Kathmann I, Pieters R, Laan AC, Veerman AJP, Kaspers GJL and Peters GJ** (2004) Folate concentration dependent transport activity of the Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1). *Biochemical Pharmacology* **67** 1541–1548.
- Huang S, Lv Z, Wen Y, Wei Y, Zhou L, Ke Y, Zhang Y, Xu Q, Li L, Guo Y et al.** (2019) miR-129-2-3p directly targets SYK gene and associates with the risk of ischaemic stroke in a Chinese population. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **23** 167–176.
- Huszar JM and Payne CJ** (2013) MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biology of Reproduction* **88** 15.
- Ifergan I, Shafran A, Jansen G, Hooijberg JH, Scheffer GL and Assaraf YG** (2004) Folate deprivation results in the loss of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) expression. A role for BCRP in cellular folate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* **279** 25527–25534.
- Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta K, Hatakeyama M, Hayashi Y, Otagiri M and Yuasa H** (2008) Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **294** G660-668.
- Ishihara O, Adamson GD, Dyer S, de Mouzon J, Nygren KG, Sullivan EA, Zegers-Hochschild F and Mansour R** (2015) International committee for monitoring assisted reproductive technologies: world report on assisted reproductive technologies, 2007. *Fertility and Sterility* **103** 402-413.e11.
- Iskandar BJ, Rizk E, Meier B, Hariharan N, Bottiglieri T, Finnell RH, Jarrard DF, Banerjee RV, Skene JHP, Nelson A et al.** (2010) Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *The Journal of Clinical Investigation* **120** 1603–1616.
- Iwamoto N, Higashi T and Furuse M** (2014) Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell Structure and Function* **39** 1–8.
- Izumi N and Tomari Y** (2014) Diversity of the piRNA pathway for nonself silencing: worm-specific piRNA biogenesis factors. *Genes & Development* **28** 665–671.
- Jakubowski H** (2008) The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* **59 Suppl 9** 155–167.
- Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, van Pelt AMM and Vormer TL** (2012) Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1822** 1838–1850.
- Jo MH, Shin S, Jung S-R, Kim E, Song J-J and Hohng S** (2015) Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Molecular Cell* **59** 117–124.

- Kaati G, Bygren L and Edvinsson S** (2002) Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European Journal of Human Genetics* **10** 682–688.
- Kálmán S, Garbett KA, Vereczkei A, Shelton RC, Korade Ž and Mirnics K** (2014) Metabolic stress-induced microRNA and mRNA expression profiles of human fibroblasts. *Experimental Cell Research* **320** 343–353.
- Kalra PS, Edwards TG, Xu B, Jain M and Kalra SP** (1998) The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Domestic Animal Endocrinology* **15** 321–332.
- Karl J and Capel B** (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology* **203** 323–333.
- Kasturi SS, Tannir J and Brannigan RE** (2008) The Metabolic Syndrome and Male Infertility. *Journal of Andrology* **29** 251–259.
- Katoh T, Hojo H and Suzuki T** (2015) Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic Acids Research* **43** 7521–7534.
- Kaur G, Thompson LA and Dufour JM** (2014) Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **30** 36–44.
- Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtič A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N et al.** (2010) Increased BDNF Promoter Methylation in the Wernicke Area of Suicide Subjects. *Archives of General Psychiatry* **67** 258.
- Kelly TLJ, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R and Trasler JM** (2005) Infertility in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biology of Reproduction* **72** 667–677.
- Kim HJ, Park CH, Roh GS, Kang SS, Cho GJ and Choi WS** (2002) Changes of steroidogenic acute regulatory protein mRNA expression in postnatal rat development. *Brain Research. Developmental Brain Research* **139** 247–254.
- Kim KW, Li S, Zhao H, Peng B, Tobet SA, Elmquist JK, Parker KL and Zhao L** (2010) CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **24** 1240–1250.
- Kim HW, Choi YJ, Kim KN, Tamura T and Chang N** (2011) Effect of paternal folate deficiency on placental folate content and folate receptor  $\alpha$  expression in rats. *Nutrition Research and Practice* **5** 112.
- Kim HW, Kim KN, Choi YJ and Chang N** (2013) Effects of paternal folate deficiency on the expression of insulin-like growth factor-2 and global DNA methylation in the fetal brain. *Molecular Nutrition & Food Research* **57** 671–676.
- Kimmins S and Sassone-Corsi P** (2005) Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434** 583–589.
- Klastrup LK, Bak ST and Nielsen AL** (2019) The influence of paternal diet on sncRNA-mediated epigenetic inheritance. *Molecular Genetics and Genomics* **294** 1–11.
- Koh SXT and Lee JKW** (2014) S100B as a marker for brain damage and blood-brain barrier disruption following exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **44** 369–385.
- Kohl JB, Mellis A-T and Schwarz G** (2019) Homeostatic impact of sulfite and hydrogen sulfide on cysteine catabolism: Homeostatic impact of sulfite and H<sub>2</sub>S on cysteine catabolism. *British Journal of Pharmacology* **176** 554–570.

- Korhonen HM, Yadav RP, Da Ros M, Chalmel F, Zimmermann C, Toppari J, Nef S and Kotaja N** (2015) DICER Regulates the Formation and Maintenance of Cell-Cell Junctions in the Mouse Seminiferous Epithelium. *Biology of Reproduction* **93** 139.
- Kotaja N** (2014) MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertility and Sterility* **101** 1552–1562.
- Kozyraki R and Cases O** (2013) Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie* **95** 1002–1007.
- Kratzer I, Vasiljevic A, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N and Gherzi-Egea J-F** (2012) Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier. *Histochemistry and Cell Biology* **138** 861–879.
- Kruman II, Mouton PR, Emokpae R, Cutler RG and Mattson MP** (2005) Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* **16** 1055–1059.
- Kumar P, Kuscu C and Dutta A** (2016) Biogenesis and Function of Transfer RNA-Related Fragments (tRFs). *Trends in Biochemical Sciences* **41** 679–689.
- Kusuhara H, Han YH, Shimoda M, Kokue E, Suzuki H and Sugiyama Y** (1998) Reduced folate derivatives are endogenous substrates for cMOAT in rats. *The American Journal of Physiology* **275** G789-796.
- Kvaavik E, Batty GD, Ursin G, Huxley R and Gale CR** (2010) Influence of individual and combined health behaviors on total and cause-specific mortality in men and women: the United Kingdom health and lifestyle survey. *Archives of Internal Medicine* **170** 711–718.
- Lambrot R, Xu C, Saint-Phar S, Chountalos G, Cohen T, Paquet M, Suderman M, Hallett M and Kimmins S** (2013) Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nature Communications* **4** 2889.
- Lasek-Bal A, Jedrzejowska-Szypulka H, Student S, Warsz-Wianecka A, Zareba K, Puz P, Bal W, Pawletko K and Lewin-Kowalik J** (2019) The importance of selected markers of inflammation and blood-brain barrier damage for short-term ischemic stroke prognosis. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* **70**.
- Lee GS and Conine CC** (2022) The Transmission of Intergenerational Epigenetic Information by Sperm microRNAs. *Epigenomes* **6** 12.
- Lee YS, Shibata Y, Malhotra A and Dutta A** (2009) A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes & Development* **23** 2639–2649.
- Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, Zhuang Y, Panetta JC, Johnston B et al.** (2004) Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Molecular and Cellular Biology* **24** 7612–7621.
- Leininger-Muller B, Gherzi-Egea JF, Siest G and Minn A** (1994) Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus. *Neuroscience Letters* **175** 37–40.
- Leisegang K, Henkel R and Agarwal A** (2019) Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* **82** e13178.
- Lemos C, Kathmann I, Giovannetti E, Dekker H, Scheffer GL, Calhau C, Jansen G and Peters GJ** (2008) Folate deprivation induces BCRP (ABCG2) expression and mitoxantrone resistance in Caco-2 cells. *International Journal of Cancer* **123** 1712–1720.
- Levine SZ, Kodesh A, Viktorin A, Smith L, Uher R, Reichenberg A and Sandin S** (2018) Association of Maternal Use of Folic Acid and Multivitamin Supplements in the Periods Before and During

- Pregnancy With the Risk of Autism Spectrum Disorder in Offspring. *JAMA Psychiatry* **75** 176–184.
- Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R and Kruger WD** (1996) Cloning, Mapping and RNA Analysis of the Human Methionine Synthase Gene. *Human Molecular Genetics* **5** 1851–1858.
- Li X, Strauss L, Kaatrasalo A, Mayerhofer A, Huhtaniemi I, Santti R, Mäkelä S and Poutanen M** (2006) Transgenic Mice Expressing P450 Aromatase as a Model for Male Infertility Associated with Chronic Inflammation in the Testis. *Endocrinology* **147** 1271–1277.
- Li Z, Ender C, Meister G, Moore PS, Chang Y and John B** (2012) Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic Acids Research* **40** 6787–6799.
- Li D, Sekhon P, Barr KJ, Márquez-Rosado L, Lampe PD and Kidder GM** (2013) Connexins and steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **91** 157–164.
- Li Y, Xiao L, Li J, Sun P, Shang L, Zhang J, Zhao Q, Ouyang Y, Li L and Gong K** (2018) MicroRNA profiling of diabetic atherosclerosis in a rat model. *European Journal of Medical Research* **23** 55.
- Li Q, Zhang J, Gao Z, Zhang Y and Gu J** (2023) Gut microbiota-induced microRNA-206-3p increases anxiety-like behaviors by inhibiting expression of Cited2 and STK39. *Microbial Pathogenesis* **176** 106008.
- Liao S-L, Chen W-Y, Kuo J-S and Chen C-J** (2001) Association of serum estrogen level and ischemic neuroprotection in female rats. *Neuroscience Letters* **297** 159–162.
- Liao J-Y, Ma L-M, Guo Y-H, Zhang Y-C, Zhou H, Shao P, Chen Y-Q and Qu L-H** (2010) Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS One* **5** e10563.
- Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D and Constantin G** (2018) Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica* **135** 311–336.
- Lim D-H, Oh C-T, Han S-J and Lee YS** (2014) Methods for studying the biological consequences of endo-siRNA deficiency in *Drosophila melanogaster*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **1173** 51–58.
- Lin W-T, Huang H-L, Huang M-C, Chan T-F, Ciou S-Y, Lee C-Y, Chiu Y-W, Duh T-H, Lin P-L, Wang T-N et al.** (2013) Effects on uric acid, body mass index and blood pressure in adolescents of consuming beverages sweetened with high-fructose corn syrup. *International Journal of Obesity* **37** 532–539.
- Lind L, Ärnlov J and Lampa E** (2017) The Interplay Between Fat Mass and Fat Distribution as Determinants of the Metabolic Syndrome Is Sex-Dependent. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* **15** 337–343.
- Lismer A, Dumeaux V, Lafleur C, Lambrot R, Brind'Amour J, Lorincz MC and Kimmins S** (2021) Histone H3 lysine 4 trimethylation in sperm is transmitted to the embryo and associated with diet-induced phenotypes in the offspring. *Developmental Cell* **56** 671-686.e6.
- Liu W-Y, Wang Z-B, Zhang L-C, Wei X and Li L** (2012) Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances: Tight Junction in Blood-Brain Barrier. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **18** 609–615.
- Liu K, Zhao R, Shen M, Ye J, Li X, Huang Y, Hua L, Wang Z and Li J** (2015) Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male Infertility. *Scientific Reports* **5** 15548.

- Liu C-Y, Yang Y, Ju W-N, Wang X and Zhang H-L** (2018) Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **12** 193.
- Liu H-Y, Liu S-M and Zhang Y-Z** (2020) Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* **27** 963–976.
- Long AN, Atwell CL, Yoo W and Solomon SS** (2012) Vitamin B(12) deficiency associated with concomitant metformin and proton pump inhibitor use. *Diabetes Care* **35** e84.
- Love MI, Huber W and Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15** 550.
- Lu B, Nagappan G and Lu Y** (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology* **220** 223–250.
- Lucchetta EM, Carthew RW and Ismagilov RF** (2009) The endo-siRNA pathway is essential for robust development of the Drosophila embryo. *PloS One* **4** e7576.
- Lund E, Liu M, Hartley RS, Sheets MD and Dahlberg JE** (2009) Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA (New York, N. Y.)* **15** 2351–2363.
- Ly L, Chan D, Aarabi M, Landry M, Behan NA, MacFarlane AJ and Trasler J** (2017) Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* **23** 461–477.
- Ly NH, Maekawa T, Yoshida K, Liu Y, Muratani M and Ishii S** (2019) RNA-Sequencing Analysis of Paternal Low-Protein Diet-Induced Gene Expression Change in Mouse Offspring Adipocytes. *G3&#58; Genes|Genomes|Genetics* **9** 2161–2170.
- Manna PR, Dyson MT and Stocco DM** (2009) Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Molecular Human Reproduction* **15** 321–333.
- Mansour MF, Chan C-WJ, Laforest S, Veilleux A and Tchernof A** (2017) Sex Differences in Body Fat Distribution. In *Adipose Tissue Biology*, pp 257–300. Ed ME Symonds. Cham: Springer International Publishing.
- Maraia RJ and Lamichhane TN** (2011) 3' processing of eukaryotic precursor tRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* **2** 362–375.
- Maran RRM** (2003) Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Archives of Andrology* **49** 375–388.
- Mariano C, Sasaki H, Brites D and Brito MA** (2011) A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *European Journal of Cell Biology* **90** 787–796.
- Marinho T de S, Ornellas F, Barbosa-da-Silva S, Mandarim-de-Lacerda CA and Aguila MB** (2019) Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition* **65** 103–112.
- Marowsky A, Burgener J, Falck JR, Fritschy J-M and Arand M** (2009) Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience* **163** 646–661.
- Marshall PN** (1983) Papanicolaou staining--a review. *Microscopica Acta* **87** 233–243.
- Mashoodh R, Habrylo IB, Gudsnuk KM, Pelle G and Champagne FA** (2018) Maternal modulation of paternal effects on offspring development. *Proceedings. Biological Sciences* **285**.

- Masuyama H, Mitsui T, Eguchi T, Tamada S and Hiramatsu Y** (2016) The effects of paternal high-fat diet exposure on offspring metabolism with epigenetic changes in the mouse *adiponectin* and *leptin* gene promoters. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **311** E236–E245.
- Matherly LH, Hou Z and Deng Y** (2007) Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Reviews* **26** 111–128.
- Matsuyama H and Suzuki HI** (2019) Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **21** 132.
- Matthews RG** (2001) Cobalamin-dependent methyltransferases. *Accounts of Chemical Research* **34** 681–689.
- Mattson MP and Shea TB** (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* **26** 137–146.
- Mattson MP, Longo VD and Harvie M** (2017) Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Research Reviews* **39** 46–58.
- McCaddon A** (2013) Vitamin B12 in neurology and ageing; clinical and genetic aspects. *Biochimie* **95** 1066–1076.
- McCosh RB, Breen KM and Kauffman AS** (2019) Neural and endocrine mechanisms underlying stress-induced suppression of pulsatile LH secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology* **498** 110579.
- McCoy CR, Jackson NL, Brewer RL, Moughnyeh MM, Smith DL and Clinton SM** (2018) A paternal methyl donor depleted diet leads to increased anxiety- and depression-like behavior in adult rat offspring. *Bioscience Reports* **38** BSR20180730.
- McCully KS** (2009) Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **39** 219–232.
- McNeil CJ, Hay SM, Rucklidge GJ, Reid MD, Duncan GJ and Rees WD** (2009) Maternal diets deficient in folic acid and related methyl donors modify mechanisms associated with lipid metabolism in the fetal liver of the rat. *The British Journal of Nutrition* **102** 1445–1452.
- McPherson NO, Fullston T, Kang WX, Sandeman LY, Corbett MA, Owens JA and Lane M** (2016) Paternal under-nutrition programs metabolic syndrome in offspring which can be reversed by antioxidant/vitamin food fortification in fathers. *Scientific Reports* **6** 27010.
- Meikle AW** (2004) The interrelationships between thyroid dysfunction and hypogonadism in men and boys. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association* **14 Suppl 1** S17-25.
- Meister G and Tuschl T** (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431** 343–349.
- Mejos KK, Kim HW, Lim EM and Chang N** (2013) Effects of parental folate deficiency on the folate content, global DNA methylation, and expressions of FR $\alpha$ , IGF-2 and IGF-1R in the postnatal rat liver. *Nutrition Research and Practice* **7** 281.
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD and Braun RE** (2005) Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 16696–16700.
- Meng J, Greenlee AR, Taub CJ and Braun RE** (2011) Sertoli cell-specific deletion of the androgen receptor compromises testicular immune privilege in mice. *Biology of Reproduction* **85** 254–260.

- Mercier C, Masseguin C, Roux F, Gabrion J and Scherrmann J-M** (2004) Expression of P-glycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain: focus on astrocytes. *Brain Research* **1021** 32–40.
- Meyer T and Wirtz PH** (2018) Mechanisms of Mitochondrial Redox Signaling in Psychosocial Stress-Responsive Systems: New Insights into an Old Story. *Antioxidants & Redox Signaling* **28** 760–772.
- Meyer RG, Ketchum CC and Meyer-Ficca ML** (2017) Heritable sperm chromatin epigenetics: a break to remember†. *Biology of Reproduction* **97** 784–797.
- Miersch C and Döring F** (2012) Paternal dietary restriction affects progeny fat content in *Caenorhabditis elegans*. *IUBMB Life* **64** 644–648.
- Mihalas BP, Camlin NJ, Xavier MJ, Peters AE, Holt JE, Sutherland JM, McLaughlin EA, Eamens AL and Nixon B** (2019) The small non-coding RNA profile of mouse oocytes is modified during aging. *Aging* **11** 2968–2997.
- Millán-Zambrano G, Burton A, Bannister AJ and Schneider R** (2022) Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. *Nature Reviews Genetics* **23** 563–580.
- Miller WL** (2013) Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Molecular and Cellular Endocrinology* **379** 62–73.
- Miller WL and Auchus RJ** (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews* **32** 81–151.
- Morgan HL, Among I, Eid N, Rouillon C, Griffiths HR and Watkins AJ** (2020) Low protein diet and methyl-donor supplements modify testicular physiology in mice. *Reproduction* **159** 627–641.
- Morris ME, Rodriguez-Cruz V and Felmler MA** (2017) SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers. *The AAPS Journal* **19** 1317–1331.
- Nätt D, Kugelberg U, Casas E, Nedstrand E, Zalavary S, Henriksson P, Nijm C, Jäderquist J, Sandborg J, Flinke E et al.** (2019) Human sperm displays rapid responses to diet. *PLoS Biology* **17** e3000559.
- Ng S-F, Lin RCY, Laybutt DR, Barres R, Owens JA and Morris MJ** (2010) Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **467** 963–966.
- Ng S, Lin RCY, Maloney CA, Youngson NA, Owens JA and Morris MJ** (2014) Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *The FASEB Journal* **28** 1830–1841.
- Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CBF, Nexø E and Moestrup SK** (2012) Vitamin B12 transport from food to the body's cells—a sophisticated, multistep pathway. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **9** 345–354.
- Nilsson EE, Sadler-Riggelman I and Skinner MK** (2018) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environmental Epigenetics* **4**.
- Nishimura H and L'Hernault SW** (2017) Spermatogenesis. *Current Biology: CB* **27** R988–R994.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M and Tsukita S** (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* **161** 653–660.

- Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B and Trasler JM** (2007) A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 228–233.
- Obeid R** (2013) The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients* **5** 3481–3495.
- O'Connor C, Wallace-Povirk A, Ning C, Frühauf J, Tong N, Gangjee A, Matherly LH and Hou Z** (2021) Folate transporter dynamics and therapy with classic and tumor-targeted antifolates. *Scientific Reports* **11** 6389.
- Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y and Tsukihara T** (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science (New York, N.Y.)* **326** 1275–1279.
- Oldendorf WH** (1977) The blood-brain barrier. *Experimental Eye Research* **25 Suppl** 177–190.
- O'Leary F and Samman S** (2010) Vitamin B12 in Health and Disease. *Nutrients* **2** 299–316.
- Ornellas F, Carapeto PV, Mandarim-de-Lacerda CA and Aguila MB** (2017) Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. *Jornal de Pediatria* **93** 551–559.
- Ornellas F, Carapeto PV, Aguila MB and Mandarim-de-Lacerda CA** (2020) Sex-linked changes and high cardiovascular risk markers in the mature progeny of father, mother, or both father and mother consuming a high-fructose diet. *Nutrition* **71** 110612.
- Oshio LT, Andreazzi AE, Lopes JF, Sá JP de, Bolotari M, Costa VMG, Guerra M de O and Peters VM** (2020) A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 Wistar rat generations. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* **11** 653–663.
- Öst A, Lempradl A, Casas E, Weigert M, Tiko T, Deniz M, Pantano L, Boenisch U, Itskov PM, Stoeckius M et al.** (2014) Paternal Diet Defines Offspring Chromatin State and Intergenerational Obesity. *Cell* **159** 1352–1364.
- Phillips JR, Hewedi DH, Eissa AM and Moustafa AA** (2015) The cerebellum and psychiatric disorders. *Frontiers in Public Health* **3** 66.
- Phizicky EM and Hopper AK** (2010) tRNA biology charges to the front. *Genes & Development* **24** 1832–1860.
- Pi M, Chen L, Huang M-Z, Zhu W, Ringhofer B, Luo J, Christenson L, Li B, Zhang J, Jackson PD et al.** (2008) GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One* **3** e3858.
- Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y and Meyre D** (2016) Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clinical Science* **130** 943–986.
- Portha B, Grandjean V and Movassat J** (2019) Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. *Nutrients* **11** 233.
- Pourié G, Martin N, Bossenmeyer-Pourié C, Akchiche N, Guéant-Rodriguez RM, Geoffroy A, Jeannesson E, El Hajj Chehadeh S, Mimoun K, Brachet P et al.** (2015) Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor  $\alpha$ . *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29** 3713–3725.

- Power C** (2003) Combination of low birth weight and high adult body mass index: at what age is it established and what are its determinants? *Journal of Epidemiology & Community Health* **57** 969–973.
- Prodam F, Caputo M, Mele C, Marzullo P and Aimaretti G** (2021) Insights into non-classic and emerging causes of hypopituitarism. *Nature Reviews. Endocrinology* **17** 114–129.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH and Goldman ID** (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* **127** 917–928.
- Qiu A, Min SH, Jansen M, Malhotra U, Tsai E, Cabelof DC, Matherly LH, Zhao R, Akabas MH and Goldman ID** (2007) Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **293** C1669-1678.
- Quadros EV** (2010) Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *British Journal of Haematology* **148** 195–204.
- Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, Seisenberger S, Hore TA, Reik W, Erkek S et al.** (2014) In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* **345** 1255903–1255903.
- Rajender S, Avery K and Agarwal A** (2011) Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutation Research* **727** 62–71.
- Ramaekers VT and Blau N** (2007) Cerebral folate deficiency. *Developmental Medicine & Child Neurology* **46** 843–851.
- Ramaekers VTh and Quadros EV** (2022) Cerebral Folate Deficiency Syndrome: Early Diagnosis, Intervention and Treatment Strategies. *Nutrients* **14** 3096.
- Ramaekers VT, Sequeira JM and Quadros EV** (2016) The basis for folinic acid treatment in neuropsychiatric disorders. *Biochimie* **126** 79–90.
- Rando OJ** (2012) Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. *Cell* **151** 702–708.
- Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, Snyder AZ, Finch RA, Sartorelli AC and Piwnicka-Worms D** (1999) Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96** 3900–3905.
- Reddon H, Guéant J-L and Meyre D** (2016) The importance of gene–environment interactions in human obesity. *Clinical Science* **130** 1571–1597.
- Rogenhofer N, Mischitz D, Mann C, Gluderer J, von Schönfeldt V, Jeschke U and Thaler CJ** (2019) Correlation of Vitamin D3 (Calcitriol) Serum Concentrations with Vitamin B12 and Folic Acid in Women Undergoing in vitro Fertilisation/Intracytoplasmic Sperm Injection. *Gynecologic and Obstetric Investigation* **84** 128–135.
- Roof RL and Hall ED** (2000) Gender Differences in Acute CNS Trauma and Stroke: Neuroprotective Effects of Estrogen and Progesterone. *Journal of Neurotrauma* **17** 367–388.
- Roseboom TJ, Painter RC, van Abeelen AFM, Veenendaal MVE and de Rooij SR** (2011) Hungry in the womb: What are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* **70** 141–145.
- Rospond B, Krakowska A, Krośniak M, Muszyńska B and Opoka W** (2022) The influence of high-fat and high-sucrose feeding regimes on organ weight, body weight, and serum concentration

of bioelements in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* **73** 127020.

- Ross JF, Chaudhuri PK and Ratnam M** (1994) Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* **73** 2432–2443.
- Rossetti MF, Cambiasso MJ, Holschbach MA and Cabrera R** (2016) Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *Journal of Neuroendocrinology* **28**.
- Roszkowski M and Mansuy IM** (2021) High Efficiency RNA Extraction From Sperm Cells Using Guanidinium Thiocyanate Supplemented With Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **9** 648274.
- Ryan DP, Henzel KS, Pearson BL, Siwek ME, Papazoglou A, Guo L, Paesler K, Yu M, Müller R, Xie K et al.** (2018) A paternal methyl donor-rich diet altered cognitive and neural functions in offspring mice. *Molecular Psychiatry* **23** 1345–1355.
- Saber Cherif L, Pourié G, Geoffroy A, Julien A, Helle D, Robert A, Umoret R, Guéant J-L, Bossenmeyer-Pourié C and Daval J-L** (2019) Methyl Donor Deficiency during Gestation and Lactation in the Rat Affects the Expression of Neuropeptides and Related Receptors in the Hypothalamus. *International Journal of Molecular Sciences* **20** 5097.
- Sabet JA, Park LK, Iyer LK, Tai AK, Koh GY, Pfalzer AC, Parnell LD, Mason JB, Liu Z, Byun AJ et al.** (2016) Paternal B Vitamin Intake Is a Determinant of Growth, Hepatic Lipid Metabolism and Intestinal Tumor Volume in Female Apc1638N Mouse Offspring. *PLOS ONE* **11** e0151579.
- Safarinejad MR, Shafiei N and Safarinejad S** (2011) Relationship Between Genetic Polymorphisms of Methylenetetra hydrofolate Reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as Risk Factors for Idiopathic Male Infertility. *Reproductive Sciences* **18** 304–315.
- Sahara Y, Matsuzawa D, Ishii D, Fuchida T, Goto T, Sutoh C and Shimizu E** (2019) Paternal methyl donor deficient diets during development affect male offspring behavior and memory-related gene expression in mice. *Developmental Psychobiology* **61** 17–28.
- Salbaum JM, Finnell RH and Kappen C** (2009) Regulation of folate receptor 1 gene expression in the visceral endoderm. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* **85** 303–313.
- Sbodio JI, Snyder SH and Paul BD** (2019) Regulators of the transsulfuration pathway. *British Journal of Pharmacology* **176** 583–593.
- Schlotz W, Jones A, Phillips DIW, Gale CR, Robinson SM and Godfrey KM** (2010) Lower maternal folate status in early pregnancy is associated with childhood hyperactivity and peer problems in offspring: Folate status in pregnancy and offspring childhood behavioural difficulties. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* **51** 594–602.
- Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schmidt LC, Tassone F and Hertz-Picciotto I** (2012) Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *The American Journal of Clinical Nutrition* **96** 80–89.
- Schroeder H, Humbert AC, Koziel V, Desor D and Nehlig A** (1995) Behavioral and metabolic consequences of neonatal exposure to diazepam in rat pups. *Experimental Neurology* **131** 53–63.
- Scott JM** (1997) Bioavailability of vitamin B12. *European Journal of Clinical Nutrition* **51 Suppl 1** S49–53.

- Segatto M, Di Giovanni A, Marino M and Pallottini V** (2013) Analysis of the protein network of cholesterol homeostasis in different brain regions: an age and sex dependent perspective. *Journal of Cellular Physiology* **228** 1561–1567.
- Sellem E, Marthey S, Rau A, Jouneau L, Bonnet A, Le Danvic C, Guyonnet B, Kiefer H, Jammes H and Schibler L** (2021) Dynamics of cattle sperm sncRNAs during maturation, from testis to ejaculated sperm. *Epigenetics & Chromatin* **14** 24.
- Selvage DJ and Rivier C** (2003) Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Endocrinology* **144** 594–598.
- Selvage DJ, Parsons L and Rivier C** (2006) Role Played by Brainstem Neurons in Regulating Testosterone Secretion via a Direct Neural Pathway between the Hypothalamus and the Testes. *Endocrinology* **147** 3070–3075.
- Šerý O, Šrámková T, Klempová J, Štastný F, Lochman J and Khan NA** (2012) The relationship between the C677T polymorphism of the MTHFR gene and serum levels of luteinizing hormone in males with erectile dysfunction. *Neuro Endocrinology Letters* **33** 499–504.
- Sharma U** (2019) Paternal Contributions to Offspring Health: Role of Sperm Small RNAs in Intergenerational Transmission of Epigenetic Information. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **7** 215.
- Sharma U and Rando OJ** (2017) Metabolic Inputs into the Epigenome. *Cell Metabolism* **25** 544–558.
- Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleannee C, Kucukural A, Serra RW, Sun F et al.** (2016) Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* **351** 391–396.
- Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, Jacob A, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud P-O et al.** (2011) Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Molecular Pharmaceutics* **8** 1332–1341.
- Shea JM, Serra RW, Carone BR, Shulha HP, Kucukural A, Ziller MJ, Vallaster MP, Gu H, Tapper AR, Gardner PD et al.** (2015) Genetic and Epigenetic Variation, but Not Diet, Shape the Sperm Methylome. *Developmental Cell* **35** 750–758.
- Sherwood L, Klandorf H and Yancey PH** (2016) *Physiologie animale*. Louvain-La-Neuve (Belgique)/Paris.
- Shivapurkar N and Poirier LA** (1983) Tissue levels of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets for one to five weeks. *Carcinogenesis* **4** 1051–1057.
- Sibrian-Vazquez M, Escobedo JO, Lim S, Samoei GK and Strongin RM** (2010) Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** 551–554.
- Sierra A** (2004) Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *Journal of Neuroendocrinology* **16** 787–793.
- Siklenka K, Erkek S, Godmann M, Lambrot R, McGraw S, Lafleur C, Cohen T, Xia J, Suderman M, Hallett M et al.** (2015) Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* **350** aab2006–aab2006.
- Silva RP, Kelly KB, Al Rajabi A and Jacobs RL** (2014) Novel insights on interactions between folate and lipid metabolism. *BioFactors* **40** 277–283.

- Silva T, Jesus M, Cagigal C and Silva C** (2019) Food with Influence in the Sexual and Reproductive Health. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **20** 114–122.
- Skinner MK** (1987) Cell-cell interactions in the testis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **513** 158–171.
- Smith BE and Braun RE** (2012) Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science (New York, N.Y.)* **338** 798–802.
- Smithells RW, Sheppard S and Schorah CJ** (1976) Vitamin deficiencies and neural tube defects. **7**.
- Smorag L, Zheng Y, Nolte J, Zechner U, Engel W and Pantakani DVK** (2012) MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation. *Biology of the Cell* **104** 677–692.
- Stieger B and Gao B** (2015) Drug transporters in the central nervous system. *Clinical Pharmacokinetics* **54** 225–242.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ and Marin JJ** (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **279** R1495-1503.
- Strazielle N and Gherzi-Egea J-F** (2015) Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Frontiers in Neuroscience* **9** 21.
- Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D, Lie KK, Lipkin WI, Magnus P, Reichborn-Kjennerud T et al.** (2013) Association Between Maternal Use of Folic Acid Supplements and Risk of Autism Spectrum Disorders in Children. *JAMA* **309** 570.
- Swayne BG, Kawata A, Behan NA, Williams A, Wade MG, MacFarlane AJ and Yauk CL** (2012) Investigating the effects of dietary folic acid on sperm count, DNA damage and mutation in Balb/c mice. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **737** 1–7.
- Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR and Zlokovic BV** (2019) Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews* **99** 21–78.
- Szathmari A, Jouvet A, Mottolese C, Champier J and Fèvre Montange M** (2015) Anatomical, molecular and pathological consideration of the circumventricular organs. *Neurochirurgie* **61** 90–100.
- Szymański W and Kazdepka-Ziemińska A** (2003) [Effect of homocysteine concentration in follicular fluid on a degree of oocyte maturity]. *Ginekologia Polska* **74** 1392–1396.
- Tadić A, Müller-Engling L, Schlicht KF, Kotsiari A, Dreimüller N, Kleimann A, Bleich S, Lieb K and Frieling H** (2014) Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression. *Molecular Psychiatry* **19** 281–283.
- Tajima S, Suetake I, Takeshita K, Nakagawa A and Kimura H** (2016) Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **945** 63–86.
- Takahashi-Iñiguez T, García-Hernandez E, Arreguín-Espinosa R and Flores ME** (2012) Role of vitamin B12 on methylmalonyl-CoA mutase activity. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **13** 423–437.

- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM et al.** (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* **453** 534–538.
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N et al.** (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146** 1016–1028.
- Tan Y, Zhou F, Yang D, Zhang X, Zeng M and Wan L** (2021) MicroRNA-126a-5p Exerts Neuroprotective Effects on Ischemic Stroke via Targeting NADPH Oxidase 2. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **17** 2089–2103.
- Tanigami H, Okamoto T, Yasue Y and Shimaoka M** (2012) Astroglial Integrins in the Development and Regulation of Neurovascular Units. *Pain Research and Treatment* **2012** 1–10.
- Tayarani I, Cloëz I, Clément M and Bourre JM** (1989) Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus. *Journal of Neurochemistry* **53** 817–824.
- Teltumbade M, Bhalla A and Sharma A** (2020) Paternal inheritance of diet induced metabolic traits correlates with germline regulation of diet induced coding gene expression. *Genomics* **112** 567–573.
- Thomsen MS, Routhe LJ and Moos T** (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **37** 3300–3317.
- Tirpák F, Greifová H, Lukáč N, Stawarz R and Massányi P** (2021) Exogenous Factors Affecting the Functional Integrity of Male Reproduction. *Life (Basel, Switzerland)* **11** 213.
- Tomari Y and Zamore PD** (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development* **19** 517–529.
- Tomizawa H, Matsuzawa D, Ishii D, Matsuda S, Kawai K, Mashimo Y, Sutoh C and Shimizu E** (2015) Methyl-donor deficiency in adolescence affects memory and epigenetic status in the mouse hippocampus: Methyl-donor deficiency in adolescence. *Genes, Brain and Behavior* **14** 301–309.
- Tremblay JJ** (2015) Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids* **103** 3–10.
- Tsutsui K** (2006) Biosynthesis and organizing action of neurosteroids in the developing Purkinje cell. *The Cerebellum* **5** 89–96.
- Tsutsui K** (2012) Neurosteroid Biosynthesis and Action During Cerebellar Development. *The Cerebellum* **11** 414–415.
- Tsutsui K, Ukena K, Sakamoto H, Okuyama S-I and Haraguchi S** (2011) Biosynthesis, Mode of Action, and Functional Significance of Neurosteroids in the Purkinje Cell. *Frontiers in Endocrinology* **2**.
- Tu J, Zhang P, Shui Luk AC, Liao J, Chan W-Y, Qi H, Hoi-Hung AC and Lee T-L** (2018) MicroRNA-26b promotes transition from Kit- to Kit+ mouse spermatogonia. *Experimental Cell Research* **373** 71–79.
- Twigt JM, Hammiche F, Sinclair KD, Beckers NG, Visser JA, Lindemans J, de Jong FH, Laven JSE and Steegers-Theunissen RP** (2011) Preconception folic acid use modulates estradiol and follicular responses to ovarian stimulation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96** E322-329.
- Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS and Tyagi SC** (2005) Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **289** H2649–H2656.

- Urquhart BL, Gregor JC, Chande N, Knauer MJ, Tirona RG and Kim RB** (2010) The human proton-coupled folate transporter (hPCFT): modulation of intestinal expression and function by drugs. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **298** G248-254.
- Václavíková R, Hughes DJ and Souček P** (2015) Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease. *Gene* **571** 1–8.
- Vanderhout SM, Rastegar Panah M, Garcia-Bailo B, Grace-Farfaglia P, Samsel K, Dockray J, Jarvi K and El-Sohemy A** (2021) Nutrition, genetic variation and male fertility. *Translational Andrology and Urology* **10** 1410–1431.
- Vanlandewijck M, He L, Mäe MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, Nahar K, Lebouvier T, Laviña B, Gouveia L et al.** (2018) A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* **554** 475–480.
- Visentin M, Zhao R and Goldman ID** (2012) The antifolates. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **26** 629–648, ix.
- Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW and Schneider E** (2002) Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Research* **62** 5035–5040.
- Vujkovic M, de Vries JH, Dohle GR, Bonsel GJ, Lindemans J, Macklon NS, van der Spek PJ, Steegers EAP and Steegers-Theunissen RPM** (2009) Associations between dietary patterns and semen quality in men undergoing IVF/ICSI treatment. *Human Reproduction* **24** 1304–1312.
- Wagner KD, Wagner N, Ghanbarian H, Grandjean V, Gounon P, Cuzin F and Rassoulzadegan M** (2008) RNA induction and inheritance of epigenetic cardiac hypertrophy in the mouse. *Developmental Cell* **14** 962–969.
- Walker WH** (2022) Regulation of mammalian spermatogenesis by miRNAs. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **121** 24–31.
- Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, Conley AJ, Nguyen HP, Ames BN and Halsted CH** (2007) Chronic ethanol perturbs testicular folate metabolism and dietary folate deficiency reduces sex hormone levels in the Yucatan micropig. *Biology of Reproduction* **76** 455–465.
- Wang Y, Zhao R, Russell RG and Goldman ID** (2001) Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1513** 49–54.
- Wang G-Y, Luan Z-L, Che N-W, Yan D-B, Sun X-W, Zhang C and Yin J** (2021) Inhibition of microRNA-129-2-3p protects against refractory temporal lobe epilepsy by regulating GABRA1. *Brain and Behavior* **11** e02195.
- Watkins AJ and Sinclair KD** (2014) Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **306** H1444–H1452.
- Watkins AJ, Sirovica S, Stokes B, Isaacs M, Addison O and Martin RA** (2017) Paternal low protein diet programs preimplantation embryo gene expression, fetal growth and skeletal development in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1863** 1371–1381.
- Watkins AJ, Dias I, Tsuro H, Allen D, Emes RD, Moreton J, Wilson R, Ingram RJM and Sinclair KD** (2018) Paternal diet programs offspring health through sperm- and seminal plasma-specific pathways in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115** 10064–10069.
- Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS and Kamen BA** (1992) Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer Research* **52** 6708–6711.

- Weniger JP and Zeis A** (1988) Stimulation of aromatase activity in the fetal rat gonads by cAMP and FSH. *Acta Endocrinologica* **119** 381–385.
- Whetstine JR, Flatley RM and Matherly LH** (2002) The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochemical Journal* **367** 629–640.
- Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD and Borst P** (2000) Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *The Journal of Clinical Investigation* **105** 279–285.
- Willekens J, Hergalant S, Pourié G, Marin F, Alberto J-M, Georges L, Paoli J, Nemos C, Daval J-L, Guéant J-L et al.** (2019) Wnt Signaling Pathways Are Dysregulated in Rat Female Cerebellum Following Early Methyl Donor Deficiency. *Molecular Neurobiology* **56** 892–906.
- Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen JV, Saunders PTK, Sharpe RM, França LR, De Gendt K and Verhoeven G** (2010) Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PloS One* **5** e14168.
- Williams PJ, Mistry HD and Morgan L** (2012) Folate transporter expression decreases in the human placenta throughout pregnancy and in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension* **2** 123–131.
- Wilson RD, Genetics Committee, Wilson RD, Audibert F, Brock J-A, Carroll J, Cartier L, Gagnon A, Johnson J-A, Langlois S et al.** (2015) Pre-conception Folic Acid and Multivitamin Supplementation for the Primary and Secondary Prevention of Neural Tube Defects and Other Folic Acid-Sensitive Congenital Anomalies. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada: JOGC* **37** 534–552.
- Winters SJ** (2020) SHBG and total testosterone levels in men with adult onset hypogonadism: what are we overlooking? *Clinical Diabetes and Endocrinology* **6** 17.
- Wirth MM** (2011) Beyond the HPA Axis: Progesterone-Derived Neuroactive Steroids in Human Stress and Emotion. *Frontiers in Endocrinology* **2**.
- Wollack JB, Makori B, Ahlawat S, Koneru R, Picinich SC, Smith A, Goldman ID, Qiu A, Cole PD, Glod J et al.** (2008) Characterization of folate uptake by choroid plexus epithelial cells in a rat primary culture model. *Journal of Neurochemistry* **104** 1494–1503.
- Wu S, Guo W, Yan T, Zhou J, Li Y, Zhu Y, Duan Y and Yang X** (2019a) Spermatozoal mRNAs expression implicated in embryonic development were influenced by dietary folate supplementation of breeder roosters by altering spermatozoal piRNA expression profiles. *Theriogenology* **138** 102–110.
- Wu S, Guo W, Li X, Liu Y, Li Y, Lei X, Yao J and Yang X** (2019b) Paternal chronic folate supplementation induced the transgenerational inheritance of acquired developmental and metabolic changes in chickens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286** 20191653.
- Wyns C, De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Motrenko T, Smeenk J, Bergh C, Tandler-Schneider A, Rugescu IA, Vidakovic S et al.** (2021) ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction Open* **2021** hoab026.
- Xiong Y and Steitz TA** (2006) A story with a good ending: tRNA 3'-end maturation by CCA-adding enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* **16** 12–17.
- Xu J, Anuar F, Ali SM, Ng MY, Phua DCY and Hunziker W** (2009) Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Molecular Biology of the Cell* **20** 4268–4277.

- Yadav RP, Mäkelä J-A, Hyssälä H, Cisneros-Montalvo S and Kotaja N** (2020) DICER regulates the expression of major satellite repeat transcripts and meiotic chromosome segregation during spermatogenesis. *Nucleic Acids Research* **48** 7135–7153.
- Yang Q-E, Racicot KE, Kaucher AV, Oatley MJ and Oatley JM** (2013) MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. *Development (Cambridge, England)* **140** 280–290.
- Yin J and Zhang J** (2011) Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) polymorphism: from discovery to clinical application. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences* **36** 927–938.
- Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q and Tomari Y** (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural & Molecular Biology* **17** 17–23.
- Yu Z, Fang X, Liu W, Sun R, Zhou J, Pu Y, Zhao M, Sun D, Xiang Z, Liu P et al.** (2022) Microglia Regulate Blood-Brain Barrier Integrity via MiR-126a-5p/MMP9 Axis during Inflammatory Demyelination. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* **9** e2105442.
- Yuan H-F, Zhao K, Zang Y, Liu C-Y, Hu Z-Y, Wei J-J, Zhou T, Li Y and Zhang H-P** (2017) Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of *Esr1*, *Cav1*, and *Elav1*, and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget* **8** 24130–24141.
- Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, de Mouzon J, Nygren KG and Sullivan EA** (2014) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2005. *Fertility and Sterility* **101** 366–378.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, Rienzi L, Sunde A, Schmidt L, Cooke ID et al.** (2017) The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility* **108** 393–406.
- Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, Marques S, Munguba H, He L, Betsholtz C et al.** (2015) Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science (New York, N.Y.)* **347** 1138–1142.
- Zhang Y, Yuan H, Peng M, Hu Z, Fan Z, Xu J, He L, Wang Y, Wang W, Su Y et al.** (2021) Folic acid deficiency damages male reproduction via endoplasmic reticulum stress-associated PERK pathway induced by Caveolin-1 in mice. *Systems Biology in Reproductive Medicine* **67** 383–394.
- Zhang T, Sun P, Geng Q, Fan H, Gong Y, Hu Y, Shan L, Sun Y, Shen W and Zhou Y** (2022) Disrupted spermatogenesis in a metabolic syndrome model: the role of vitamin A metabolism in the gut-testis axis. *Gut* **71** 78–87.
- Zhao R and Goldman ID** (2007) The molecular identity and characterization of a Proton-coupled Folate Transporter--PCFT; biological ramifications and impact on the activity of pemetrexed. *Cancer Metastasis Reviews* **26** 129–139.
- Zhao R, Russell RG, Wang Y, Liu L, Gao F, Kneitz B, Edelman W and Goldman ID** (2001) Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 10224–10228.
- Zhao R, Qiu A, Tsai E, Jansen M, Akabas MH and Goldman ID** (2008a) The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Molecular Pharmacology* **74** 854–862.
- Zhao L, Kim KW, Ikeda Y, Anderson KK, Beck L, Chase S, Tobet SA and Parker KL** (2008b) Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **22** 1403–1415.

- Zhao R, Aluri S and Goldman ID** (2017) The proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) and the syndrome of systemic and cerebral folate deficiency of infancy: Hereditary folate malabsorption. *Molecular Aspects of Medicine* **53** 57–72.
- Zhao G-K, Zheng Y, Guo H-X, Wang H-Q, Ji Z-H, Wang T, Yu S, Zhang J-B, Yuan B and Ren W-Z** (2022) TRH Regulates the Synthesis and Secretion of Prolactin in Rats with Adenohypophysis through the Differential Expression of miR-126a-5p. *International Journal of Molecular Sciences* **23** 15914.
- Zhou Y, Zhu H, Wu H, Jin L, Chen B, Pang H, Ming Z, Cheng Y, Zhou C, Guo M et al.** (2018) Diet-Induced Paternal Obesity Impairs Cognitive Function in Offspring by Mediating Epigenetic Modifications in Spermatozoa. *Obesity* **26** 1749–1757.
- Zimmermann C, Romero Y, Warnefors M, Bilican A, Borel C, Smith LB, Kotaja N, Kaessmann H and Nef S** (2014) Germ cell-specific targeting of DICER or DGCR8 reveals a novel role for endo-siRNAs in the progression of mammalian spermatogenesis and male fertility. *PLoS One* **9** e107023.
- Zwain IH and Yen SS** (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* **140** 3843–3852.

## Annexes :

---

### **Annexe n°1 : Liste des publications relatives au travail de thèse**

**Dimofski, P.**; Meyre, D.; Dreumont, N.; Leininger-Muller, B. Consequences of Paternal Nutrition on Offspring Health and Disease. *Nutrients* 2021, 13, 2818.

Review

# Consequences of Paternal Nutrition on Offspring Health and Disease

Pauline Dimofski <sup>1</sup> , David Meyre <sup>1,2</sup>, Natacha Dreumont <sup>1</sup> and Brigitte Leininger-Muller <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Nutrition-Génétique et Exposition aux Risques Environnementaux (NGERE), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France; pauline.dimofski@univ-lorraine.fr (P.D.); david.meyre@univ-lorraine.fr (D.M.); natacha.dreumont@univ-lorraine.fr (N.D.)

<sup>2</sup> Service de Biologie-Biologie Moléculaire-Nutrition, CHRU-Nancy, Université de Lorraine, F-54000 Nancy, France

\* Correspondence: brigitte.leininger@univ-lorraine.fr

**Abstract:** It is well established that the maternal diet during the periconceptual period affects the progeny's health. A growing body of evidence suggests that the paternal diet also influences disease onset in offspring. For many years, sperm was considered only to contribute half of the progeny's genome. It now appears that it also plays a crucial role in health and disease in offspring's adult life. The nutritional status and environmental exposure of fathers during their childhood and/or the periconceptual period have significant transgenerational consequences. This review aims to describe the effects of various human and rodent paternal feeding patterns on progeny's metabolism and health, including fasting or intermittent fasting, low-protein and folic acid deficient food, and overnutrition in high-fat and high-sugar diets. The impact on pregnancy outcome, metabolic pathways, and chronic disease onset will be described. The biological and epigenetic mechanisms underlying the transmission from fathers to their progeny will be discussed. All these data provide evidence of the impact of paternal nutrition on progeny health which could lead to preventive diet recommendations for future fathers.

**Keywords:** paternal nutrition; metabolic outcomes; pregnancy health; epigenetic



**Citation:** Dimofski, P.; Meyre, D.; Dreumont, N.; Leininger-Muller, B. Consequences of Paternal Nutrition on Offspring Health and Disease. *Nutrients* **2021**, *13*, 2818. <https://doi.org/10.3390/nu13082818>

Academic Editor: Hisanori Kato

Received: 19 July 2021  
Accepted: 13 August 2021  
Published: 17 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



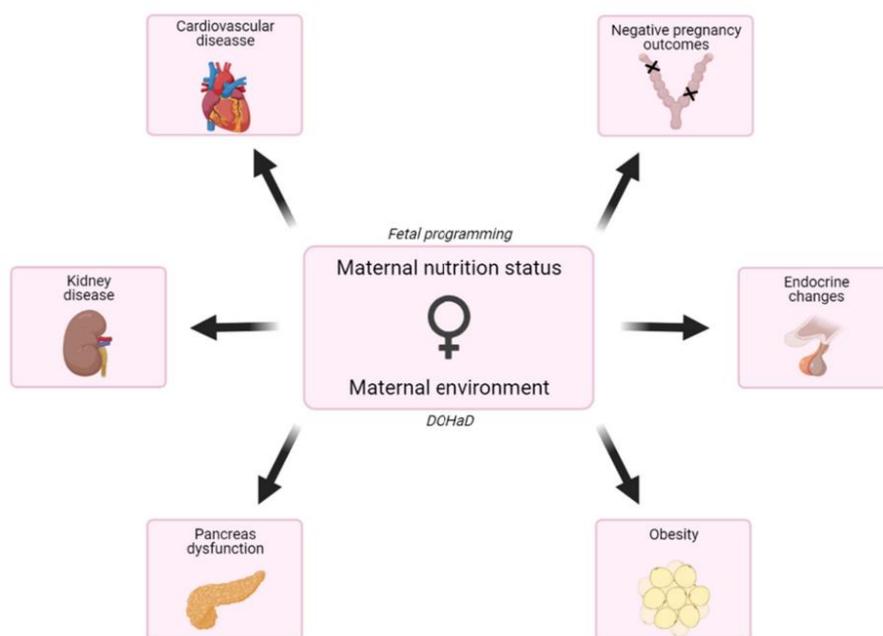
**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

It is now well established that maternal imbalanced nutrition during in utero period impacts offspring's health and development. The fetal programming (the Barker) hypothesis (or DOHaD, developmental origins of health and diseases) stems from the link between maternal exposure to environmental factors and the development of complex diseases in adulthood. It postulates that changes occurring during fetal growth, such as a lack of nutrients or any environmental stress, can predispose to developing complex diseases in adulthood [1,2] (Figure 1).

While the consequences of maternal diet on offspring health have been studied for 40 years, they remain partially understood (for review, see [3]). Since the 80s, it has been recognized that maternal folate deficiency is associated with neural tube defects (NTD) and intra-uterine growth retardation in the offspring [4]. These observations led to the World Health Organization (WHO) current recommendations, according to which all women should take a daily folic acid supplement from the pre-conceptual period until 12 weeks of gestation to prevent NTD [4]. Alteration of the maternal folate status also has consequences on birth weight, glucose blood levels, and insulin resistance (reviewed in [5]). Our previous work using a unique, well-defined animal model based on rats born from dams fed a methyl-deficient diet during gestation and lactation reported neurosteroidogenesis and epigenetic alterations associated with cognitive and motor disorders during offspring postnatal cerebral development [6–8]. Many studies show that maternal micronutrient

deficiency is associated with an increased risk of cardiovascular disease, obesity, and type 2 diabetes in the offspring. Macronutrients like proteins or fat are also concerned, as suggested by several studies showing that a low or a high protein intake during pregnancy is linked to adverse health outcomes for the offspring [9]. Similarly, the quality but not the quantity of fat and adequate supply of vitamins and minerals plays a critical role during fetal development [10–12].



**Figure 1.** Effects of maternal nutrition status and environment exposition on the progeny. The fetal programming hypothesis postulates that changes occurring during fetal growth, such as a lack of nutrients, can predispose them to disease in adulthood. The fetal programming hypothesis is completed with the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) concept, which includes exposition to toxins and chemicals, use of drugs, infections and other stimulations but also nutritional status during pregnancy, and early life.

A growing body of evidence now suggests that the male environment and feeding patterns may also impact the progeny. To complete the DOHaD theory, the concept of Paternal Origins of Health and Disease (POHaD) was recently introduced (for review, see [13]). Reports have shown a decline in sperm quality in the past decades, likely due to environmental expositions or lifestyle factors [14]. Reproductive disorders are numerous and differ between men and women, the most common being infertility [15]. One of the common factors leading to infertility is the environmental exposure to toxins before conception, which influences sperm epigenetic processes (for review, see [16]). These toxins include environmental pollutants [17], endocrine-disrupting chemicals [18,19], and pharmaceutical drugs [20]. Lifestyle factors such as diet and exercise [21], alcohol and tobacco consumption [22], obesity, and trauma and stress situations [16] can influence fertility rates in humans. Recent studies suggest that the father's environment may also impact fetal development and adult offspring health (for review, see [23]), considering the exposition to toxins or an altered diet could have epigenetic transgenerational consequences [19,24–26]. Deleterious effects issued from fathers are transmitted to the next generations via sperm.

The underlying mechanisms are still poorly understood, but there is a growing body of evidence that small non-coding RNAs (sncRNAs) present in the sperm also play a pivotal role [27–29]. According to Dupont et al. (2019), transmission modalities are different between mothers and fathers. Transgenerational epigenetic inheritance from an exposed gestating female occurs when the transmission of the phenotypic alteration reaches the F3 generation, whereas it occurs in F2 when the male is exposed. Otherwise, the mode of inheritance is classified as intergenerational [27].

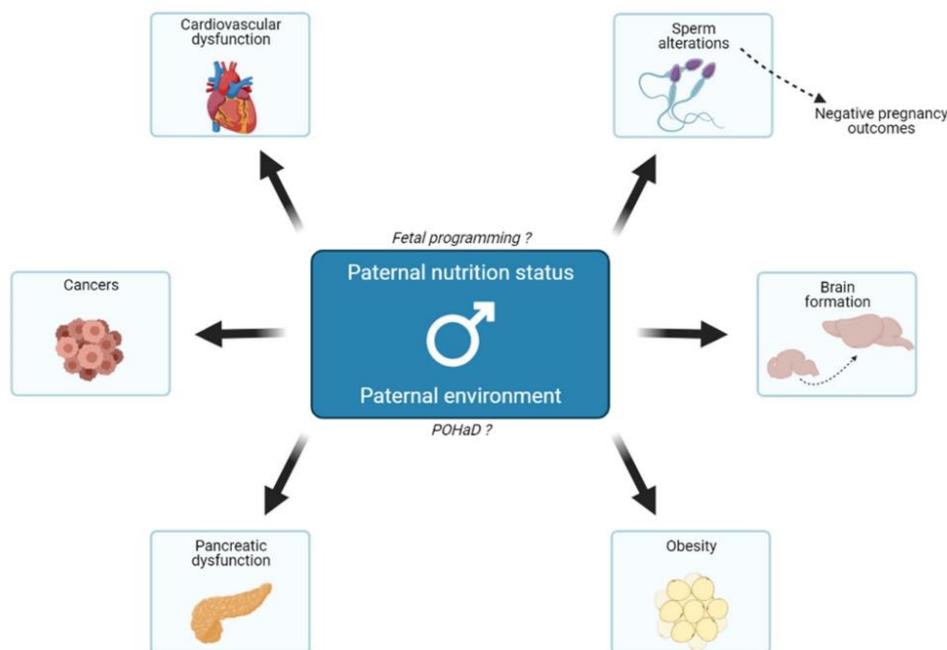
Most of the reported studies focused on rodent models. The epigenetic nature of transgenerational effects was initially mentioned by the pioneering Dutch famine [30,31] or the Overkalix cohort [32–35] studies. Many rodent models have been developed with various dietary modifications. The timing of animals' exposure to these diets is critical and clearly influences the various outcomes described in these studies. This report focuses on the metabolic and molecular impacts of paternal diet (Table 1) on the offspring's health. It mainly concerns the most described low nutrient diets like low-protein, fasting, or folic acid deficiency as well as high nutrient diets, like high sugar or high-fat diet which both are a health concern. The possible underlying molecular and epigenetic mechanisms will be discussed.

**Table 1.** Paternal nutrition status effects.

	Effects	Paternal Diet	References
Metabolism	Body weight and adiposity	Low protein	[21,36–43]
		HFD	
	Glucose intolerance or hyperglycemia	Food restriction	[37,38,40,44–47]
		FA deficient	
		High sugar	
		Low protein	
Insulin resistance or hyperinsulinemia	HFD	[40,45–47]	
	High sugar	[42,48]	
Carbohydrate metabolism	HFD	[42,48]	
Lipid metabolism	High sugar	[42,48]	
Uricemia	FA deficient or supplemented	[21,44,46,47]	
	Food restriction	[43,46,47]	
	High sugar	[43,46,47]	
Development	Skeleton	Low protein	[49,50]
	Fetal or post-natal growth	FA deficient	[49,50]
		Food restriction	[21]
	Spermatogenesis	FA deficient	[49]
Embryo or placenta abnormalities	FA supplemented	[42,48,51–53]	
Pregnancy outcomes	Number of plugs/pregnancies	HFD	[41,42,48,52]
	Pre or Post implantation development	FA deficient	[41,42,48,52]
		HFD	[41,42,48,52]
	Morphological retardation	FA deficient	[42,48,49]
	Postnatal mortality	FA deficient or supplemented	[51]
Organ and system dysfunction	Breast cancer	Low protein	[54]
	Diabetic kidney disease	High sugar	[55]
	Cardiovascular system	Low protein	[37,38,43,46,47,55]
		High sugar	[37,38,43,46,47,55]
	Sperm	HFD	[41,46,51,56,57]
		High sugar	[41,46,51,56,57]
Endocrine system	FA deficient or supplemented	[46]	
Central nervous system	High sugar	[46]	
		FA deficient	[36,58]

## 2. Epigenetic Mechanisms Involved in the Transgenerational Transmission

It is now evident that paternal exposure to environmental cues, especially an imbalanced diet, can affect the later development of the progeny (Figure 2).



**Figure 2.** Effects of paternal nutrition status and environment on their offspring. The paternal nutritional status can act on offspring's growth and metabolism and, therefore, its predisposition to various diseases in adulthood. That is related to the fetal programming hypothesis because fathers act indirectly on fetal growth. Besides, in the same way as the DOHaD theory, the POHaD paradigm suggests that the paternal environment could also influence the offspring's metabolic changes. Mechanisms underlying all these events are poorly understood, but emerging evidence suggests that it could be transmitted through the sperm epigenome, notably in the case of negative pregnancy outcomes.

Effects are observed in the F1 generation (intergenerational transmission) and the subsequent ones (transgenerational transmission). This suggests that molecular clues are transmitted through the sperm and impact gene expression in the progeny. The likeliest scenario is that epigenetic marks are delivered by sperm to the zygote. With the advances in the field of epigenetics, the mechanisms responsible for this transgenerational inheritance begin to be better understood, with evidence pointing towards the involvement of DNA methylation, histone modifications, and above all, sncRNAs. All these events can interfere with each other [59] and are transmissible through the germline to the next generation without the intervention of genetic mechanisms (for reviews, see [28,60,61]; Table 2). The methylation process is allowed by methyl donors' availability provided by one-carbon metabolism, which is an essential process for DNA methylation and DNA, RNA, and protein synthesis. Methionine is the precursor of SAM, the primary methyl group donor in the body's methylation processes. The availability of methionine is dependent on the folate and methionine cycles. Therefore, folate status directly impacts epigenetic modifications [62]. Methylation reactions near gene promoter regions and histones can impact the transcriptional regulation and make the promoter regions inaccessible to transcription

factors, and, therefore, influence the transcription of genes. For example, a father's low protein diet in mice impairs tRNA fragments content in the sperm during its maturation, which are responsible for regulating gene expression [25,63]. Moreover, there are also presumptions about a father transmission to offspring involving small RNAs in mice [64–66], which are detailed in recent reviews [27–29].

**Table 2.** Epigenetic and RNA alteration induced by fathers' nutrition status.

Effects	Paternal Diet	References	Comments
Epigenetic alterations	Sperm DMRs <sup>1</sup>	Low protein FA deficient or supplemented	[51,54] Paternally imprinted gene H19
	DNA methylation	Low protein HFD FA deficient Food restriction	[38,39,49,56] Genes involved in neurological and autoimmune disease, diabetes, cancer, autism and schizophrenia
	Gene expression and transcriptome	High sugar	[63,67] H3K9-me3 regulators and Polycomb
	Sperm mutations	FA deficient or supplemented	[57] DNA fragmentation and tandem repetitions
RNA changes	Sperm mRNA content and/or expression levels	Low protein HFD High sugar FA sufficient	[24,25,39,40,64,65,67–69] Metabolic disorders, lipid metabolism, embryonic development and spermatogenesis
	sncRNA	Low protein High sugar HFD	[25,69] tRNA and tsRNA
		FA supplemented	[39,68] piRNA
		Low protein HFD FA supplemented	[25,39,40,44,64–66] miRNA let-7 species miR-19 species miR-182 miR-183 miR-340 miR-193b miR-204

<sup>1</sup> DMRs for differentially methylated regions.

DNA methylation is the most studied epigenetic mark. It is a dynamic modification that is erased and reset during two rounds of reprogramming, one in primordial germ cells during gametogenesis and the other one later in the preimplantation embryo. Mice studies on various nutritional models, including high fat, low protein, undernutrition, or folate deficiency, suggest that only a small number of sperm loci are differentially methylated according to paternal feeding [24,49,51,70–72]. Moreover, a limited subset of them is maintained in offspring's tissues [73]. In a paternal mouse model fed a high-fat diet and leading to glucose intolerance in the F1 offspring, a genome-wide comparison between the transcriptome and DNA methylation indicates that differential DNA methylation is not responsible for changes in gene expression [74].

The role of histone modifications in paternal intergenerational inheritance is unclear, mainly because only a few studies have focused on these epigenetic marks. Moreover, chromatin in sperm displays a different organization than in somatic tissues. Histones are replaced by transition proteins and then by protamines during spermatogenesis. Only a small fraction of the human sperm chromatin escapes this remodeling [75]. The fact that the remaining sperm histone modifications are transmitted to the embryo suggests a role beyond fertilization. However, histone positioning was similar in sperm from lean or obese men, whereas DNA methylation and sncRNA content were modified [76]. Feeding male mice with a high-fat diet for ten weeks induced H3K4me1 enrichment at transcription regulatory genes compared to controls and changes in hepatic expression levels of 7 genes in the offspring [77]. Paternal sugar in *Drosophila* was reported to alter

H3K9 and H3K27me3 deposition in the zygote, with chromatin state rewiring later in the adult progeny, which was associated with obesity susceptibility [78]. To further point towards a role of histone modification in transgenerational inheritance despite the lack of studies, mice paternal overexpression of the gene coding for the H3K4 demethylase (KDM1A, also known as LSD1) affects development and survival in offspring [79].

Last but not least, sncRNA content in the sperm is affected by diet and has been the center of interest in recent years. Despite cytoplasm and RNA are ejected at the end of spermatogenesis, there remain mRNA fragments and several types of sncRNA in mature spermatozoa: the well-described miRNAs, piRNAs, endo-siRNAs, and tRNA-derived fragments, these being the most abundant in the spermatozoa [29]. Recent studies suggest that these sncRNAs are the molecules enabling the paternal transmission to the progeny, as injecting sperm RNA content in fertilized oocytes is sufficient to recapitulate the phenotype in the progeny. Effects of a high-fat or low protein diet on sncRNA were the most described (reviewed in [28]), with a significant role of tRNA-derived fragments. tRF-Gly-GCC levels were increased in the sperm of male mice fed a low protein diet. The expression of targets of these tRNA-derived fragments was consequently diminished in embryos [25].

### 3. Impact of Paternal Folic Acid Intake on Progeny's Health

#### 3.1. Paternal Folate Deficiency

Folate, an essential vitamin B, is a pivotal molecule in the one-carbon metabolism. Folate participates in S-adenosylmethionine (SAM) synthesis, which plays a significant role in many biological processes like DNA, RNA, and protein methylation [80]. SAM is also essential in the amino acid [80] or lipid metabolism and hormonal synthesis [81] or nucleotide synthesis [64]. Since the 80s, it is recognized that maternal folate deficiency is associated with NTD and more subtle changes in offspring development [4]. A lowered maternal folate status has other consequences in offspring, such as intrauterine growth retardation, low birth weight, hyperglycemia, and insulin resistance (reviewed in [5]). There are emerging shreds of evidence that paternal folate intake also impacts the offspring's health and disease onset. A recent study highlighted that offspring of paternal folate deficient rats are more susceptible to develop anxious and depressive traits [36]. In 2013, a mouse study reported by Lambrot et al. showed that a low paternal folate intake during the periconceptional period alters the sperm epigenome and can be linked to adverse pregnancy outcomes, such as a reduced pregnancy rate post-implantation loss, fused and abnormal placentas [49]. Folate status influences reproductive health in humans, especially the gestation duration when fathers have a 4 mg/day folate intake [52] (for review, see [82]). There is a higher frequency of developmental abnormalities in mice like craniofacial malformations, limb defects, muscle and/or skeletal development delay [49]. Moreover, offspring of the folate-deficient fathers (0.3 mg/kg) display lateness in the meiosis appearance at postnatal day 12. No significant difference in sperm counts, spermatogenesis, nor testis morphology was observed in adulthood [49], while Yuan et al. found an impaired spermatogenesis process in the same conditions [56], and Swayne et al., report a decreased sperm count [57]. Other rodent studies showed paternal folate deficiency impacts placental folate transport [53], DNA methylation and/or mutation [57,58,83,84], and Igf-2 expression level in the fetal brain [83,84].

#### 3.2. Paternal Folate Supplementation

Paternal supplementation is also being investigated. According to Ly et al., it might affect embryo abnormalities with an increase in the offspring sired by F1 males fed with a 20-fold folate sufficient diet compared with folate-deficient fathers [51]. The authors found that there was no difference in the number of pups or the body weight in the F1 litter sizes at birth, but they measured a significant decrease in the sperm count at postnatal day 200 when males were fed 20-fold folate sufficient diet (40 mg/kg) [51]. At weaning, a supplemented diet negatively impacted the F2 litter sizes and increased the postnatal mortality in the same manner as when fathers were fed with a folate-deficient diet [51]. Furthermore, el-

evated paternal methyl-donor consumption affects cognitive and neural function, especially hippocampus-dependent learning and memory function and hippocampal synaptic plasticity [85]. Chicken studies highlighted that paternal folic acid supplementation could impact spermatozoa mRNA expression [44] and induce transgenerational metabolic changes [68].

In summary, it appears that both folate deficient and supplemented diets could have an intergenerational impact on the offspring [86]. Thus, paternal folate intake is as crucial as maternal intake, and it must be taken into consideration for further recommendations.

#### 4. Depleted Paternal Diets and Their Effects on the Progeny

##### 4.1. Impact of a Paternal Low-Protein Diet

Obesity results from an imbalance between energy intake and energy expenditure and is influenced by genetic predisposition and/or epigenetic inheritance and transgenerational effects [87,88]. For instance, the protein content of the paternal diet influences offspring metabolism. When fathers are fed a low protein diet (LPD) in mice, pups are more prone to glucose intolerance, metabolic and cardiovascular dysfunctions, impaired skeletal development, and altered patterns of bone mineral deposition [24,37,38,50]. Moreover, male pups of LPD fathers are heavier [37], whereas female pups are lighter than control pups [54]. Alteration in offspring vascular function was also reported [89] and an increased risk of developing breast cancer in female offspring [54]. Offspring gene expression is altered, especially genes involved in cholesterol and lipid synthesis pathways [24,90]. It also negatively affects gene expression of various AMPK pathways in the blastocysts but positively affects genes regulating fetal growth, with up-regulation of genes coding for nutrient transporter in the placenta and imprinted genes involved in fetal growth regulation [38,54]. Taken together, these results suggest that paternal LPD could have an adverse effect on the offspring, with females slightly more affected than males.

##### 4.2. What about Paternal Food Restrictions?

Since the Dutch famine, there are pieces of evidence that poor maternal nutrition during the conception period could lead to negative consequences, not only for mental but also for physical health. Most studies focused on later life health, considering the exposure time, and developing tissues or organs, the early gestational period being the most vulnerable time. Offspring of people subjected to famine has an increased risk of type-2 diabetes, heart disease, depression, and schizophrenia, as well as premature aging [86]. Similar effects seem to occur in undernourished African populations (for review, see [86]). However, most of these data concern mother exposition to undernutrition, and there are few studies concerning father fasting. When fathers are fasting, both male and female progeny display a decreased glycemia and an increased serum corticosterone level, but there are also changes in the serum IGF-1 concentration in the offspring [91]. Using a 70% restriction diet, McPherson et al. reported that paternal food restriction impairs preimplantation embryo development, global methylation, and function of sperm with possible consequences on their fertility. This caloric restriction also had consequences of a reduced postnatal weight and growth retardation, with an increase of dyslipidemia and adiposity prevalence in the offspring [21]. A study in *Caenorhabditis elegans* also highlighted that paternal food restriction affects both males' and females' progeny's fat content [92]. McPherson et al. further investigated the father's antioxidant and vitamin supplementation (vitamin B9, C, E, lycopene, selenium, zinc, and green tea extract) and showed that oxidative status in their sperm is correlated with the progeny growth [21]. Supplementation of food-restricted fathers reversed the effects on offspring's adiposity and weight. Food restriction affected gene expression in a sex-specific manner in the progeny and was partially reversed by antioxidant and vitamin supplementation [21]. Human [93] and rodents [94,95] studies provide evidence that food restriction also positively impacts blood glucose levels, insulin sensitivity, adiposity, and type-2 diabetes risk. As for the effects at the cellular level, many studies underline the involvement of DNA repair, autophagy, adaptive cellular stress response signaling pathways, mitochondrial health, stem cell-based regeneration, and

long-term metabolic effects in the mechanisms related to intermittent fasting [96]. Another study developed on mice embryos suggests that mothers could modulate the effects of paternal caloric restriction on offspring development. In fact, the authors observed absence or reversed effects on the progeny between embryo transfer and natural mating [97]. Furthermore, paternal dietary changes before conception could impact offspring's behavior, since an anxiolytic-like behavior has been described in adulthood [98].

## 5. Effects of Enriched Paternal Diets on Offspring

### 5.1. Consequences of a Paternal High-Fat Diet

A paternal high-fat diet (HFD) may influence metabolic outcomes and obesity in human offspring [99,100] (for review, see [101]). In animal models, this diet is known to induce a transgenerational body-weight reduction in the rat pups at postnatal day 3 [39], but an increase for older offspring in mice [40,48,102,103] with a higher body fat mass [41,102,103]. Rodent fathers fed with an HFD can transmit pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and glucose intolerance to their F1 female offspring [45] and an altered response to insulin in F1 male offspring [40]. Further investigations on retroperitoneal white adipose tissue demonstrate that numerous metabolic pathways in offspring are impacted, such as cellular and mitochondrial response to stress, cell survival and death, telomerase signalling, cellular growth and proliferation, and cell cycle [104]. Paternal consumption of HFD gives genetic signatures linked to chronic degenerative diseases and early aging, both in pancreatic  $\beta$ -cell and retroperitoneal white adipose tissue of their offspring [45,104]. Furthermore, paternal HFD exposure can lead to an increased risk of chronic kidney disease [102] and to the development of a metabolic syndrome-like phenomenon [103]. Moreover, Zhou et al. report that paternal HFD results in cognitive impairments in the F1 pups but not in the F2 generation in mice. These impairments are linked to decreased hippocampal neurogenesis. These results are potentially due to the increased methylation of the *BDNF* gene promoter transmitted by F0 spermatozoa [105]. When fathers are fed an HFD, mating female mice show a reduced number of plugs and pregnancies, possibly because of their 20% sperm motility decreases [41]. In vitro fertilization with sperm from fathers fed with an HFD shows a delay in the preimplantation development of embryos and a reduced frequency of blastocyst formation, and a decreased ability of embryos to implant in the uterine wall. Blastocyst biological processes are also concerned; changes in the carbohydrate metabolism with an increased glycolysis pathway and pyruvate uptake, and reduced mitochondrial membrane potential [42,48]. Additional reports showed that it could also lead to adverse pregnancy outcomes like a reduced rate of ongoing pregnancy, placental and fetal weights, and morphological retardation such as a retarded limb morphology and a decreased crown-rump length [42,48]. These data suggest that paternal HFD negatively impacts embryo physiology and its adult health status in rodents.

### 5.2. Impacts of a Paternal High-Sugar Diet

As a low-protein diet or an HFD, paternal high sugar nutrition adversely affects their offspring. A high-sugar diet is a health concern. It is known that this diet has a deleterious impact on human physiology [43,55]. Excess intake of sugars like glucose or fructose has consequences on cardiovascular and metabolic diseases. Fructose is currently added to industrialized food [106], and its overconsumption induces an increased hepatic triacylglycerol concentration, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and an alteration in glucose metabolism with hyperinsulinemia in both mothers and fathers [46,47]. Consequently, for their offspring, if mother or father alone, or both, are subjected to a high-fructose diet, a decreased adiponectin concentration but an increased leptin level, as well as increased blood pressure, uricemia, and genital fat are observed [46,47]. When parents are both fed a high-fructose diet, there are more severe effects on offspring's liver metabolism in association with increased inflammatory markers [46] (for review, see [107]). In the same way, another study in *Drosophila* shows that a paternal high-sugar diet could be linked to altered energy homeostasis in the offspring. However, it did not affect the growth

and the development of the offspring, but stably reprogrammed their metabolism [67,78,108]. The study conducted by Nätt et al. show that RNA sperm contents change rapidly in response to a high-sugar diet in human. They used a two-step strategy in which each participant was his own control [69]. In this study, they reported that the sperm count was unaffected, but some specific subtypes of tsRNAs were up-regulated in response to a high-sugar diet. Then, they compared with obese men who also have an alteration in their tsRNAs sperm contents [69]. The combination of high-sugar with a high-fat diet results in a dysfunction of the reproductive system with an earlier testicular descent in the F1 generation [109]. The authors also observed a statistical difference in the A and B phases penile glans morphology ages in F1 and F2 generations when males are fed a hypercaloric diet. This hypercaloric diet is also known to increase fat mass in rats [80,109] and in mice [64,81]. These earlier studies suggest that a high sugar or a hypercaloric diet could affect both the offspring's metabolism and reproductive parameters.

## 6. Conclusions and Perspectives

The maternal nutrition status strongly influences fetal development and growth, but it becomes more and more evident that both parents' nutritional status acts on offspring's health and disease in adulthood (for review, see [110]). Diet modifications in fathers, whether it is an excess or a restriction of nutrients, lead to negative pregnancy outcomes and/or metabolic changes in their progeny. Changes during critical periods of the embryo and fetal development may have long-term consequences [59,111]. The differences between the duration and/or the period of exposition to an altered diet have to be considered, as well as the model that is used, animals or a human study. For instance, a paternal HFD exposition before mating induces a decreased [39] body weight during early postnatal days in the mice offspring while it is increased at later life in a rat model [40,48]. Furthermore, another study made on rats shows that maternal, but not paternal, HFD affects both F1 male and female offspring's phenotypic parameters (blood glucose level, plasma insulin, and leptin, HOMA, percentage of body fat). Plasma leptin levels are also affected in the F2 generation from F1 females fed an HFD [112]. These results are inconsistent with the study of Masuyama et al. [103], who reported an effect of paternal diet on pup's metabolism. An explanation could be the animal model used, rat vs. mice, and/or the differences between the diet composition used: 34% vs. 62% fat, 23% vs. 18% protein, 43% vs. 20% carbohydrate [103,112].

It is important to note that some inherited epigenetic signatures are preserved between species like the fly, mouse, and human [78]. Besides epigenetic mechanisms, human studies are focusing on the genetic aspects of POHaD. Kong et al. sequenced the entire genome of Icelandic people to study their genome-wide de novo mutation rate. The single-nucleotide polymorphism mutation rate diversity was linked to the father's age at conception, with no effect of the mother's age [113]. They further studied how sex-dependent differences in the maintenance and development of germ cells affect their mutability. They observed that the mother's age was more responsible for the increased number of clustered mutations than the father's age. The authors also highlighted that de novo mutation clusters are greater in the maternal genome than in paternal ones [114,115]. Both maternal and paternal age at conception are essential factors of transmitting de novo mutations to the progeny. Besides age, environmental exposures, including diets, may also impact de novo mutation rate in fathers with possibly transgenerational consequences. Further investigations are needed to understand how father's diet and/or exposition to environmental factors can influence the disease onset of their children during adulthood. The literature on the topic in humans is slightly limited and should be prioritized in the future.

All these shreds of evidence highlight the importance of the father's nutritional status during the periconceptual period for providing an efficient fetal development and growth of the progeny. All these events are adaptive and may change during life to confer, or not, predisposition for chronic disease onset in adulthood. Despite all these data, the underlying

mechanisms remain poorly understood and should be investigated in the future in order to provide fathers with optimal dietary recommendations.

**Author Contributions:** P.D. wrote the review; all authors (P.D., D.M., N.D. and B.L.-M.) have reviewed and edited this review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This review is part of a project funded by Région Grand Est.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

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

### Abbreviations

DOHaD	developmental origins of health and diseases
HFD	high-fat diet
LPD	low protein diet
NTD	neural tube defect
PND	postnatal day
POHaD	paternal origins of health and disease
SAM	S-adenosyl methionine
sncRNAs	small non-coding RNAs
WHO	world health organization

### References

- Hales, C.N.; Barker, D.J.P. The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* **2001**, *60*, 5–20. [[CrossRef](#)]
- Barouki, R.; Gluckman, P.D.; Grandjean, P.; Hanson, M.; Heindel, J.J. Developmental origins of non-communicable disease: Implications for research and public health. *Environ. Health* **2012**, *11*, 42. [[CrossRef](#)]
- Marangoni, F.; Cetin, I.; Verduci, E.; Canzone, G.; Giovannini, M.; Scollo, P.; Corsello, G.; Poli, A. Maternal Diet and Nutrient Requirements in Pregnancy and Breastfeeding. An Italian Consensus Document. *Nutrients* **2016**, *8*, 629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De-Regil, L.M.; Fernandez-Gaxiola, A.C.; Dowswell, T.; Peña-Rosas, J.P. Effects and safety of periconceptional folate supplementation for preventing birth defects. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*; The Cochrane Collaboration, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2010; p. CD007950.pub2.
- Crott, J.W. Effects of altered parental folate and one-carbon nutrient status on offspring growth and metabolism. *Mol. Asp. Med.* **2017**, *53*, 28–35. [[CrossRef](#)]
- El Hajj Chehadeh, S.E.; Pourié, G.; Martin, N.; Alberto, J.-M.; Daval, J.-L.; Guéant, J.-L.; Leininger-Muller, B. Gestational methyl donor deficiency alters key proteins involved in neurosteroidogenesis in the olfactory bulbs of newborn female rats and is associated with impaired olfactory performance. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1021–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- El Hajj Chehadeh, S.; Dreumont, N.; Willekens, J.; Canabady-Rochelle, L.; Jeannesson, E.; Alberto, J.-M.; Daval, J.-L.; Guéant, J.-L.; Leininger-Muller, B. Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *Am. J. Physiol. Metab.* **2014**, *307*, E1009–E1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Willekens, J.; Hergalant, S.; Pourié, G.; Marin, F.; Alberto, J.-M.; Georges, L.; Paoli, J.; Nemos, C.; Daval, J.-L.; Guéant, J.-L.; et al. Wnt Signaling Pathways Are Dysregulated in Rat Female Cerebellum Following Early Methyl Donor Deficiency. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 892–906. [[CrossRef](#)]
- Kramer, M.S.; Kakuma, R. Energy and protein intake in pregnancy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*; The Cochrane Collaboration, Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2003; p. CD000032.
- Koletzko, B.; Cetin, I.; Thomas Brenna, J.; for the Perinatal Lipid Intake Working Group. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, 873–877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Koletzko, B.; Bauer, C.P.; Bung, P.; Cremer, M.; Flothkötter, M.; Hellmers, C.; Kersting, M.; Krawinkel, M.; Przyrembel, H.; Rasenack, R.; et al. German National Consensus Recommendations on Nutrition and Lifestyle in Pregnancy by the ‘Healthy Start–Young Family Network’. *Ann. Nutr. Metab.* **2013**, *63*, 311–322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Trumbo, P.; Schlicker, S.; Yates, A.A.; Poos, M. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *J. Am. Diet. Assoc.* **2002**, *102*, 1621–1630. [[CrossRef](#)]
- Soubry, A. POHaD: Why we should study future fathers. *Environ. Epigenet.* **2018**, *4*, dvy007. [[CrossRef](#)]
- Tirpák, F.; Greifová, H.; Lukáč, N.; Stawarz, R.; Massányi, P. Exogenous Factors Affecting the Functional Integrity of Male Reproduction. *Life* **2021**, *11*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G.D.; Dyer, S.; Racowsky, C.; de Mouzon, J.; Sokol, R.; Rienzi, L.; Sunde, A.; Schmidt, L.; Cooke, I.D.; et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Fertil. Steril.* **2017**, *108*, 393–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Marcho, C.; Oluwayiose, O.A.; Pilsner, J.R. The preconception environment and sperm epigenetics. *Andrology* **2020**, *8*, 924–942. [[CrossRef](#)]
17. Nan, Y.; Yi, S.-J.; Zhu, H.-L.; Xiong, Y.-W.; Shi, X.-T.; Cao, X.-L.; Zhang, C.; Gao, L.; Zhao, L.-L.; Zhang, J.; et al. Paternal cadmium exposure increases the susceptibility to diet-induced testicular injury and spermatogenic disorders in mouse offspring. *Chemosphere* **2020**, *246*, 125776. [[CrossRef](#)]
18. Messerlian, C.; Bellinger, D.; Mínguez-Alarcón, L.; Romano, M.E.; Ford, J.B.; Williams, P.L.; Calafat, A.M.; Hauser, R.; Braun, J.M. Paternal and maternal preconception urinary phthalate metabolite concentrations and child behavior. *Environ. Res.* **2017**, *158*, 720–728. [[CrossRef](#)]
19. Barakat, R.; Lin, P.-C.; Park, C.J.; Zeineldin, M.; Zhou, S.; Rattan, S.; Brehm, E.; Flaws, J.A.; Ko, C.J. Germline-dependent transmission of male reproductive traits induced by an endocrine disruptor, di-2-ethylhexyl phthalate, in future generations. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5705–5718. [[CrossRef](#)]
20. Silva, P.V.; Dos Santos Borges, C.; Rosa, J.D.L.; Pacheco, T.L.; Figueiredo, T.M.; Leite, G.A.A.; Guerra, M.T.; Anselmo-Franci, J.A.; Klinefelter, G.R.; Kempinas, W.D.G. Effects of isolated or combined exposure to sibutramine and rosuvastatin on reproductive parameters of adult male rats. *J. Appl. Toxicol.* **2020**, *40*, 947–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. McPherson, N.O.; Fullston, T.; Kang, W.X.; Sandeman, L.Y.; Corbett, M.A.; Owens, J.A.; Lane, M. Paternal under-nutrition programs metabolic syndrome in offspring which can be reversed by antioxidant/vitamin food fortification in fathers. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sansone, A.; Di Dato, C.; De Angelis, C.; Menafra, D.; Pozza, C.; Pivonello, R.; Isidori, A.; Gianfrilli, D. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16*, 3. [[CrossRef](#)]
23. Day, J.; Savani, S.; Krempley, B.D.; Nguyen, M.; Kitlinska, J.B. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: Through epigenetics to phenotype. *Am. J. Stem Cells* **2016**, *5*, 11–18.
24. Carone, B.R.; Fauquier, L.; Habib, N.; Shea, J.M.; Hart, C.E.; Li, R.; Bock, C.; Li, C.; Gu, H.; Zamore, P.D.; et al. Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell* **2010**, *143*, 1084–1096. [[CrossRef](#)]
25. Sharma, U.; Conine, C.C.; Shea, J.M.; Boskovic, A.; Derr, A.G.; Bing, X.Y.; Belleanne, C.; Kucukural, A.; Serra, R.W.; Sun, F.; et al. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* **2016**, *351*, 391–396. [[CrossRef](#)]
26. Sadler-Riggleman, I.; Klukovich, R.; Nilsson, E.; Beck, D.; Xie, Y.; Yan, W.; Skinner, M.K. Epigenetic transgenerational inheritance of testis pathology and Sertoli cell epimutations: Generational origins of male infertility. *Environ. Epigenet.* **2019**, *5*, dvz013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dupont, C.; Kappeler, L.; Saget, S.; Grandjean, V.; Lévy, R. Role of miRNA in the Transmission of Metabolic Diseases Associated With Paternal Diet-Induced Obesity. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Klastrop, L.K.; Bak, S.T.; Nielsen, A.L. The influence of paternal diet on snRNA-mediated epigenetic inheritance. *Mol. Genet. Genom.* **2019**, *294*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sharma, U. Paternal Contributions to Offspring Health: Role of Sperm Small RNAs in Intergenerational Transmission of Epigenetic Information. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Painter, R.; Osmond, C.; Gluckman, P.; Hanson, M.; Phillips, D.; Roseboom, T. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2008**, *115*, 1243–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Veenendaal, M.; Painter, R.; De Rooij, S.R.; Bossuyt, P.; van der Post, J.; Gluckman, P.; Hanson, M.; Roseboom, T. Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944–45 Dutch famine. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2013**, *120*, 548–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kaati, G.; Bygren, L.; Edvinsson, S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *Eur. J. Hum. Genet.* **2002**, *10*, 682–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. The ALSPAC Study Team; Pembrey, M.; Bygren, L.O.; Kaati, G.; Edvinsson, S.; Northstone, K.; Sjöström, M.; Golding, J. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.* **2005**, *14*, 159–166. [[CrossRef](#)]
34. Vågerö, D.; Pinger, P.R.; Aronsson, V.; Berg, G.J.V.D. Paternal grandfather's access to food predicts all-cause and cancer mortality in grandsons. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bygren, L.O.; Kaati, G.; Edvinsson, S. Longevity Determined by Paternal Ancestors' Nutrition during Their Slow Growth Period. *Acta Biotheor.* **2001**, *49*, 53–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. McCoy, C.R.; Jackson, N.L.; Brewer, R.L.; Moughnyeh, M.M.; Smith, D.L.; Clinton, S.M. A paternal methyl donor depleted diet leads to increased anxiety- and depression-like behavior in adult rat offspring. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20180730. [[CrossRef](#)]
37. Watkins, A.J.; Sinclair, K.D. Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2014**, *306*, H1444–H1452. [[CrossRef](#)]
38. Watkins, A.J.; Dias, I.; Tsuru, H.; Allen, D.; Emes, R.D.; Moreton, J.; Wilson, R.; Ingram, R.J.M.; Sinclair, K.D. Paternal diet programs offspring health through sperm- and seminal plasma-specific pathways in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 10064–10069. [[CrossRef](#)]

39. de Castro Barbosa, T.; Ingerslev, L.R.; Alm, P.S.; Versteyhe, S.; Massart, J.; Rasmussen, M.; Donkin, I.; Sjögren, R.; Mudry, J.M.; Vetterli, L.; et al. High-Fat Diet Reprograms the Epigenome of Rat Spermatozoa and Transgenerationally Affects Metabolism of the Offspring. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 184–197. [[CrossRef](#)]
40. Grandjean, V.; Fourré, S.; De Abreu, D.A.F.; Derieppe, M.-A.; Remy, J.-J.; Rassoulzadegan, M. RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci. Rep.* **2016**, *5*, 18193. [[CrossRef](#)]
41. Ghanayem, B.I.; Bai, R.; Kissling, G.E.; Travlos, G.; Hoffer, U. Diet-Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity. *Biol. Reprod.* **2010**, *82*, 96–104. [[CrossRef](#)]
42. Binder, N.K.; Mitchell, M.; Gardner, D.K. Parental diet-induced obesity leads to retarded early mouse embryo development and altered carbohydrate utilisation by the blastocyst. *Reprod. Fertil. Dev.* **2012**, *24*, 804–812. [[CrossRef](#)]
43. Lin, W.-T.; Huang, H.-L.; Huang, M.-C.; Chan, T.-F.; Ciou, S.-Y.; Lee, C.-Y.; Chiu, Y.-W.; Duh, T.-H.; Lin, P.-L.; Wang, T.-N.; et al. Effects on uric acid, body mass index and blood pressure in adolescents of consuming beverages sweetened with high-fructose corn syrup. *Int. J. Obes. (Lond.)* **2013**, *37*, 532–539. [[CrossRef](#)]
44. Wu, S.; Guo, W.; Yan, T.; Zhou, J.; Li, Y.; Zhu, Y.; Duan, Y.; Yang, X. Spermatozoal mRNAs expression implicated in embryonic development were influenced by dietary folate supplementation of breeder roosters by altering spermatozoal piRNA expression profiles. *Theriogenology* **2019**, *138*, 102–110. [[CrossRef](#)]
45. Ng, S.-F.; Lin, R.C.Y.; Laybutt, D.R.; Barres, R.; Owens, J.A.; Morris, M.J. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **2010**, *467*, 963–966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Carapeto, P.V.; Ornellas, F.; Mandarim-De-Lacerda, C.A.; Aguila, M.B. Liver metabolism in adult male mice offspring: Consequences of a maternal, paternal or both maternal and paternal high-fructose diet. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2018**, *9*, 450–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ornellas, F.; Carapeto, P.V.; Aguila, M.B.; Mandarim-De-Lacerda, C.A. Sex-linked changes and high cardiovascular risk markers in the mature progeny of father, mother, or both father and mother consuming a high-fructose diet. *Nutrition* **2020**, *71*, 110612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Binder, N.K.; Hannan, N.J.; Gardner, D.K. Paternal Diet-Induced Obesity Retards Early Mouse Embryo Development, Mitochondrial Activity and Pregnancy Health. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lambrot, R.; Xu, C.; Saintphar, S.; Chountalos, G.; Cohen, T.; Paquet, M.; Suderman, M.; Hallett, M.; Kimmins, S. Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Watkins, A.J.; Sirovica, S.; Stokes, B.; Isaacs, M.; Addison, O.; Martin, R. Paternal low protein diet programs preimplantation embryo gene expression, fetal growth and skeletal development in mice. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1371–1381. [[CrossRef](#)]
51. Ly, L.; Chan, D.; Aarabi, M.; Landry, M.; Behan, N.A.; Macfarlane, A.J.; Trasler, J. Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2017**, *23*, 461–477. [[CrossRef](#)]
52. Martin-Calvo, N.; Mínguez-Alarcón, L.; Gaskins, A.J.; Nassan, F.L.; Williams, P.L.; Souter, I.; Hauser, R.; Chavarro, J.E. Paternal preconception folate intake in relation to gestational age at delivery and birthweight of newborns conceived through assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* **2019**, *39*, 835–843. [[CrossRef](#)]
53. Kim, H.W.; Choi, Y.J.; Kim, K.N.; Tamura, T.; Chang, N. Effect of paternal folate deficiency on placental folate content and folate receptor  $\alpha$  expression in rats. *Nutr. Res. Pract.* **2011**, *5*, 112–116. [[CrossRef](#)]
54. Da Cruz, R.S.; Carney, E.J.; Clarke, J.; Cao, H.; Cruz, M.I.; Benitez, C.; Jin, L.; Fu, Y.; Cheng, Z.; Wang, Y.; et al. Paternal malnutrition programs breast cancer risk and tumor metabolism in offspring. *Breast Cancer Res.* **2018**, *20*, 99. [[CrossRef](#)]
55. Bjornstad, P.; Laffel, L.; Lynch, J.; El Ghormli, L.; Weinstock, R.S.; Tollefsen, S.E.; Nadeau, K.J. Elevated Serum Uric Acid Is Associated With Greater Risk for Hypertension and Diabetic Kidney Diseases in Obese Adolescents with Type 2 Diabetes: An Observational Analysis From the Treatment Options for Type 2 Diabetes in Adolescents and Youth (TODAY) Study. *Diabetes Care* **2019**, *42*, 1120–1128. [[CrossRef](#)]
56. Yuan, H.-F.; Zhao, K.; Zang, Y.; Liu, C.-Y.; Hu, Z.-Y.; Wei, J.-J.; Zhou, T.; Li, Y.; Zhang, H.-P. Effect of folate deficiency on promoter methylation and gene expression of *Esr1*, *Cav1*, and *Elavl1*, and its influence on spermatogenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 24130–24141. [[CrossRef](#)]
57. Swayne, B.G.; Kawata, A.; Behan, N.A.; Williams, A.; Wade, M.G.; MacFarlane, A.J.; Yauk, C.L. Investigating the effects of dietary folic acid on sperm count, DNA damage and mutation in Balb/c mice. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2012**, *737*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Tomizawa, H.; Matsuzawa, D.; Ishii, D.; Matsuda, S.; Kawai, K.; Mashimo, Y.; Sutoh, C.; Shimizu, E. Methyl-Donor Deficiency in Adolescence Affects Memory and Epigenetic Status in the Mouse Hippocampus: Methyl-Donor Deficiency in Adolescence. *Genes Brain Behav.* **2015**, *14*, 301–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wu, H.; Hauser, R.; Krawetz, S.A.; Pilsner, J.R. Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. *Curr. Environ. Health Rep.* **2015**, *2*, 356–366. [[CrossRef](#)]
60. Rando, O.J. Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. *Cell* **2012**, *151*, 702–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Nilsson, E.E.; Sadler-Riggelman, I.; Skinner, M.K. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ. Epigenet.* **2018**, *4*, dvy016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

62. Guéant, J.-L.; Namour, F.; Guéant-Rodriguez, R.-M.; Daval, J.-L. Folate and fetal programming: A play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 279–289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Yoshida, K.; Maekawa, T.; Ly, N.H.; Fujita, S.-I.; Muratani, M.; Ando, M.; Katou, Y.; Araki, H.; Miura, F.; Shirahige, K.; et al. ATF7-Dependent Epigenetic Changes Are Required for the Intergenerational Effect of a Paternal Low-Protein Diet. *Mol. Cell* **2020**, *78*, 445–458.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Fullston, T.; Teague, E.M.C.O.; Palmer, N.O.; DeBlasio, M.J.; Mitchell, M.; Corbett, M.; Print, C.G.; Owens, J.A.; Lane, M. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J.* **2013**, *27*, 4226–4243. [[CrossRef](#)]
65. Fullston, T.; Ohlsson-Teague, E.M.C.; Print, C.G.; Sandeman, L.Y.; Lane, M. Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring's Sperm. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166076. [[CrossRef](#)]
66. Claycombe-Larson, K.G.; Bundy, A.N.; Roemmich, J.N. Paternal high-fat diet and exercise regulate sperm miRNA and histone methylation to modify placental inflammation, nutrient transporter mRNA expression and fetal weight in a sex-dependent manner. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *81*, 108373. [[CrossRef](#)]
67. Teltumbade, M.; Bhalla, A.; Sharma, A. Paternal inheritance of diet induced metabolic traits correlates with germline regulation of diet induced coding gene expression. *Genomics* **2020**, *112*, 567–573. [[CrossRef](#)]
68. Wu, S.; Guo, W.; Li, X.; Liu, Y.; Li, Y.; Lei, X.; Yao, J.; Yang, X. Paternal chronic folate supplementation induced the transgenerational inheritance of acquired developmental and metabolic changes in chickens. *Proc. R. Soc. B* **2019**, *286*, 20191653. [[CrossRef](#)]
69. Nätt, D.; Kugelberg, U.; Casas, E.; Nedstrand, E.; Zalavary, S.; Henriksson, P.; Nijm, C.; Jäderquist, J.; Sandborg, J.; Flink, E.; et al. Human sperm displays rapid responses to diet. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000559. [[CrossRef](#)]
70. Shea, J.M.; Serra, R.W.; Carone, B.R.; Shulha, H.P.; Kucukural, A.; Ziller, M.J.; Vallaster, M.P.; Gu, H.; Tapper, A.R.; Gardner, P.D.; et al. Genetic and Epigenetic Variation, but Not Diet, Shape the Sperm Methylome. *Dev. Cell* **2015**, *35*, 750–758. [[CrossRef](#)]
71. Radford, E.J.; Ito, M.; Shi, H.; Corish, J.A.; Yamazawa, K.; Isganaitis, E.; Seisenberger, S.; Hore, T.A.; Reik, W.; Erkek, S.; et al. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science* **2014**, *345*, 1255903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Holland, M.L.; Lowe, R.; Caton, P.W.; Gemma, C.; Carbajosa, G.; Danson, A.F.; Carpenter, A.A.M.; Loch, E.; Ozanne, S.E.; Rakyan, V.K. Early-life nutrition modulates the epigenetic state of specific rDNA genetic variants in mice. *Science* **2016**, *353*, 495–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sharma, U.; Rando, O.J. Metabolic Inputs into the Epigenome. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 544–558. [[CrossRef](#)]
74. Chen, Q.; Yan, M.; Cao, Z.; Li, X.; Zhang, Y.; Shi, J.; Feng, G.-H.; Peng, H.; Zhang, X.; Qian, J.; et al. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* **2016**, *351*, 397–400. [[CrossRef](#)]
75. Gatewood, J.M.; Cook, G.R.; Balhorn, R.; Bradbury, E.M.; Schmid, C.W.; Sugimura, T. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* **1987**, *236*, 962–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Bagherzadeh Khodashahri, S.; Siadat, S.D.; Rahbar, M.; Abdollahpour-Alitappeh, M.; Vaziri, F.; Rahna-maye-Farzami, M.; Mohammadzadeh, M.; Davari, M.; Fateh, A.; Masoumi, M. Genotyping of Haemophilus Influenzae Type b Strains and Their Incidence in the Clinical Samples Isolated from Iranian Patients. *Iran. J. Microbiol.* **2015**, *7*, 136–143. [[PubMed](#)]
77. Terashima, M.; Barbour, S.; Ren, J.; Yu, W.; Han, Y.; Muegge, K. Effect of high fat diet on paternal sperm histone distribution and male offspring liver gene expression. *Epigenetics* **2015**, *10*, 861–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Öst, A.; Lempradl, A.; Casas, E.; Weigert, M.; Tiko, T.; Deniz, M.; Pantano, L.; Boenisch, U.; Itskov, P.M.; Stoeckius, M.; et al. Paternal Diet Defines Offspring Chromatin State and Intergenerational Obesity. *Cell* **2014**, *159*, 1352–1364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Siklenka, K.; Erkek, S.; Godmann, M.; Lambrot, R.; McGraw, S.; Lafleur, C.; Cohen, T.; Xia, J.; Suderman, M.; Hallett, M.; et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science* **2015**, *350*, aab2006. [[CrossRef](#)]
80. Chambers, T.J.G.; Morgan, M.D.; Heger, A.H.; Sharpe, R.M.; Drake, A.J. High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31857. [[CrossRef](#)]
81. Fullston, T.; Palmer, N.O.; Owens, J.A.; Mitchell, M.; Bakos, H.W.; Lane, M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 1391–1400. [[CrossRef](#)]
82. Forges, T.; Monnier-Barbarino, P.; Alberto, J.M.; Guéant-Rodriguez, R.M.; Daval, J.L.; Guéant, J.L. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum. Reprod. Updat.* **2007**, *13*, 225–238. [[CrossRef](#)]
83. Kim, H.W.; Kim, K.N.; Choi, Y.J.; Chang, N. Effects of paternal folate deficiency on the expression of insulin-like growth factor-2 and global DNA methylation in the fetal brain. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 671–676. [[CrossRef](#)]
84. Mejos, K.K.; Kim, H.W.; Lim, E.M.; Chang, N. Effects of parental folate deficiency on the folate content, global DNA methylation, and expressions of FR $\alpha$ , IGF-2 and IGF-1R in the postnatal rat liver. *Nutr. Res. Pract.* **2013**, *7*, 281–286. [[CrossRef](#)]
85. Ryan, D.P.; Henzel, K.S.; Pearson, B.L.; Siwek, M.E.; Papazoglou, A.; Guo, L.; Paesler, K.; Yu, M.; Müller, R.; Xie, K.; et al. A paternal methyl donor-rich diet altered cognitive and neural functions in offspring mice. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 1345–1355. [[CrossRef](#)]
86. Roseboom, T.J.; Painter, R.C.; van Abeelen, A.F.M.; Veenendaal, M.V.E.; de Rooij, S.R. Hungry in the womb: What are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* **2011**, *70*, 141–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Pigeyre, M.; Yazdi, F.T.; Kaur, Y.; Meyre, D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 943–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

88. Reddon, H.; Guéant, J.-L.; Meyre, D. The importance of gene–environment interactions in human obesity. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 1571–1597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Morgan, H.L.; Ampong, I.; Eid, N.; Rouillon, C.; Griffiths, H.R.; Watkins, A.J. Low protein diet and methyl-donor supplements modify testicular physiology in mice. *Reproduction* **2020**, *159*, 627–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Ly, N.H.; Maekawa, T.; Yoshida, K.; Liu, Y.; Muratani, M.; Ishii, S. RNA-Sequencing Analysis of Paternal Low-Protein Diet-Induced Gene Expression Change in Mouse Offspring Adipocytes. *G3 Genes | Genomes | Genet.* **2019**, *9*, 2161–2170. [[CrossRef](#)]
91. Anderson, L.M.; Riffle, L.; Wilson, R.; Travlos, G.S.; Lubomirski, M.S.; Alvord, W.G. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition* **2006**, *22*, 327–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Miersch, C.; Döring, F. Paternal dietary restriction affects progeny fat content in *Caenorhabditis elegans*. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 644–648. [[CrossRef](#)]
93. Corley, B.T.; Carroll, R.W.; Hall, R.M.; Weatherall, M.; Parry-Strong, A.; Krebs, J.D. Intermittent fasting in Type 2 diabetes mellitus and the risk of hypoglycaemia: A randomized controlled trial. *Diabet. Med.* **2018**, *35*, 588–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Baumeier, C.; Kaiser, D.; Heeren, J.; Scheja, L.; John, C.; Weise, C.; Eravci, M.; Lagerpusch, M.; Schulze, G.; Joost, H.-G.; et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 566–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. de Souza Marinho, T.D.; Ornellas, F.; Barbosa-Da-Silva, S.; Mandarin-De-Lacerda, C.A.; Aguila, M.B. Beneficial effects of intermittent fasting on steatosis and inflammation of the liver in mice fed a high-fat or a high-fructose diet. *Nutrition* **2019**, *65*, 103–112. [[CrossRef](#)]
96. Mattson, M.P.; Longo, V.D.; Harvie, M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *39*, 46–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Mashoodh, R.; Habrylo, I.B.; Gudsruk, K.M.; Pelle, G.; Champagne, F.A. Maternal modulation of paternal effects on offspring development. *Proc. Biol. Sci.* **2018**, *285*, 20180118. [[CrossRef](#)]
98. Govic, A.; Penman, J.; Tammer, A.H.; Paolini, A.G. Paternal calorie restriction prior to conception alters anxiety-like behavior of the adult rat progeny. *Psychoneuroendocrinology* **2016**, *64*, 1–11. [[CrossRef](#)]
99. Power, C. Combination of low birth weight and high adult body mass index: At what age is it established and what are its determinants? *J. Epidemiol. Community Health* **2003**, *57*, 969–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Kasturi, S.S.; Tannir, J.; Brannigan, R.E. The Metabolic Syndrome and Male Infertility. *J. Androl.* **2008**, *29*, 251–259. [[CrossRef](#)]
101. Portha, B.; Grandjean, V.; Movassat, J. Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. *Nutrients* **2019**, *11*, 233. [[CrossRef](#)]
102. Chowdhury, S.; LeComte, V.; Erlich, J.; Maloney, C.; Morris, M. Paternal High Fat Diet in Rats Leads to Renal Accumulation of Lipid and Tubular Changes in Adult Offspring. *Nutrients* **2016**, *8*, 521. [[CrossRef](#)]
103. Masuyama, H.; Mitsui, T.; Eguchi, T.; Tamada, S.; Hiramatsu, Y. The effects of paternal high-fat diet exposure on offspring metabolism with epigenetic changes in the mouse adiponectin and leptin gene promoters. *Am. J. Physiol. Metab.* **2016**, *311*, E236–E245. [[CrossRef](#)]
104. Ng, S.; Lin, R.C.Y.; Maloney, C.A.; Youngson, N.A.; Owens, J.A.; Morris, M.J. Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *FASEB J.* **2014**, *28*, 1830–1841. [[CrossRef](#)]
105. Zhou, Y.; Zhu, H.; Wu, H.; Jin, L.; Chen, B.; Pang, H.; Ming, Z.; Cheng, Y.; Zhou, C.; Guo, M.; et al. Diet-Induced Paternal Obesity Impairs Cognitive Function in Offspring by Mediating Epigenetic Modifications in Spermatozoa. *Obesity* **2018**, *26*, 1749–1757. [[CrossRef](#)]
106. Choo, V.L.; Viguioliouk, E.; Blanco Mejia, S.; Cozma, A.I.; Khan, T.A.; Ha, V.; Wolever, T.M.S.; A Leiter, L.; Vuksan, V.; Kendall, C.W.C.; et al. Food sources of fructose-containing sugars and glycaemic control: Systematic review and meta-analysis of controlled intervention studies. *BMJ* **2018**, *363*, k4644. [[CrossRef](#)]
107. Ornellas, F.; Carapeto, P.V.; Mandarin-De-Lacerda, C.A.; Aguila, M.B. Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: Review of experimental and human studies. *J. Pediatr.* **2017**, *93*, 551–559. [[CrossRef](#)]
108. Emborski, C.; Mikheyev, A.S. Ancestral diet transgenerationally influences offspring in a parent-of-origin and sex-specific manner. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2019**, *374*, 20180181. [[CrossRef](#)]
109. Oshio, L.T.; Andreatzi, A.E.; Ferraz Lopes, J.; Pereira de Sá, J.; Bolotari, M.; Moreira Gonçalves Costa, V.; de Oliveira Guerra, M.; Peters, V.M. A paternal hypercaloric diet affects the metabolism and fertility of F1 and F2 Wistar rat generations. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2020**, *11*, 653–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Rando, O.J.; Simmons, R.A. I'm Eating for Two: Parental Dietary Effects on Offspring Metabolism. *Cell* **2015**, *161*, 93–105. [[CrossRef](#)]
111. Mima, M.; Greenwald, D.; Ohlander, S. Environmental Toxins and Male Fertility. *Curr. Urol. Rep.* **2018**, *19*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Schellong, K.; Melchior, K.; Ziska, T.; Rancourt, R.C.; Henrich, W.; Plagemann, A. Maternal but Not Paternal High-Fat Diet (HFD) Exposure at Conception Predisposes for 'Diabesity' in Offspring Generations. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 4229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Kong, A.; Frigge, M.L.; Masson, G.; Besenbacher, S.; Sulem, P.; Magnusson, G.; Gudjonsson, S.A.; Sigurdsson, A.; Jonasdottir, A.; Jonasdottir, A.; et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* **2012**, *488*, 471–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

114. Jónsson, H.; Sulem, P.; Kehr, B.; Kristmundsdóttir, S.; Zink, F.; Hjartarson, E.; Hardarson, M.T.; Hjorleifsson, K.E.; Eggertsson, H.P.; Gudjonsson, S.A.; et al. Parental influence on human germline de novo mutations in 1548 trios from Iceland. *Nature* **2017**, *549*, 519–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Jónsson, H.; Sulem, P.; Arnadóttir, G.A.; Pálsson, G.; Eggertsson, H.P.; Kristmundsdóttir, S.; Zink, F.; Kehr, B.; Hjorleifsson, K.E.; Jensson, B.Ö.; et al. Multiple transmissions of de novo mutations in families. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 1674–1680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Annexe n°2 : Autres publications

Willekens J, Mosca P, Burt-Oberecken N, Laugeais E, Kaoma T, Bernardin F, Vallar L, **Dimofski P**, Renaud M, Lambert L, Leheup B, Guéant JL, Leininger-Muller B, Dreumont N. Cross-Talk between miRNAs from the Dlk1-Dio3 Locus and Histone Methylation to Protect Male Cerebellum from Methyl Donor Deficiency. *Mol Nutr Food Res.* 2023 Sep 6:e2300040

# Cross-Talk between miRNAs from the *Dlk1-Dio3* Locus and Histone Methylation to Protect Male Cerebellum from Methyl Donor Deficiency

Jeremy Willekens, Pauline Mosca, Nathan Burt-Oberecken, Edgar Laugeais, Tony Kaoma, François Bernardin, Laurent Vallar, Pauline Dimofski, Mathilde Renaud, Laetitia Lambert, Bruno Leheup, Jean-Louis Guéant, Brigitte Leininger-Muller, and Natacha Dreumont\*

**Scope:** Disruption of the one carbon metabolism during development, i.e., following a gestational vitamin B9 and B12 deficiencies, is involved in birth defects and brain development delay. Using a rat nutritional model, consisting of pups born to dams fed a vitamin B9 and B12 deficient diet (MDD), the study previously reports molecular and cellular alterations in the brain, in a sex dependent manner, with females being more affected than males. The study hypothesizes that epigenetic modifications could participate in the sex differences is observed.

**Methods and results:** The study investigates lysine methylation of histones and expression of microRNAs in the cerebellum of MDD male and female pups. The study reports a differential regulation of H3K36Me2 and H4K20Me3 between males and females, in response to MDD. Moreover, distinct regulation of *Kmt5b* and *Kdm2a* expression by miR-134-5p and miR-369-5p from the *Dlk1-Dio3* locus, contributes to the maintenance of expression of genes involved in synaptic plasticity.

**Conclusion:** These results could explain the neuroprotection to MDD that male pups display. The work will contribute to the understanding of the consequences of vitamin starvation on brain development, as well as how the epigenome is affected by one carbon metabolism disruption.

## 1. Introduction

In addition to DNA methylation, much of the epigenetic information is stored in the covalent modifications along the chromatin. For example, methylation of lysine residues of H3 (K4, K36, and K79) is associated with active transcription, whereas methylation of K9, K27 on H3, or K20 on H4, indicates repressed transcription with inactive chromatin.<sup>[1]</sup> Moreover, these epigenetic modifications can reflect variations in the extracellular environment through changes in gene expression. Modifications in the epigenome are physiologically crucial for brain development and can fluctuate depending on the developmental stage, the considered brain structure, or the sex. Sexual differentiation of the brain is mostly mediated by gonadal steroid hormones, with indirect effects involving epigenetic modifications. Transient production of steroid hormones like estradiol induces chromatin remodeling in the developing brain, resulting in

J. Willekens, P. Mosca, N. Burt-Oberecken, E. Laugeais, P. Dimofski, M. Renaud, L. Lambert, B. Leheup, J.-L. Guéant, B. Leininger-Muller, N. Dreumont  
Université de Lorraine, Inserm  
NGERE  
Nancy F-54000, France  
E-mail: natacha.dreumont@univ-lorraine.fr

J. Willekens  
CINJ  
Rutgers Cancer Institute of New Jersey  
195 Little Albany St, New Brunswick NJ 08901, USA  
T. Kaoma, L. Vallar  
Luxembourg Institute of Health  
Bioinformatics Platform, 1 A-B  
Luxembourg L-1445, Luxembourg  
F. Bernardin  
Department of Cancer Research  
Luxembourg Institute of Health  
Luxembourg L-1210, Luxembourg  
M. Renaud, L. Lambert, B. Leheup  
CHRU Nancy, Hôpital d'enfants  
Service de Génétique Clinique  
Nancy F-54000, France

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300040>

© 2022 The Authors. Molecular Nutrition & Food Research published by Wiley-VCH GmbH © 2023 Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

DOI: 10.1002/mnfr.202300040

lasting changes in gene expression and establishment of the neuronal circuits.<sup>[2]</sup> Analysis of gene expression in whole-brain from adult mice showed that almost 15% (655 out of 4508 genes, fold change greater than 1) of the measured genes displayed a male- or a female-biased expression.<sup>[3]</sup> In addition, the active mark H3K4me3 is enriched in female mice in specific parts of the brain, affecting gene expression associated with the synaptic function.<sup>[4]</sup> Therefore, epigenetic modifications contribute to sex-biased gene expression in the brain. Similar findings were described in humans. During infancy, the development of the prefrontal cortex is accompanied by modifications of expression of 8061 transcripts, with gender accounting for ≈8% of these changes.<sup>[5]</sup> These differences, furthermore, have been observed at the molecular scale. They could partially explain why males and females show different prevalence and symptomatology to several major neuropsychiatric and neurological pathologies.<sup>[6,7]</sup> For instance, women are more susceptible to stress-related disorders, whereas men are more prone to early-life social/cognitive behavior-related disorders.<sup>[8]</sup> Similarly, the risk of Alzheimer's disease is higher in women than in men,<sup>[9]</sup> and in contrast, males are more likely to develop Parkinson's disease.<sup>[10]</sup>

The metabolic state of cells is also integrated into the regulation of epigenetic mechanisms and can impact gene expression. The connection between one-carbon (1C) metabolism and neurodegenerative diseases has been well established.<sup>[11]</sup> While studies on transmethylation and 1C metabolism have been conducted so far mostly in the context of DNA methylation, other epigenetic modifications, such as miRNAs or protein histone modifications, are also affected.<sup>[12]</sup> Nevertheless, the 1C metabolism relies on a sufficient supply of vitamin B9 (folates) and B12 (cobalamin) to effectively remethylate homocysteine into methionine, which is the precursor of S-adenosylmethionine (SAM), the universal methyl donor involved in almost all of the methylation reactions in the cell. In the case of either folate or cobalamin deficiencies, neurotoxicity is caused by the tissular accumulation of homocysteine in the brain and/or dysregulations of epigenetic and epigenomic mechanisms, leading to cerebral dysfunctions, as well as development abnormalities.<sup>[13]</sup> Furthermore, the female brain seems more sensitive to the methyl donor deficiency (MDD) caused by folate or cobalamin deficiencies. For example, homocysteine levels are higher in the hippocampus of older women.<sup>[14]</sup> In rodent models, a gestational folic acid supplementation alters the expression of imprinted genes and transcription factors involved in brain development in a sexually dimorphic manner.<sup>[15]</sup> We previously reported molecular, cellular, and structural alterations in the cerebellum in a rat nutritional model, consisting of pups born to dams fed either control or B9 and B12 deficient diet (the MDD diet). Female pups showed a higher sensitivity to the MDD diet than males, especially regarding neurobehavioral disturbances, as well as abnormal gene expression and activation signaling pathways.<sup>[16–18]</sup> For instance, neurosteroidogenesis, Wnt signaling pathways, and *Egr1/Erα* pathway were dysregulated in female but not in male rats.<sup>[16–18]</sup> However, these sexually dimorphic effects of MDD on brain function remain partly uncharacterized at the molecular level. MDD leads to the dysregulation of SAM synthesis, which is essential for all methylation reactions, particularly those involved in epigenetic modifications. Indeed, a transcriptomic microarray experiment performed on the cerebellum of

21 days old female rats (P21) born to dams fed either a control or an MDD diet<sup>[19]</sup> revealed dysregulations of genes involved in histone methylation (Histone Demethylase Activity, GO ID 32452, FDR 7.00E-04), and especially lysine methylation (Histone Lysine Demethylation, GO ID 70076, FDR 0.0019) in MDD animals compared to controls, suggesting that histone modifications could be affected by MDD in female pups. Therefore, we hypothesize that epigenetic modifications could participate in the sex differences that we observed. In this study, we investigated lysine methylation of histone proteins in the cerebellum of male and female pups born to dams fed either an MDD or a control diet.

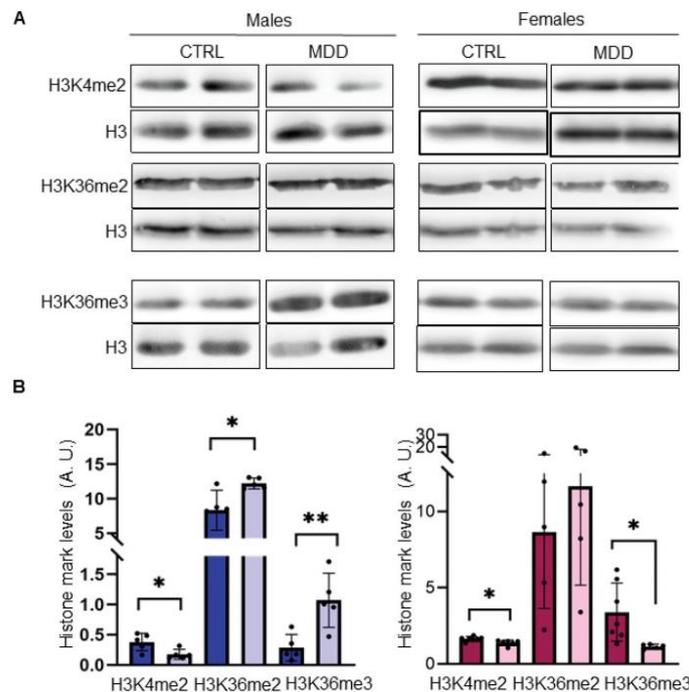
We report here a different regulation of histone methylation in the male and female cerebellum in response to MDD. Notably, differential regulation of lysine methyltransferase 5b (*Kmt5b*) and lysine demethylase 2a (*Kdm2a*) expression by miRNAs from the locus delineated by the delta like homolog 1 (*Dlk1*) and the type III iodothyronine deionidase (*Dio3*) genes contributes to the maintenance of expression of genes involved in synaptic plasticity such as *Gria2* (glutamate ionotropic receptor delta type subunit 2) or *Gria3* (glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3), as well as the protective mechanism observed in males.

## 2. Results

### 2.1. Histone Methylation in the Cerebellum Is Affected by MDD

To investigate whether histone methylation could be involved in the alterations of gene expression previously observed in the cerebellum, we tested the expression level of several methylation marks of histone proteins in control and MDD pup cerebellum by immunoblot. We observed a decreased level of H3K4me2 in MDD pups compared to controls, being more pronounced in the males than the females (50% reduction vs 25%; **Figure 1**). The methylation of H3 on K36 (H3K36me2 and H3K36me3) was increased in MDD males but H3K36me3 levels were decreased in MDD females (**Figure 1**). In contrast, methylation of the repressive marks H4K20 or H3K9 remained unaffected in female pups born to dams fed the MDD diet (**Figure 2**, right panel). In males, methylation of H3K9 (H3K9me3) was increased following MDD, whereas we observed a decreased level of H4K20me3 (**Figure 2** left panel).

These dysregulations of histone marks, which were much more notable in males, could be due to an altered expression of the corresponding writers and erasers of histone methylation. Therefore, we next measured by RT-qPCR the gene expression levels of several methylases and demethylases acting on the marks previously investigated (**Figures 3A** and **S1**, Supporting Information). Expression was relatively stable in females following MDD, except for an increase of *Kmt3b* (**Figure 3B**) and *Kdm2b* (**Figure 3C**), both enzymes regulating mono- and dimethylation of H3K36 (**Figure 3A**). However, the level of H3K36me2 remains unaffected by MDD in females (**Figure 1**). In contrast, in males, the expression of most of the enzymes we tested was dysregulated following MDD, with a decrease in expression. Only *Kmt1d* and *Kmt3c* (also called *Smyd2*) expression was increased in males born to dams fed the MDD diet (**Figure 3B**).



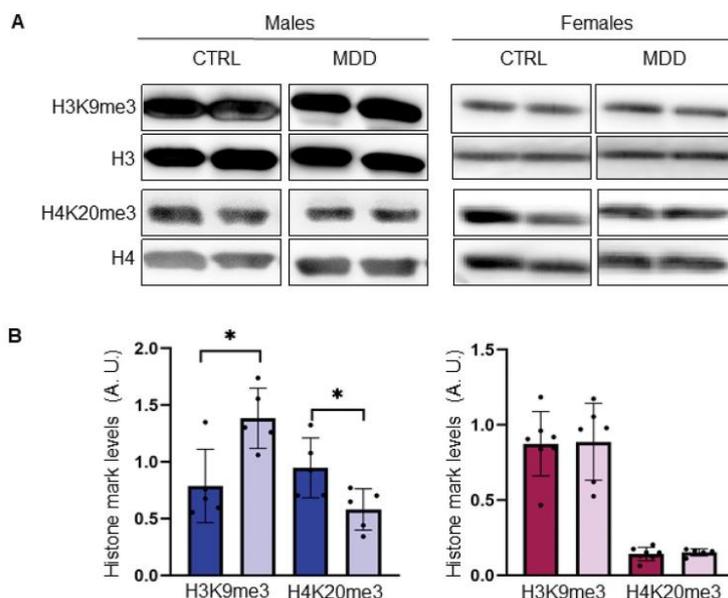
**Figure 1.** Levels of activating histone marks in male and female cerebellum. A) H3K4me2, H3K36me2, and H3K36me3 levels were analyzed by western blot and (B) quantified by normalization to total histone H3 using ImageJ (A.U. arbitrary units). Dark blue: control (CTRL) males, light blue: methyl donor deficient (MDD) males, purple: control (CTRL) females, pink: methyl donor deficient (MDD) females.  $N = 5$  per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

There was no clear correlation between the decrease in the activating mark H3K4me2 in MDD males and the expression levels of the corresponding writers and erasers, as *Kmt2a* and *Kmt2c* or *Kdm5a* and *Kdm2b* were all less expressed (Figure 3B,C). However, the increase in H3K9 trimethylation could be explained by the decrease in the demethylase *Kdm4c* in MDD males compared to controls (Figure 3C). Similarly, the decrease of *Kmi5b* expression could relate to the decrease in the repressive mark H4K20me3 (Figure 3B). Despite the reduced level of *Kmt2c*, the decrease in dimethylation of H3K36 could be explained by the diminished expression of both *Kdm2a* and *Kdm4c* (Figure 3C), whereas the decrease in *Kmi3c* correlated with the decrease in trimethylation of the same residue (Figure 3B).

In conclusion, histone marks are more impacted by MDD in males' cerebellum than in females. This could be partly due to the changed expression of some methylases and/or demethylases. Whereas two activating marks were decreased in females, we observed both an increase and a decrease in activating and repressive marks in the male cerebellum following MDD. Notably, the increase of H3K36me2 and the decrease of H4K20me3 could be explained by the altered expression of *Kdm2a* and *Kmi5b*, respectively.

## 2.2. Micro-RNAs of the *Dlk1-Dio3* Locus Are Up-Regulated in the Male Cerebellum following MDD

It was previously shown that MDD could affect miRNA expression during brain development.<sup>[21,22]</sup> However, to the best of our knowledge, a potential sex-biased response to MDD was not investigated. We, therefore, determined whether miRNAs could contribute to the sex-biased response to MDD in the cerebellum. We first performed miRNA microarray on the males' and females' cerebellum of pups born from dams fed a control diet. We found that 21 miRNAs were differentially expressed (DemiRs) in the cerebellum depending on the sex (Table 1). Among these 21 DemiRs, we selected eight candidates displaying high expression levels in the cerebellum, and performed RT-qPCR on independent samples in order to validate microarray results, and see how they respond to MDD (Figures 4 and S2B, Supporting Information). However, we were not able to validate most of the miRNAs we tested by RT-qPCR for differences of expression between control males and females (Figures 4 and S2B, Supporting Information). Nonetheless, we observed a differential expression for some of them in males depending on the mother's diet. Two of them, miR-134-5p and miR-369-5p, were significantly overexpressed in the cerebellum of males born to dams fed the MDD



**Figure 2.** Levels of inhibiting histone marks in male and female cerebellum. A) H3K9me3 and H4K20me3 levels were analyzed by western blot and (B) quantified by normalization to total histone H3 or H4 using ImageJ (A.U. arbitrary units). Dark blue: control (CTRL) males, light blue: methyl donor deficient (MDD) males, purple: control (CTRL) females, pink: methyl donor deficient (MDD) females.  $N = 5$  per group, \*  $p < 0.05$ .

diet but not in females (Figure 4). These two miRNAs belong to the *Dlk1-Dio3* locus. We tested two other miRNAs from this cluster, miR-410-3p and miR-380-3p, and they also displayed the same response to the MDD diet (Figures 4 and S2A, Supporting Information). Strikingly, no difference in the expression of these miRNAs was observed in females in response to MDD (Figure 4).

We then used TargetScan to determine the list of putative or known targets of these miRNAs with functions in chromatin remodeling (Table 2; Agarwal et al.<sup>[23]</sup>). Several predicted targets were down-regulated in the male cerebellum following MDD (Table 2). Notably, miR-134-5p displays a higher level of expression in males, whereas two of its predicted targets (*Kdm2a* and *Kmt5b*) are significantly less expressed, with levels of their substrate histone marks also affected, an increase for H3K36me2 and a decrease for H4K20me3, respectively. This negative correlation was also found for miR-369-5p, *Kdm2a*, and H3K36me2.

In order to validate whether the increased expression of miR-134-5p and miR-369-5p could indeed affect the expression of *Kdm2a* and *Kmt5b* and result in changes in the corresponding histone marks in male cerebellum, we overexpressed both miRNAs in a cellular system. C6 rat glioma cells were transfected for 72 h with miRNA mimics and expression levels of both writer/eraser and histone marks were assessed by RT-qPCR and western blot, respectively. C6 glioma cells do not express miR-134-5p nor miR-369-5p endogenously (data not shown). Overexpressing miR-134-5p resulted in decreased mRNA levels of both *Kdm2a* and *Kmt5b*,

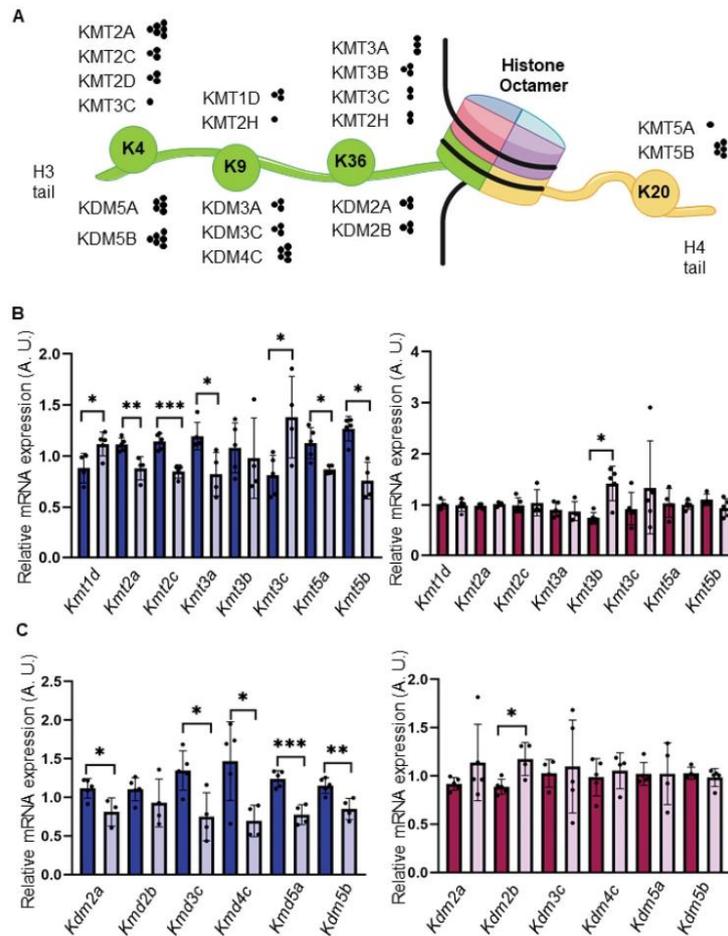
whereas only *Kdm2a* expression was affected when overexpressing miR-369-5p (Figure 5A). These results are in agreement with TargetScan prediction.

Using immunoblot, we also evaluated the histone marks H3K36me2 and H4K20me3 following miRNA overexpression. H3K36me2 and H4K20me3 levels were decreased in cells transfected with the miR-134-5p mimics (Figure 5B). Unexpectedly, overexpressing either miR-134-5p or miR-369-5p leads to decreased H4K20 trimethylation compared to cells transfected with negative control (Figure 5B).

In conclusion, miR-369-5p seems to target *Kdm2a* and miR-134-5p *Kmt5b*, resulting in an increase of the histone mark H3K36me2 or a decrease in H4K20me3, respectively.

### 2.3. Genes Involved in Synaptic Plasticity Are Less Associated with the Repressive Mark H4K20me3 in Males' Cerebellum

We previously reported that the expression of genes involved in synaptic plasticity was more dysregulated in female cerebellum than in males following MDD.<sup>[19]</sup> We hypothesized that the alteration of histone methylation might contribute to these observations. *Grid2* codes for a subunit of ionotropic glutamate receptor and is selectively expressed in Purkinje cells. *Gria3* codes for a subunit of ionotropic glutamate receptor of the AMPA type. Their expression was reduced in females but not in males' MDD cerebellum (Figures 6A and 7A). To test whether



**Figure 3.** Expression levels of histone methylases and demethylases in P21 rat cerebellum. A) The different amino acids methylated on H3 or H4 tails are indicated, with their respective methylases or demethylases.<sup>[20]</sup> The number of dots refers to the lysine's mono-, di-, or trimethylation. B) mRNA expression levels of histone lysine methylases (*Kmt*) were quantified by RT-qPCR on total RNA extracted from control (dark blue) or methyl donor deficient (MDD, light blue) males or control (purple) or methyl donor deficient (MDD, pink) females. C) mRNA expression levels of histone lysine demethylases (*Kdm*) were quantified by RT-qPCR on total RNA extracted from control (dark blue) or methyl donor deficient (MDD, light blue) males or control (purple) or methyl donor deficient (MDD, pink) females.  $N = 5$  per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

differences were observed in H3K36 or H4K20 methylation in chromatin associated with the *Grid2* or *Gria3* genes, we performed a ChIP experiment using antibodies specifically directed against H3K36me2 and H4K20me3. We observed no significant difference in the level of H3K36me2 either in the promoter or the coding region of *Grid2* or *Gria3* following MDD (Figures 6 and 7). However, H4K20me3 levels were reduced in both the promoter and the coding region of *Grid2* in the male MDD cerebellum compared to male controls, with no difference in females

(Figure 6). Similar results were obtained on *Gria3* (Figure 7). This decrease of the repressive mark H4K20me3 in the male cerebellum may contribute to the maintained expression of *Grid2* and *Gria3*.

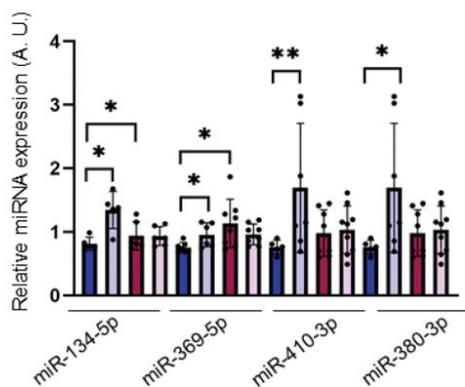
### 3. Discussion

Methyl donor deficiency caused by vitamin B9 and B12 deficiency is associated with an increased risk for several neurodegenerative

**Table 1.** List of differentially sex-expressed miRNAs in the cerebellum (miRnome).

ID	Feature symbol	Sex_FC	Sex_Tukey_pval
MIMAT0000840	<b>rno-miR-134-5p</b>	-1.63	0.02
MIMAT0003174	<b>rno-miR-540-3p</b>	-1.50	0.03
MIMAT0025048	rno-miR-3099	-1.45	0.03
MIMAT0001628	<b>rno-miR-433-3p</b>	-1.43	0.04
MIMAT0000568	rno-miR-330-3p	-1.41	0.05
MIMAT0012839	<b>rno-miR-668</b>	-1.36	0.05
MIMAT0005337	rno-miR-760-3p	-1.33	0.05
MIMAT0000903	rno-miR-320-3p	-1.33	0.01
MIMAT0005329	rno-miR-674-5p	-1.31	0.03
MIMAT0000847	rno-miR-142-5p	-1.22	0.00
MIMAT0000796	rno-miR-26a-5p	1.15	0.03
MIMAT0000570	rno-miR-331-3p	1.46	0.05
MIMAT0025073	rno-miR-6332	1.49	0.04
MIMAT0003206	<b>rno-miR-369-5p</b>	1.58	0.04
MIMAT0024851	rno-miR-1306-5p	1.77	0.00
MIMAT0017882	rno-miR-219b	1.82	0.02
MIMAT0017222	<b>rno-miR-485-3p</b>	1.89	0.03
MIMAT0017095	rno-miR-18a-3p	2.31	0.02
MIMAT0017885	rno-miR-702-3p	2.57	0.00
MIMAT0024844	rno-miR-1839-3p	4.16	0.01
MIMAT0003208	rno-miR-374-5p	4.86	0.02

Bold: miRNA belonging to the *Dlk1-Dio3* locus. Females were compared to males.



**Figure 4.** Several miRNAs of the miR379/410 locus are overexpressed in the male cerebellum following methyl donor deficiency. The miRNA expression level was quantified by RT-qPCR on total RNA extracted from P21 rat pups fed the control or the deficient (MDD) diet. Dark blue: control males, light blue: MDD males, purple: control females, and pink: MDD females.  $N = 5$  per group, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . A.U., arbitrary units.

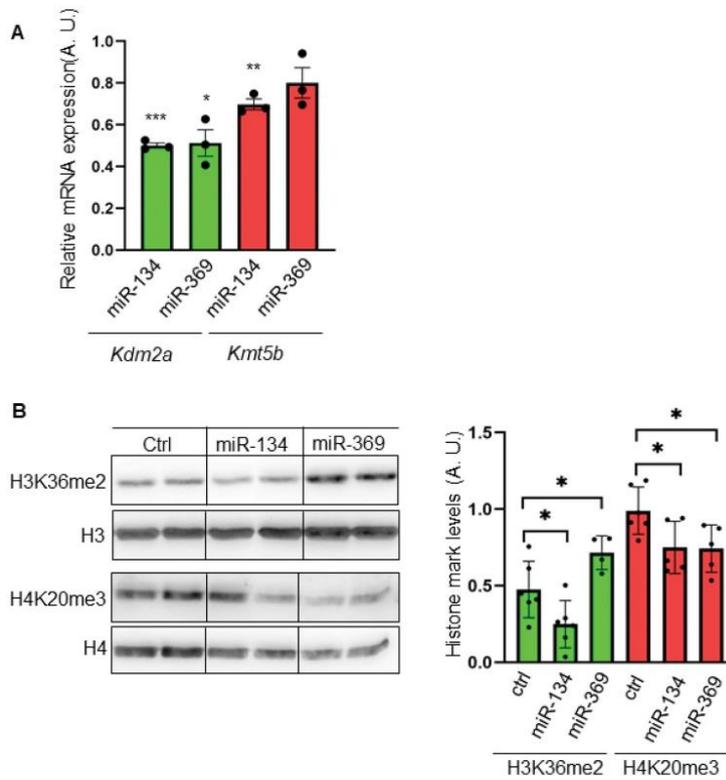
**Table 2.** List of miRNA targets.

miR-134-5p	miR-380-3p	miR-369-3p	miR-410-3p	miR-369-5p
<b>KDM2A</b>	SALL1 <sup>a)</sup>	<b>KMT3A</b>	<i>KMT2D</i>	KMT7
<b>KMT3C</b>	<b>ATXN7</b>	NCOA3	<b>KDM2A</b>	KDM1B
<i>KMT2D</i>	SMYD1	ARID4A <sup>b)</sup>	<b>RCOR1</b>	SETD3
<b>KMT5B</b>	ARID1A	<b>KMT2A</b>	<b>ARID4B</b>	<b>KDM2A</b>
HDAC5	<b>MECP2</b>	CDC73	NR3CA	BRD3
	<b>KDM5A</b>	ARID2	KDM7A	
	<i>KDM2B</i>		SETD3	
	<b>KDM3C</b>			

A list of potential mRNA targets of some miRNAs of the *Dlk1-Dio3* cluster was determined using TargetScan.<sup>[23]</sup> Genes with a function in chromatin modifications are indicated. The genes that were less expressed in MDD males than controls, and not affected in females, whatever the diet, are indicated in bold (determined by RT-qPCR,  $N = 5$  animals per group,  $p$ -value  $< 0.05$ ). Genes with no expression variation, whatever the sex and the diet, are in italics. Genes in gray were not evaluated. <sup>a)</sup> Reduced expression in MDD females only ( $N = 5$  animals per group,  $p$ -value  $< 0.05$ ); <sup>b)</sup> Reduced expression in both MDD males and females, compared to controls ( $N = 5$  animals per group,  $p$ -value  $< 0.05$ ).

diseases and neurological pathologies.<sup>[24]</sup> We developed a rat nutritional model to investigate the underlying molecular mechanisms. The cerebellum is particularly affected by MDD in rat pups at P21, with decreased levels of *Era*, accompanied by an impairment of neurosteroidogenesis<sup>[17]</sup> and alterations in the *Egr1/Era* and *Wnt* signaling pathways.<sup>[18,19]</sup> Interestingly, we repeatedly observed a sex-biased sensitivity to MDD, with females being more affected than males. We hypothesized that epigenetic modifications could contribute to this sex-biased response to MDD. A previous transcriptomic analysis performed in the lab on the cerebellum of P21 female pups born to dams fed the MDD diet indicated that clusters of genes involved in histone methylation were displaying a decreased expression.<sup>[19]</sup> To further validate this result, we measured the levels of several histone methylation marks and found that, contrary to what was expected, males displayed more changes than females following MDD. Notably, the greatest differences between the two sexes were observed for the activating mark H3K36me2, as well as the repressive mark H4K20me3. Although less studied than DNA methylation, methylation of histones is known to be affected by 1C metabolism disturbances, in particular, H3K9, H3K27, and H3K4 sites, which were the most investigated.<sup>[25]</sup> As the impairment of 1C metabolism leads to dysregulation of SAM synthesis, the universal methyl group donor used for transmethylation reactions, a decrease in histone methylation is generally observed under MDD conditions. For instance, we have already reported a decrease in H4K20me3 in the liver of E20 MDD pups,<sup>[26]</sup> which was also observed following the inactivation of the MTHFR enzyme, a major component of the 1C metabolism responsible for the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate.<sup>[27]</sup> However, in some cases, histone methylation could also be increased following MDD.<sup>[28–30]</sup> We report here for the first time an effect of MDD on histone methylation levels in the cerebellum.

Variations in methylation levels at specific histones could be the consequence of a reduced availability of SAM, but also due to altered expression levels of the modifiers, the lysine methylases

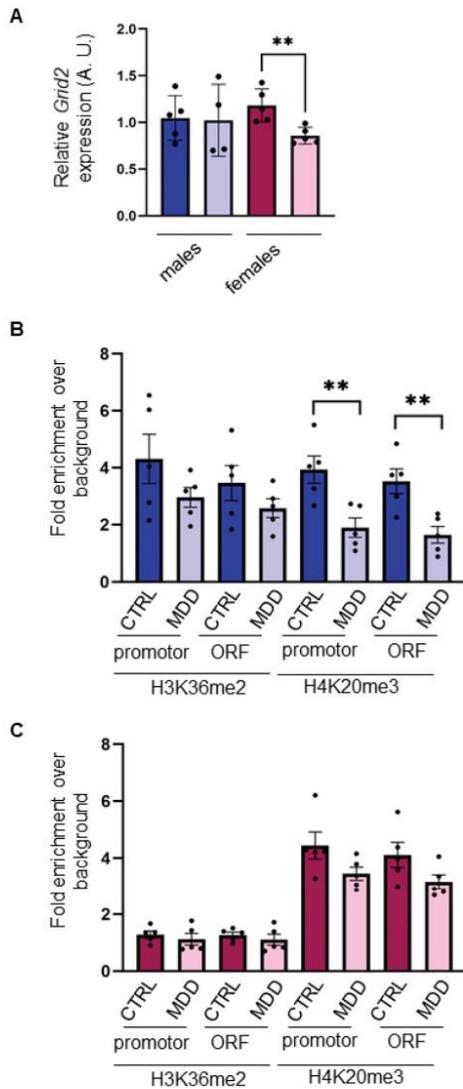


**Figure 5.** Overexpressing miR-134-5p or miR-369-5p alters the expression of *Kdm2a* and *Kmt5b*. A) Expression levels of *Kdm2a* (green) and *Kmt5b* (red) were quantified by RT-qPCR on total RNA extracted from cells overexpressing either miR-134-5p or miR-369-5p and compared to cells overexpressing a scramble sequence.  $N = 3$ ,  $^{***} p < 0.01$ ,  $^{**} p < 0.001$ . A.U., arbitrary units. B) H3K36me2 (green) and H4K20me3 (red) levels were analyzed by western blot, and signals normalized to total H3 or H4. Quantification results are depicted on the right.  $N > 4$ ,  $^* p < 0.01$ , A.U., arbitrary units.

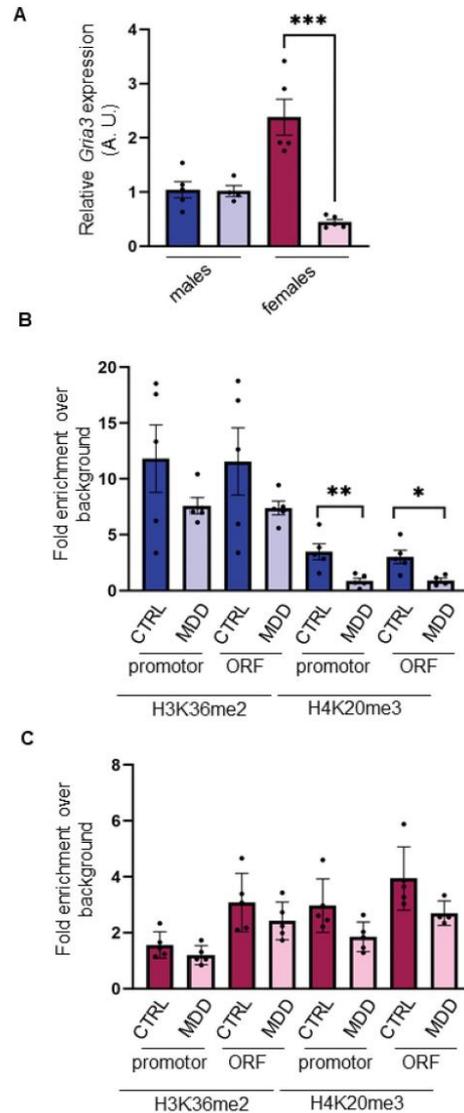
and demethylases enzymes. The expression of these histone writers and erasers was also globally more affected by MDD in males than in females. After investigating several histone marks, we found a decreased expression of the methylases and demethylases responsible for their modifications, suggesting potential regulation mechanisms in males' cerebellum but not in females in response to MDD. In the case of H3K36me2 and H4K20me3, their levels were negatively correlated with those of the respective modifier enzymes, *Kdm2a* and *Kmt5b*.

In addition to histone methylation, we also investigated the effects of MDD on another epigenetic mechanism, the miRNAs. These may serve a still underappreciated role in organizing the sexually dimorphic brain. Indeed, the miRNA environment is dynamically responsive to testosterone<sup>[31]</sup> and estrogen.<sup>[32]</sup> In the human brain, male-biased miRNAs tend to be enriched for functions like histone modifications and circadian rhythm and

are often clustered in the human genome.<sup>[33]</sup> We identified several miRNAs belonging to the *Dlk1-Dio3* locus that were specifically showing an increased expression in MDD males but not in females. This locus contains three protein-coding genes (*Dlk1*, Retrotransposon-Like 1 *Rhl1*, and *Dio3*) as well as the largest known miRNA cluster in vertebrates, which spreads over 30-kb and is sub-divided into two clusters: the miR-127/135 and the miR-379/410 clusters.<sup>[34,35]</sup> The *Dlk1-Dio3* locus is imprinted, and the miRNAs it contains are maternally expressed in a range of embryonic and extraembryonic cell types, with postnatal expression being found predominantly in the brain.<sup>[35–37]</sup> Evidence suggests that miRNAs from the miR-379/410 cluster are processed from a long non-coding polycistronic RNA, called *Mirg* in mice.<sup>[35,38]</sup> It was reported that the expression of miR-379/410 was induced by neuronal activity in primary rat neurons.<sup>[38]</sup> Additionally, the same study underlined that the transcription



**Figure 6.** Association with *H3K36me2* and *H4K20me3* with *Grid2* DNA in male and female cerebellum. A) *Grid2* expression level was quantified by RT-qPCR in male and female cerebellum. B, C) The association between *H3K36me2* or *H4K20me3* with regions from the promotor or the coding sequence (ORF) of *Grid2* was analyzed by ChIP followed by qPCR. ChIP signals are represented as the fold increase relative to the background (no antibody) signal.  $N = 5$  per group. \*\*  $p < 0.01$ . A.U., arbitrary units. B) dark blue: control (CTRL) males, light blue: methyl donor deficient (MDD) males, C) purple: control females, pink: MDD females.



**Figure 7.** Association with *H3K36me2* and *H4K20me3* with *Gria3* DNA in male and female cerebellum. A) *Gria3* expression level was quantified by RT-qPCR in male and female cerebellum. B, C) The association between *H3K36me2* or *H4K20me3* with regions from the promotor or the coding sequence (ORF) of *Gria3* was analyzed by ChIP followed by qPCR. ChIP signals are represented as the fold increase relative to the background (no antibody) signal.  $N = 5$  per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . A.U., arbitrary units. B) Dark blue: control (CTRL) males, light blue: methyl donor deficient (MDD) males, C) purple: control females, pink: MDD females.

of the miR-379/410 cluster, mediated by the transcription factor Mef2, led to the dendritic outgrowth of hippocampal neurons. In our nutritional rat model, we measured an increased expression of four miRNAs of the cluster (miR-134-5p, miR-410-3p, miR-369-5p, and miR-380-3p). However, the expression of miR-485, located between miR-134 and miR-369, was not affected by MDD (Figure S2A, Supporting Information), suggesting a post-transcriptional effect rather than a transcriptional effect on the putative long primary transcript. In the developing or the adult brain, miRNAs from this cluster display expression differences.<sup>[39]</sup> Indeed, clustered organization of miRNA genes does not always imply their co-expression. For example, differential regulation of several miRNAs from this cluster was observed in a mouse model of ischemia in the hindlimb, with expression of some miRNAs remaining unaffected, and others with an early or a late-upregulation following ischemia.<sup>[40]</sup> In this case, expression seemed to be regulated by binding of different RNA-binding proteins to aid in the processing of the miRNA precursors. Therefore, upregulation of some miRNAs from this cluster following MDD might be explained by a differential regulation in the maturation process of the miRNA precursors.

Maternal deletion of the miR-379/410 imprinted cluster in induced neurons resulted in an up-regulation of the transcriptional program regulating synaptic transmission and neuronal function through the increase of paternally expressed transcripts *Plagl1* and *Peg3*, as well as additional effects on *NeuroD1*.<sup>[37]</sup> Consistent with the persistent brain expression of miRNAs belonging to this cluster in adults, several studies have pointed out regulatory roles in neuronal functions, especially for miR-134.<sup>[39]</sup> In silico analysis predicted that miRNAs of the miR-379/410 cluster could target several mRNA coding for chromatin modifiers (Table 2). Our results in P21 MDD male cerebellum and rat glioma cells overexpressing either miR-134-5p or miR-369-5p suggest that they target *Kdm2a* and *Kmt5b* transcripts, consistent with the increase in H3K36me2 and the decrease in H4K20me3 respectively. ChIP experiments further support the regulation of *Kmt5b* by miR-134-5p. Upon MDD, miR-134-5p expression is increased in the male cerebellum but not in the female. It, therefore, down-regulates *Kmt5b*, leading to a decrease in the repressive mark H4K20me3, enabling a maintained expression of several genes targeted by the Wnt signaling pathways and involved in synaptic plasticity, such as *Grid2* or *Gria3*. This mechanism could contribute to the protective effect we repeatedly observed in males in this nutritional rat model<sup>[17,18]</sup> but also in other rodent genetic models<sup>[41]</sup> or humans.<sup>[14]</sup> Future work will explore the molecular mechanisms leading to the deregulation of miRNAs belonging to the miR-379/410 imprinted cluster upon MDD. Preliminary investigations have revealed that expression of miR-134-5p, miR-369-5p, and miR-485-3p in neuroblastoma rat cells is not affected by dihydroxytestosterone treatment (data not shown). However, estradiol remains an interesting candidate involved in these regulations, and future work will also explore this possibility. Finally, one could imagine that MDD leads to differential methylation of genomic DNA in the region of the miR-379/410 cluster, and for this reason, we will consider this hypothesis as well.

To conclude, we report for the first time a sex differential expression of miRNAs from the *Dlk1-Dio3* locus in the rat cerebellum in response to gestational MDD, which in turn could mod-

ulate chromatin modifications, and contribute to a maintained expression of genes involved in the synaptic plasticity. This could partly explain why male pups are less sensitive to MDD than female pups.

#### 4. Experimental Section

**Animals:** A validated rat model of early methyl donor deficiency was used, as previously described.<sup>[19,42]</sup> Experiments were performed on Wistar rats (Janvier labs, Le Genest-Saint-Isle, France) following the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in an accredited establishment (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U1256). Project approval was obtained from the French Ministry of Research (authorization APAFIS#2436-2015102612288709 v5). Animals (8 weeks old) were maintained on a 12 h light-dark cycle and were housed at 22–23 °C, with ad libitum access to food and water. One month before mating, females were fed either a standard diet (A04 Standard Diet, Safe, Augy, France) or a diet deficient in folate and vitamin B12 and lowered in choline (Special Diet Service, Saint-Gratien, France). These diets were maintained until the weaning of the offspring at day 21 (P21). On postnatal day 2, litters were adjusted to a normal litter size of eight pups per dam.

Rat pups were euthanized at P21 with an overdose of isoflurane. Cerebellums were rapidly harvested and frozen in liquid nitrogen. Biochemical validation of the vitamin B9 and B12 deficiency was performed as previously described<sup>[19]</sup> (Table S1, Supporting Information). Pups from different litters ( $N = 5$ ) were analyzed.

**RNA Extraction:** Total RNA was extracted from 20 mg of frozen cerebellum with 1 mL of TRIzol Reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's recommendations. An additional DNase treatment was performed using TURBO DNase (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), followed by an acid-phenol extraction and precipitation with ethanol. The quality of total RNAs was assessed by O.D. 260 nm/O.D. 280 nm and O.D. 260 nm/O.D. 230 nm determination by spectrophotometry using a Multiskan GO microplate spectrophotometer (Waltham, MA, USA) and a Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). The samples with an RNA integrity number >8 were selected. RNA samples were aliquoted and stored at –80 °C for subsequent analyses.

**Microarray Expression Profiling:** Microarray experiments were performed at the Proteome and Genome Research Unit at the Luxembourg Institute of Health (Strassen, Luxembourg). The miRNA expression profile between male and female control cerebellum was analyzed using the Affymetrix Gene-Chip miRNA 4.0 Arrays and the FlashTag Biotin HSR RNA Labeling kit (Genisphere, USA). Pre-processing of microarray data was performed using Partek Genomics suite version 6.5 (Partek GS) using the robust multichip analysis algorithm, which performs background adjustment, quantile normalization, and probe summarization.<sup>[43,44]</sup> Normalized miR expression was then imported into R environment for filtering, quality control (QC), and differential expression analysis (DEA). Standard methods such as analysis of distribution, boxplot of relative log expression, principal component analysis were applied for QC. Filtering were applied to keep only mature *Rattus norvegicus* miRNAs with an expression level above 4 ( $\log_2$  scale) in at least one sample.

**Quantitative RT-PCR Analysis:** One microgram of total RNA was subjected to 2-step RT-qPCR using the PrimeScript RT Master Mix and the TB Green Premix Ex Taq following the manufacturer's recommendations (Takara Bio Inc., Kusatsu Shiga, Japan). Primer sequences were listed in Table S2, Supporting Information.

For miRNA analysis, 500 ng of total RNA were first incubated with 5 U of poly(A) polymerase (New England BioLabs, Evry, France) for 30 min at 37 °C, in the presence of 1 mM ATP. After denaturation at 95 °C for 2 min, samples were reverse-transcribed with 200 U of M-MLV (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using OTG3 primer (Table S2, Supporting Information). Two  $\mu$ L of the reaction were used for qPCR analysis using the TB Green Premix Ex Taq. A forward primer corresponding to the

sequence of the mature miRNA was used in combination with OTG4 (Table S2, Supporting Information).

The expression of the genes or the miRNAs of interest was determined using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method by using the geometric mean of two reference genes. *Gapdh* and *Map1b* were used for mRNA quantification, whereas *mo-miR-652-3p* and *mo-miR-195-5p* were used for miRNA quantification. Following the miRnome results, the study selected these two miRNAs as internal controls since their expression was not altered by MDD or sex. For mRNA quantification, reference genes were tested and selected based on their stable expression between sex and whatever the diet.

**Cell Culture:** C6 rat glioma cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum FBS (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and 0.1% penicillin/streptomycin. Cells were grown in a humid atmosphere under 5% CO<sub>2</sub>.

Cells were seeded in 6-well plates to reach 40–50% confluency on the day of transfection. Cells were then transfected with 10 nM of miR-134-5p and miR-369-5p mimics (miScript miRNA mimics, Qiagen, Hilden, Germany) using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Waltham, MA, USA). After 72 h, cells were harvested in PBS 1X. The AllStars Negative Control siRNA (Qiagen, Hilden, Germany) was used to transfect cells as a negative control.

**Histone Methylation Analysis:** Histone proteins were extracted from 20 mg of frozen cerebellum or transfected cells. Samples were resuspended in PBS 1x Triton X-100 0.5% supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Invitrogen, Waltham, MA, USA). After 20 strokes in a Dounce homogenizer followed by centrifugation at 1000 × g at 4 °C for 5 min, pellets were resuspended in 3 volumes of extraction buffer (0.5N HCl, 10% glycerol) and incubated for 30 min on ice. After centrifugation of 5 min at 12 000 × g, 8 volumes of acetone were added to the supernatant, followed by overnight incubation at –20 °C. After final centrifugation of 5 min at 12 000 × g, histone proteins were resuspended in 20 µL water.

Five µg of proteins were separated on a 15% SDS-PAGE and transferred onto a 0.2 µm nitrocellulose membrane using the semi-dry transfer (Biorad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked in TBST-milk 5% and incubated overnight with the primary antibody: anti-H3 (ab10799, ChIP grade, Abcam, Cambridge, UK), anti-H3K4me2 (Ab7766, ChIP grade, Abcam), anti-H3K36me2 (ab9049, ChIP grade, Abcam), anti-H3K36me3 (ab9050, ChIP grade, Abcam), anti-H3K9me3 (ab176916, Abcam), anti-H4 (ab10158, ChIP grade, Abcam), anti-H4K20me3 (ab177190, ChIP grade, Abcam). The corresponding secondary antibody coupled to HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) was added for 1 h at room temperature. Chemiluminescent signals were acquired using the FusionFx7 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) and quantified using ImageJ v1.53 (National Institute of Health).

**ChIP Analysis:** Fifteen mg of frozen cerebellum were cut into pieces and resuspended in 1 mL cold PBS 1x with 1.5% formaldehyde. Samples were cross-linked 2 min at room temperature before stopping the reaction by adding glycine to a final concentration of 0.125 M. After centrifugation for 5 min at 500 × g 4 °C, tissues were washed in cold PBS 1x and resuspended in 1 mL of FA buffer lysis buffer (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH8, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitors). After 10 strokes in a Dounce homogenizer, lysates were sonicated using an M220 Focused-ultrasonicator (Covaris LLC, Woburn, MA, USA). One µL of antibody (H3K36me2 or H4K20me3, ChIP grade, Abcam, Cambridge, UK) was added and the samples were incubated for 1 h at 4 °C. After adding 25 µL Dynabeads<sup>TM</sup> protein G (Invitrogen, Waltham, MA, USA), samples were further incubated overnight at 4 °C. Beads were washed in low salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl), high salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl), and LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8). After elution (1% SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) and reversal of DNA cross-links, DNA was purified using the PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The enrichment of the DNA template was analyzed by qPCR. Primer sequences were given in Table S2, Supporting Information. The relative enrichment was calculated with the fold enrichment method using the no-antibody signal.

**Statistical Analysis:** Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 9.3 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). All data were expressed as means ± SEM. Two-group comparisons (controls vs MDD or males vs females from the same diet group) were performed using the Mann-Whitney test for non-parametric data or an unpaired t-test for parametric data. *p*-values ≤ 0.05 were considered significant. In miRNA experiments, to identify DEA, two-way ANOVA followed by Tukey honest significant difference test were performed. miRNAs with Tukey's adjusted *p*-value < 0.05 were considered as differentially expressed.

## Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

## Acknowledgements

The original elements used in the graphical abstract and in Figure 3A have partially been created with BioRender.com (<https://biorender.com/>, accessed on 19 January 2023). The authors would like to thank the ORION program for its contribution to the funding of NBO's research internship. This work has benefited from a government grant managed by the Agence Nationale de la Recherche with the reference ANR-20-SFRI-0009. A grant from Région Lorraine supported this work.

## Conflict of Interest

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Author Contributions

N.D. designed the research. J.W., P.M., N.B.O., E.L., P.D., F.B., N.D. conducted the experimental research. T.K. and L.V. curated data. J.W., P.M., P.D., N.B.O., M.R., L.L., B.L., J.L.G., B.L.M., N.D. contributed to the experimental design and interpretation of data. J.W., N.D. drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## Data Availability Statement

Data are to be shared upon request to N.D.

## Keywords

epigenetics, folate, histone, microRNA, rat cerebellum

Received: January 24, 2023

Revised: May 12, 2023

Published online:

- [1] J. Park, K. Lee, K. Kim, S.-J. Yi, *Signal. Transduct. Target Ther.* **2022**, *7*, 217.
- [2] B. Gegenhuber, J. Tollkuhn, *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2022**, *14*, a039099.
- [3] X. Yang, E. E. Schadt, S. Wang, H. Wang, A. P. Arnold, L. Ingram-Drake, T. A. Drake, A. J. Lusis, *Genome Res.* **2006**, *16*, 995.

- [4] E. Y. Shen, T. H. Ahern, I. Cheung, J. Straubhaar, A. Dincer, I. Houston, G. J. de Vries, S. Akbarian, N. G. Forger, *Exp. Neurol.* **2015**, *268*, 29.
- [5] C. S. Weickert, M. Elashoff, A. B. Richards, D. Sinclair, S. Bahn, S. Paabo, P. Khaitovich, M. J. Webster, *Mol. Psychiatry* **2009**, *14*, 558.
- [6] A.-M. Bao, D. F. Swaab, *Front. Neuroendocrinol.* **2011**, *32*, 214.
- [7] E. Vegeto, A. Villa, S. Della Torre, V. Crippa, P. Rusmini, R. Cristofani, M. Galbiati, A. Maggi, A. Poletti, *Endocr. Rev.* **2020**, *41*, bnz005.
- [8] I. A. Qureshi, M. F. Mehler, *Prog. Brain Res.* **2010**, *186*, 77.
- [9] M. Musicco, *Funct. Neurol.* **2009**, *24*, 89.
- [10] A. U. Khan, M. Akram, M. Daniyal, R. Zainab, *Int. J. Neurosci.* **2019**, *129*, 55.
- [11] F. Coppèdè, *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *170*, 19.
- [12] E. L. Beckett, M. Veysey, M. Lucock, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **2017**, *474*, 60.
- [13] D. O. Kennedy, *Nutrients* **2016**, *8*, 68.
- [14] C.-S. Chen, Y.-T. Kuo, H.-Y. Tsai, C.-W. Li, C.-C. Lee, C.-F. Yen, H.-F. Lin, C.-H. Ko, S.-H. H. Juo, Y.-C. Yeh, G.-C. Liu, *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2011**, *19*, 618.
- [15] S. Barua, S. Kuizon, W. T. Brown, M. A. Junaid, *J. Mol. Neurosci.* **2016**, *58*, 277.
- [16] S. El Hajj Chehadeh, N. Dreumont, J. Willekens, L. Canabady-Rochelle, E. Jeannesson, J.-M. Alberto, J.-L. Daval, J.-L. Guéant, B. Leininger-Muller, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2014**, *307*, E1009.
- [17] S. El Hajj Chehadeh, G. Pourié, N. Martin, J.-M. Alberto, J.-L. Daval, J.-L. Guéant, B. Leininger-Muller, *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1021.
- [18] G. Pourié, N. Martin, C. Bossenmeyer-Pourié, N. Akchiche, R. M. Guéant-Rodriguez, A. Geoffroy, E. Jeannesson, S. El Hajj Chehadeh, K. Mimoun, P. Brachet, V. Koziel, J.-M. Alberto, D. Helle, R. Debard, B. Leininger, J.-L. Daval, J.-L. Guéant, *FASEB J.* **2015**, *29*, 3713.
- [19] J. Willekens, S. Hergalant, G. Pourié, F. Marin, J.-M. Alberto, L. Georges, J. Paoli, C. Nemos, J.-L. Daval, J.-L. Guéant, B. Leininger-Muller, N. Dreumont, *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 892.
- [20] D. Husmann, O. Gozani, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2019**, *26*, 880.
- [21] R. Kerek, A. Geoffroy, A. Bison, N. Martin, N. Akchiche, G. Pourié, D. Helle, J.-L. Guéant, C. Bossenmeyer-Pourié, J.-L. Daval, *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e755.
- [22] A. Geoffroy, R. Kerek, G. Pourié, D. Helle, J.-L. Guéant, J.-L. Daval, C. Bossenmeyer-Pourié, *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54*, 5017.
- [23] V. Agarwal, G. W. Bell, J.-W. Nam, D. P. Bartel, *Elife* **2015**, <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.
- [24] E. Reynolds, *Lancet Neurol.* **2006**, *5*, 949.
- [25] M. Serefidou, A. V. Venkatasubramani, A. Imhof, *Front. Genet.* **2019**, *10*, 764.
- [26] H. Pellanda, T. Forges, A. Bressenot, A. Chango, J.-P. Bronowicki, J.-L. Guéant, F. Namour, *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 976.
- [27] X. Li, S. Nai, Y. Ding, Q. Geng, B. Zhu, K. Yu, W.-G. Zhu, M.-Q. Dong, X.-D. Su, X. Xu, J. Li, *Cell Cycle Georget. Tex* **2017**, *16*, 1933.
- [28] B. A. Garcia, Z. Luka, L. V. Loukachevitch, N. V. Bhanu, C. Wagner, *Med. Hypotheses* **2016**, *88*, 63.
- [29] M. Bach, C. Savini, M. Krufczik, C. Cremer, F. Rösl, M. Hausmann, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1726.
- [30] S. Ichi, F. F. Costa, J. M. Bischof, H. Nakazaki, Y.-W. Shen, V. Boshnjaku, S. Sharma, B. Mania-Farnell, D. G. McLone, T. Tomita, M. B. Soares, C. S. K. Mayanil, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 36922.
- [31] C. P. Morgan, T. L. Bale, *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 11748.
- [32] C. P. Morgan, T. L. Bale, *Biol. Sex Differ.* **2017**, *8*, 27.
- [33] C. Cui, W. Yang, J. Shi, Y. Zhou, J. Yang, Q. Cui, Y. Zhou, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2018**, *16*, 200.
- [34] S. Griffiths-Jones, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, S. R. Eddy, A. Bateman, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D1214.
- [35] H. Seitz, H. Royo, M.-L. Bortolin, S.-P. Lin, A. C. Ferguson-Smith, J. Cavallé, *Genome Res.* **2004**, *14*, 1741.
- [36] S. Labialle, V. Marty, M.-L. Bortolin-Cavallé, M. Hoareau-Osman, J.-P. Pradère, P. Valet, P. G. P. Martin, J. Cavallé, *EMBO J.* **2014**, *33*, 2216.
- [37] A. J. Whipple, V. Breton-Provencher, H. N. Jacobs, U. K. Chitta, M. Sur, P. A. Sharp, *Mol. Cell* **2020**, *78*, 85.e8.
- [38] R. Fiore, S. Khudayberdiev, M. Christensen, G. Siegel, S. W. Flavell, T.-K. Kim, M. E. Greenberg, G. Schrott, *EMBO J.* **2009**, *28*, 697.
- [39] J. Winter, *Neurogenesis* **2015**, *2*, e1004970.
- [40] A. D. R. Velasco, S. M. J. Welten, E. A. C. Goossens, P. H. A. Quax, J. Rappilber, G. Michlewski, A. Y. Nossent, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *14*, 329.
- [41] N. Dreumont, K. Mimoun, C. Pourié, E. V. Quadros, J.-M. Alberto, R. Umoret, D. Helle, A. Robert, J.-L. Daval, J.-L. Guéant, G. Pourié, *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58*, 1024.
- [42] S. A. Blaise, E. Nédélec, H. Schroeder, J.-M. Alberto, C. Bossenmeyer-Pourié, J.-L. Guéant, J.-L. Daval, *Am. J. Pathol.* **2007**, *170*, 667.
- [43] R. A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, T. P. Speed, *Biostat. Oxf. Engl.* **2003**, *4*, 249.
- [44] P. V. Nazarov, S. E. Reinsbach, A. Muller, N. Nicot, D. Philippidou, L. Vallar, S. Kreis, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 2817.

## Annexe n°3 : Liste des communications

### Relatives au travail de thèse :

#### ➤ Internationales :

(1) Maternal and paternal methyl-donor deficiency impact newborn rat brain development

**P. Dimofski** ; J. Willekens ; S. El Hajj Chehadeh ; N. Dreumont ; B. Leininger-Muller - *NeuroFrance 2021* – En visioconférence (2021)

(2) Paternal methyl donor deficiency impacts testicular vitamin D metabolism in offspring

**Pauline Dimofski**, Nicolas Scheyer, Jean-Marc Alberto, Rémy Umoret, Jean-Louis Guéant, Natacha Dreumont, Brigitte Leininger-Muller - *The Epigenome in Human Health and Diseases Conference (FASEB, 2021)* – En visioconférence (2021)

#### ➤ Nationales :

(1) Impact de la carence paternelle en donneurs de méthyle sur la fertilité et le développement cérébral : premières observations

**P. Dimofski** ; N. Dreumont ; B. Leininger-Muller – *Réunion annuelle du FHU Arrimage* – En visioconférence (2020)

(2) La carence en folates entraîne une altération de la qualité du sperme et perturbe le métabolisme de la vitamine D chez le rat et sa descendance

N. Scheyer\* (Dr), **P. Dimofski** (Mlle), B. Leininger-Muller (Pr), J.L. Gueant (Pr) – *37<sup>ème</sup> congrès de la Société Française d'Endocrinologie* – Le Havre (2021)

### Relatives à d'autres travaux :

(1) The N-Homocysteinylation of the huntingtin emphasized the effects of the mutation in Huntington's disease.

Audrey Malardé, Salomé Puisieux, **Pauline Dimofski**, Gregory Pourié, Amélia Julien, Jean-Marc Alberto, Aurélie Robert, Jérémie Raso, Jean-Louis Guéant, Mathilde Renaud, Carine Bossenmeyer-Pourié. - *The Folic Acid, Vitamin B12, and One-Carbon Metabolism Conference (FASEB, 2020)*

## Annexe n°4 : Référentiel nutritionnel en vitamines et minéraux de l'ANSES (Mars 2021)

**Tableau 2. Références nutritionnelles retenues pour les vitamines (suite)**

Groupes de population	Vitamine B5 (mg/j)	Vitamine B6 (mg/j)			Vitamine B8 (µg/j)	Vitamine B9 (µg/j EFA)		Acide folique (µg/j)	Vitamine B12 (µg/j)	Vitamine C (mg/j)	
	AS	BNM	RNP	LSS	AS	BNM	RNP	LSS	AS	BNM	RNP
Nourrissons de moins de 6 mois	2		0,1*		4		65*		0,4		20*
Nourrissons de 6 mois et plus	3		0,3*		6		80*		1,5		20*
Enfants de 1 à 3 ans	4	0,5	0,6	5	20	90	120	200	1,5	15	20
Enfants de 4 à 6 ans	4,5	0,6	0,7	7	25	110	140	300	1,5	25	30
Enfants de 7 à 10 ans	5	0,9	1,0	10	25	160	200	400	1,5	40	45
Adolescents de 11 à 14 ans	6	1,2	1,4	15	35	210	270	600	2,5	60	70
Adolescents de 15 à 17 ans	6	1,5	1,7	20	35	250	330	800	2,5	85	100
Adolescentes de 15 à 17 ans	5	1,3	1,6	20	35	250	330	800	2,5	85	100
Hommes de 18 ans et plus	6	1,5	1,7	25	40	250	330	1000	4	90	110
Femmes de 18 ans et plus	5	1,3	1,6	25	40	250	330	1000	4	90	110
Femmes enceintes	5	1,5	1,8	25	40		600 <sup>a</sup>	1000	4,5	100	120
Femmes allaitantes	7	1,4	1,7	25	45	380	500	1000	5	140	170

\* Apport satisfaisant

<sup>a</sup> s'applique aux femmes susceptibles de devenir enceintes et aux femmes enceintes. Valeur possiblement surestimée pour les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> trimestres EFA, équivalent folates alimentaires

**Abréviations :** **AS** : apport satisfaisant ; **BNM** : besoin nutritionnel moyen ; **LSS** : limite supérieure de sécurité ; **RNP** : référence nutritionnelle pour la population.

# Annexe n°5 : Profils typiques des pics en LCMS/MS

## Insight Report

Printed at 10/27/2022 4:38:24 PM

Results File: C:\LabSolutions\Data\Pauline D\2022-06-09 testis 2 eme passage\2022-06-09 1.iproc - Synergi\_H21\_341266\_OCM\_POS\_2022\_03\_071cm

### Synergi\_H21\_341266\_OCM\_POS\_2022\_03\_07\_2022-06-09\_STD 10\_013

Sample ID:

Date acquired: 6/13/2022 7:04:20 PM

Acquired by: System Administrator

Data File: C:\LabSolutions\Data\Pauline D\2022-06-09 testis 2 eme passage\Synergi\_H21\_341266\_OCM\_POS\_2022\_03\_07\_2022-06-09\_STD 10\_013.kd

Vial: A12 | Inj. Volume: 10.0000uL | Tray: 2

Name	Conc.
Choline	198.9534
Glycine	308.7893
CTH	5.0155
Sérine	204.0873
Bétabilité	100.2140
Cystéine	312.5640
D3-SAM	1.0000
SAM	5.0567
Homocystéine	50.9885
D4-Homocystéine	1.0000
Méthionine	98.8769
D3 Méthionine	1.0000
GSH	503.3211
SAH	2.4827
D4-SAH	1.0000
Me-THF	0.2502
C13 Me-THF	1.0000
DMG	100.0964
D9-choline	1.0000
D11-Bétabilité	1.0000
Sérotonine	9.7335
Kynurenine	10.0221
D2 Cystéine	1.0000
D3 Sérine	1.0000

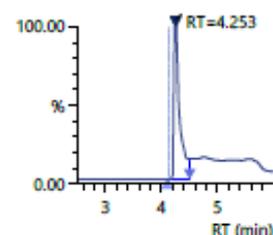
#### Choline

Conc 198.9534

Area 41559901

Q 104.20>60.20 (+)

5.68e6



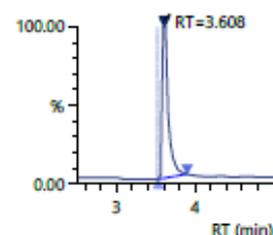
#### Glycine

Conc 308.7893

Area 1149825

Q 75.90>30.00 (+)

2.11e5



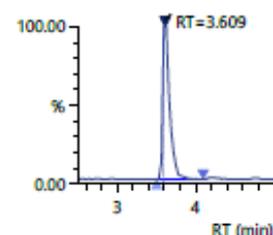
#### CTH

Conc 5.0155

Area 155208

Q 222.80>134.00 (+)

2.47e4



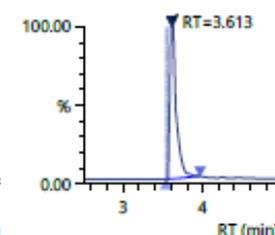
#### Sérine

Conc 204.0873

Area 5719430

Q 106.20>60.25 (+)

1.02e6



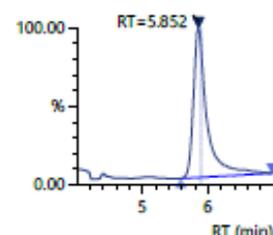
#### Bétabilité

Conc 100.2140

Area 39776944

Q 118.20>58.25 (+)

2.84e6



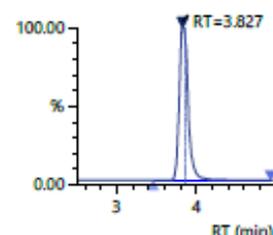
#### Cystéine

Conc 312.5640

Area 1120930

Q 121.60>59.20 (+)

1.43e5



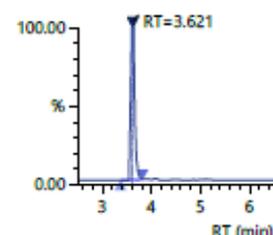
#### D3-SAM

Conc 1.0000

Area 1622525

ISTD 402.30>250.25 (+)

2.90e5



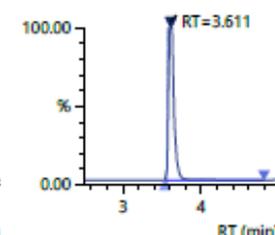
#### SAM

Conc 5.0567

Area 2779083

Q 399.10>250.05 (+)

5.56e5



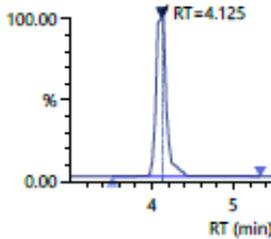
**Homocystéine**

Conc 50.9885

Area 4561594

Q 135.80>90.10 (+)

5.06e5



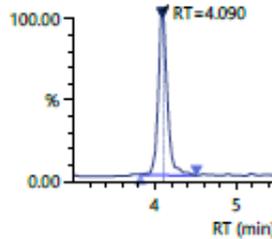
**D4-Homocystéine**

Conc 1.0000

Area 352100

ISTD 140.20>94.25 (+)

4.51e4



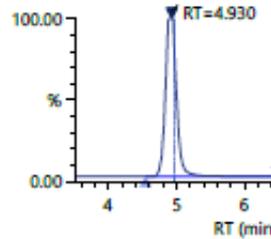
**Methionine**

Conc 98.8769

Area 13998514

Q 149.90>56.20 (+)

1.24e6



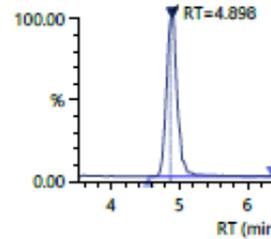
**D3 Méthionine**

Conc 1.0000

Area 495250

ISTD 153.30>56.25 (+)

4.41e4



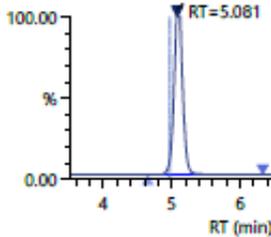
**GSH**

Conc 503.3211

Area 169593849

Q 308.00>179.10 (+)

1.86e7



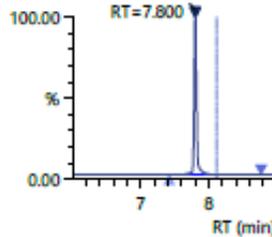
**SAH**

Conc 2.4827

Area 10101485

Q 384.80>134.15 (+)

3.79e6



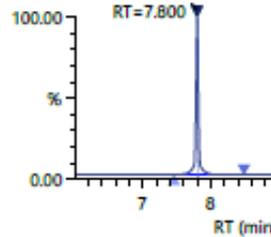
**D4-SAH**

Conc 1.0000

Area 417527

ISTD 388.80>136.25 (+)

1.44e5



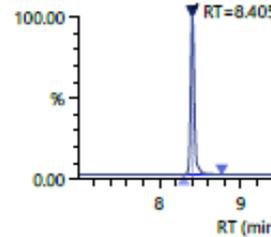
**Me-THF**

Conc 0.2502

Area 289232

Q 460.30>313.10 (+)

9.06e4



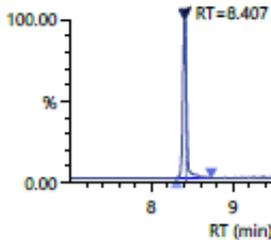
**C13 Me-THF**

Conc 1.0000

Area 77413

ISTD 465.30>313.15 (+)

2.48e4



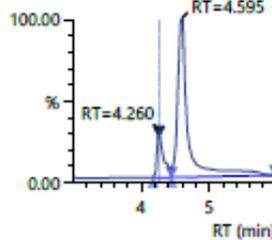
**DMG**

Conc 100.0964

Area 5822507

Q 104.30>58.20 (+)

2.98e6



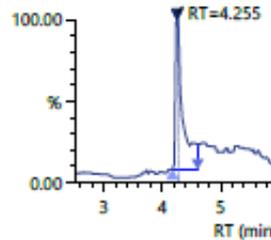
**D9-choline**

Conc 1.0000

Area 194652

ISTD 113.20>69.20 (+)

2.36e4



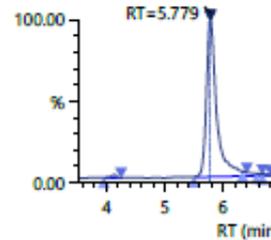
**D11-Bétaïne**

Conc 1.0000

Area 675182

ISTD 128.70>66.25 (+)

5.48e4



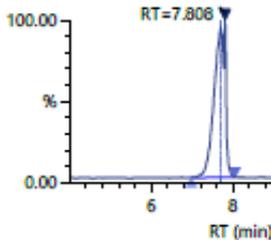
**Sérotonine**

Conc 9.7335

Area 1470392

Q 177.10>160.15 (+)

7.93e4



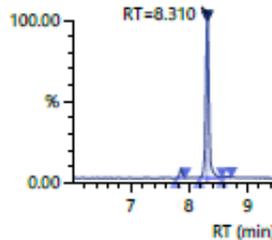
**Kynurenine**

Conc 10.0221

Area 505232

Q 209.10>191.95 (+)

1.29e5



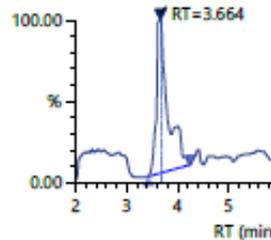
**D2 Cystéine**

Conc 1.0000

Area 1292550

ISTD 122.30>104.20 (+)

8.63e4



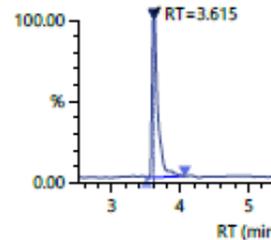
**D3 Sérine**

Conc 1.0000

Area 101841

ISTD 108.60>63.20 (+)

1.69e4



## Annexe n°6 : Nombre de séquences lues pour chaque échantillon lors de l'analyse Small RNA-Seq

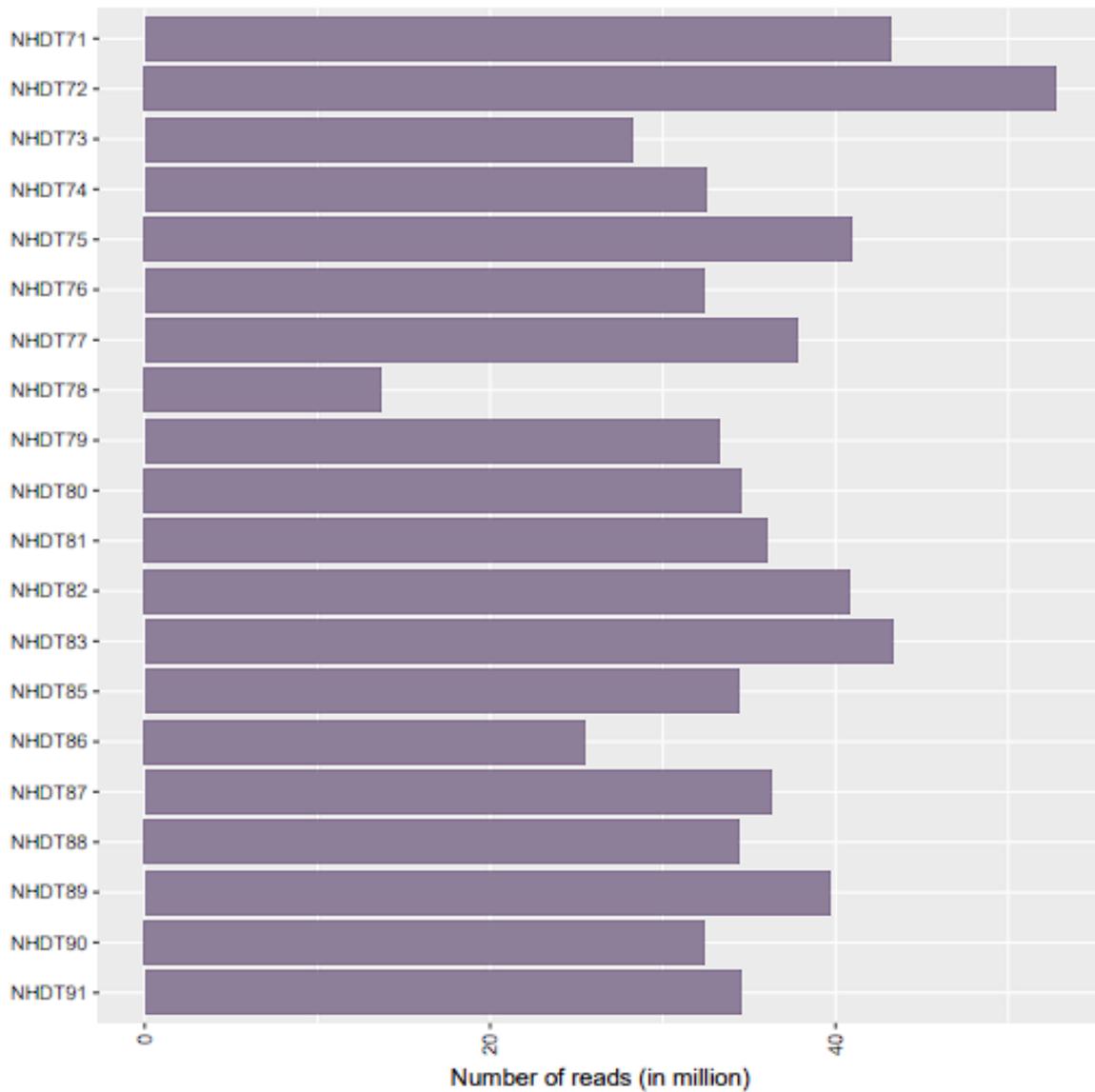


Figure 1: **Number of sequenced reads.** This barplot represents the total number of sequenced reads (in million).

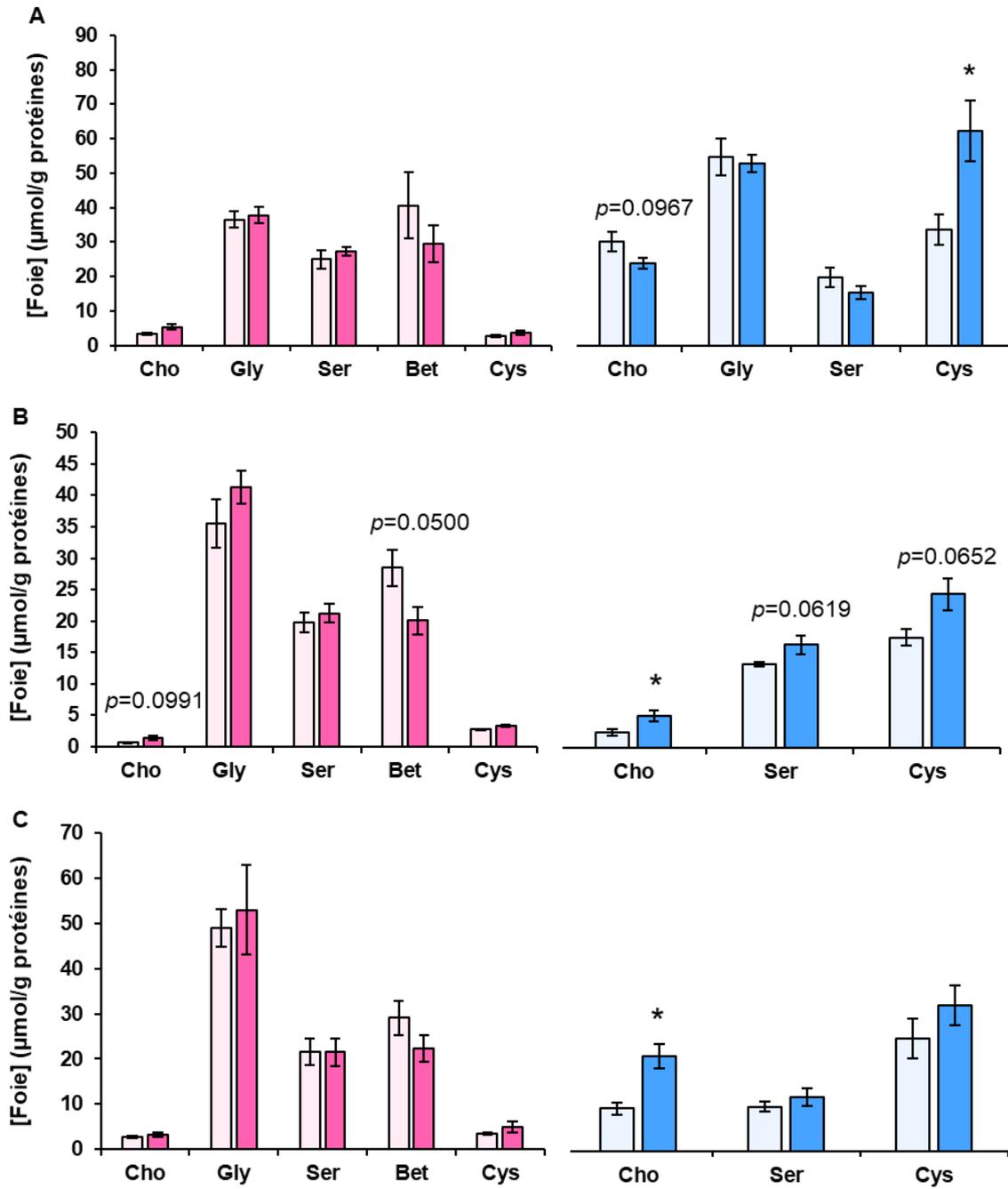
## Annexe n°7 : Données morphométriques des ratons

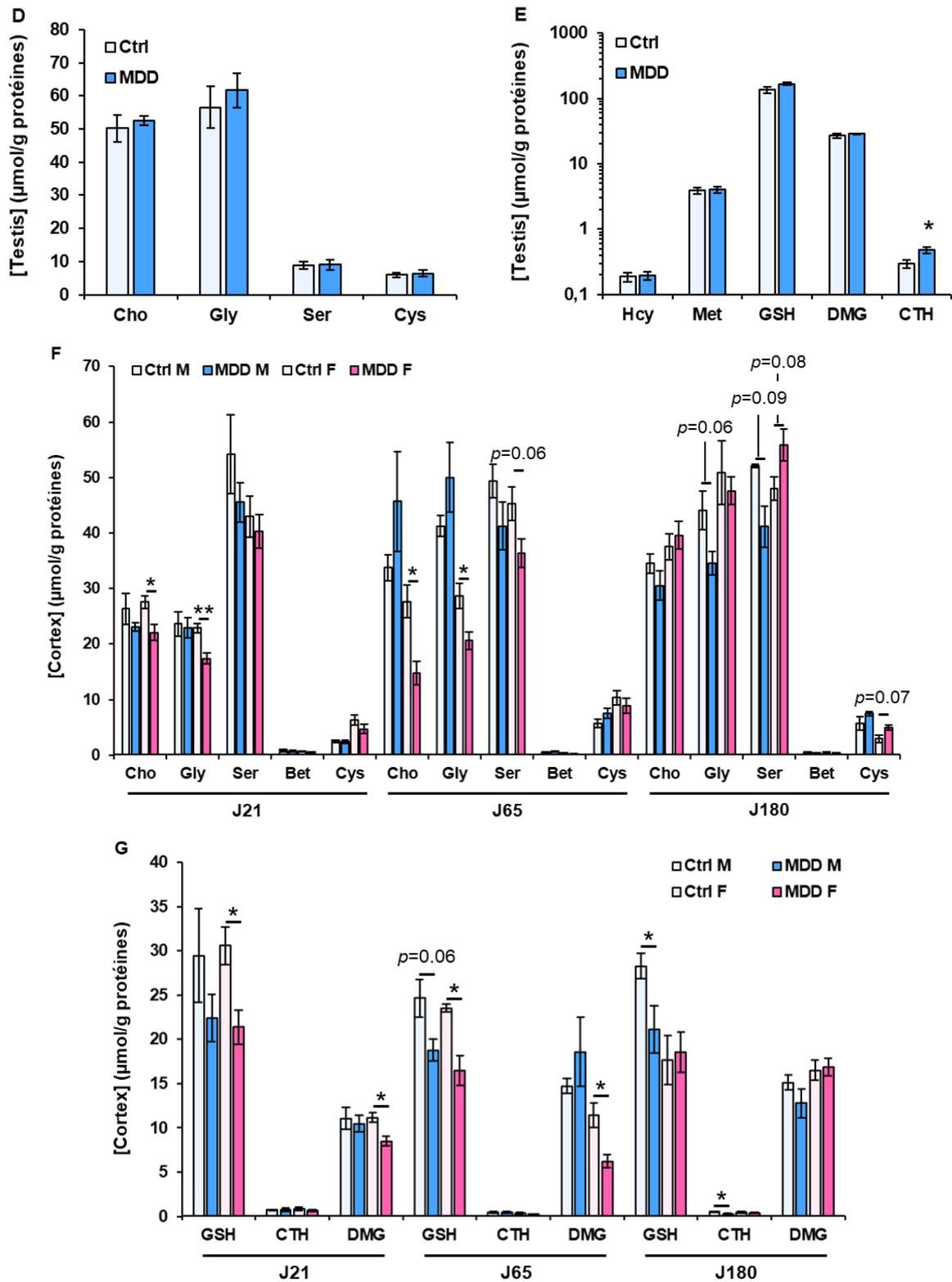
Âge	Groupe	Vésicule séminale (g)	Epididyme (g)	Distance anogénitale (mm)	Longueur de l'épididyme (mm)
<b>J21</b>	Ctrl M	0.01 ± 0.002	0.03 ± 0.004	15.2 ± 0.3	18.6 ± 0.4
	Ctrl F	-	-	8.4 ± 0.25	-
	MDD M	<b>0.02 ± 0.01<sup>a</sup></b>	0.03 ± 0.01	15 ± 0.3	18.3 ± 0.3
	MDD F	-	-	9 ± 0.7	-
<b>J65</b>	Ctrl M	0.3 ± 0.03	0.34 ± 0.04	36.2 ± 0.8	42.2 ± 1.15
	Ctrl F	-	-	13.3 ± 0.4	-
	MDD M	0.3 ± 0.01	0.37 ± 0.04	36.8 ± 0.8	40.9 ± 0.65
	MDD F	-	-	12.8 ± 0.35	-
<b>J180</b>	Ctrl M	0.92 ± 0.1	0.71 ± 0.01	45.2 ± 1.9	52.7 ± 1.8
	Ctrl F	-	-	14.7 ± 0.4	-
	MDD M	<b>0.7 ± 0.03<sup>▣</sup></b>	<b>0.64 ± 0.03<sup>▣</sup></b>	47.4 ± 1.9	50.9 ± 1.2
	MDD F	-	-	15.9 ± 0.7	-

a : différences significatives avec Ctrl M ; b : avec MDD M ; c : avec Ctrl F ; les valeurs correspondent à la moyenne ± S.E.M. ; N=5, n=5-10. Les graphiques représentent la moyenne ± SEM ;  $p < 0,05$  ;  $\square p = 0,06$ , *t*-test (poids et longueur de l'épididyme), Wilcoxon pour le poids de l'épididyme à J180, ANOVA 2 facteurs (distance, sexe) pour la distance anogénitale.

*Abréviations* : Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle

## Annexe n°8 : Dosage des intermédiaire du métabolisme des monocarbone





**Figure 55 : Mesure des intermédiaires du métabolisme des monocarbone chez la descendance.** Détermination de la concentration en métabolites dans les foies de la descendance (A) à J21 (B) à J65, (C) à J180. Les mêmes mesures ont été réalisées (D, E) dans les testicules des ratons à J65, ainsi que (F, G) dans les cortex de la descendance mâle et femelle, à J21, J65 et J180. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  : *t*-test.

**Abréviations :** Ctrl : régime standard ; MDD : régime carencé ; M : mâle ; F : femelle ; Cho : choline ; Gly : glycine ; Ser : sérine ; Bet : bêtaïne ; Cys : cystéine ; GSH : glutathion réduit ; CTH : cystathionine ; DMG : diméthylglycine

## Résumé

La carence gestationnelle en donneurs de méthyle est responsable d'anomalies de fermeture du tube neural et d'altérations du développement cérébral de la descendance, c'est pourquoi les femmes sont supplémentées en acide folique en période périconceptionnelle en prévention du *spina bifida*. Plus récemment, il est apparu que le mode d'alimentation et l'environnement du père influencent fortement le développement du fœtus et la santé de la descendance. Seules quelques publications portant sur les carences paternelles en folates ont mis en évidence des altérations de l'épigénome du sperme, en lien avec une altération du développement de la progéniture. Notre travail a consisté en la mise en place d'un modèle animal de carence en donneurs de méthyle d'origine paternelle. Parmi les résultats les plus marquants, nous avons pu mettre en évidence la présence des transporteurs des folates dans les testicules des rats dont l'expression était modifiée, ainsi que les variations des intermédiaires du métabolisme des monocarbones mesurés par LCMS/MS. L'analyse des paramètres de fertilité a montré une altération transgénérationnelle de la mobilité des spermatozoïdes, associée à une diminution du poids des testicules de la descendance et une augmentation de l'expression des enzymes clés de la stéroïdogénèse, jouant un rôle important dans la spermatogénèse. Le contenu en petits ARNs dans le sperme était également impacté, la plupart étant impliqué dans l'ischémie cérébrale, le maintien de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), mais aussi la différenciation des spermatogonies. Quant au cerveau des rats issus des pères carencés, l'altération de l'expression des transporteurs des folates et du gène *Cldn5* associés à une élévation de *S100b* et de *miR-126a-5p* suggèrent une atteinte de l'intégrité de la BHE. Ces modifications n'étaient observées que chez les femelles, suggérant un effet sexe-dépendant de la carence paternelle sur la descendance. L'ensemble de ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le régime alimentaire du père joue un rôle déterminant en période de conception et pourrait conduire à de nouvelles recommandations nutritionnelles s'adressant aux futurs pères.

*Mots-clés* : carence paternelle ; donneurs de méthyle ; épigénétique ; développement cérébral

---

## Abstract

Gestational methyl donor deficiency is responsible for neural tube defects and altered brain development in the offspring, that's why women are supplemented with folic acid in the periconceptional period to prevent *spina bifida*. More recently, it has become apparent that father's diet and environment strongly influence the fetus development and health of the offspring. Only a few publications on paternal folate deficiency have highlighted alterations in the sperm epigenome, which are associated with altered offspring development. Our work consisted in the establishment of an animal model of paternal methyl donor deficiency. Among the most striking results, we were able to demonstrate the presence of folate transporters in the testes of the pups whose expression was modified, as well as the variations of the intermediates of the onecarbon metabolism measured by LCMS/MS. Analysis of fertility parameters showed a transgenerational alteration of sperm motility, associated with a decrease testis weight and an increase in the expression of key steroidogenesis enzymes, playing an important role in spermatogenesis, in the progeny. The content of small RNAs in the sperm was also affected, most of them being involved in cerebral ischemia, maintenance of blood-brain barrier (BBB) permeability, but also spermatogonial differentiation. In deficient fathers' pups' brains, altered expression of folate transporters and the *Cldn5* gene associated with elevated *S100b* and *miR-126a-5p* suggest impairment of BBB integrity. These changes were only observed in females, suggesting a sex-dependent effect of paternal deficiency on offspring. All these results support the hypothesis that father's diet plays a determining role during conception and could lead to new nutritional recommendations for future fathers.

*Keywords*: paternal deficiency; methyl donors; epigenetic; cerebral development