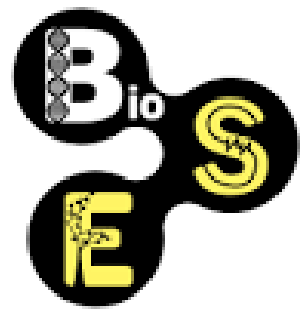


# Carence précoce en donneurs de méthyles dans le cervelet : Mécanismes moléculaires et épigénétiques

par Jérémie WILLEKENS

Travaux dirigés par : Pr. B. Leininger-Muller  
Dr. N. Dreumont

34<sup>èmes</sup> Journées Pédagogiques et Scientifiques de l'AE2BM  
Rouen, Septembre 2018



ECOLE DOCTORALE BioSE  
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT  
ED 266



**Inserm**



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



nutrition-génétique et exposition  
aux risques environnementaux

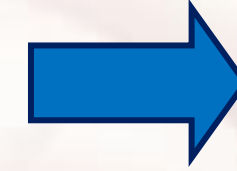
**INTRODUCTION**

# **Effets d'une carence précoce en donneurs de groupements méthyles sur le développement et modèle MDD**

# INTRODUCTION

## CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- Carence précoce en donneurs de méthyles  
(Vitamines B9 + B12)



Retards de croissance *in utero*  
Anomalies de fermeture du tube neural (**DFTN**)

(Herrmann, 2001 ; Clin. Chem. Lab)

- ❖ Cause majeure d'**anémie** dont souffrent **30 %**  
des femmes enceintes



Selon l'OMS 120/194 pays n'ont pas  
d'informations sur la prévalence des DFTN

Océanie : **0,69** pour 1000

Europe : 0,9 pour 1000

Amérique : 1,15 pour 1000

Afrique : 1,17 pour 1000 naissances

Asie du S-E : 1,58 pour 1000

Moyen Orient : **2,19** pour 1000

(Zaganjor, 2016 ; PLoS One)



**Enjeu majeur de santé publique**

- Cobalamines :
  - ❖ AJR : 2,5 µg en Europe et 6 µg aux USA

- Folates :
  - ❖ AJR : 0,5 mg par jour

- ❖ En Europe, **supplémentation** systématique des femmes en période  
**période périconceptionnelle.**



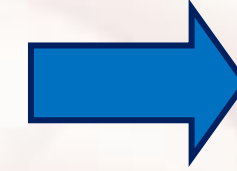
**Diminution de 58 % des DFTN**

(Czeizel, 1992 ; N Engl J Med)

# INTRODUCTION

## CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- Carence précoce en donneurs de méthyles  
 (Vitamines B9 + B12)

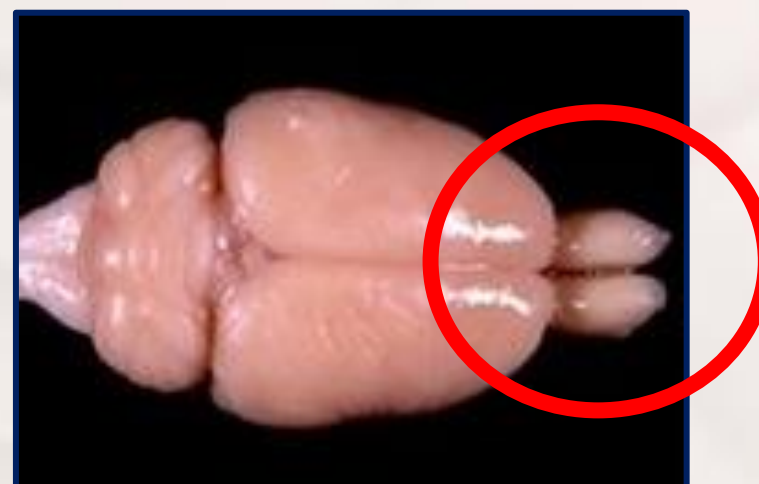


Retards de croissance *in utero*  
 Anomalies de fermeture du tube neural (**DFTN**)

*(Herrmann, 2001 ; Clin. Chem. Lab)*



- Atteintes **système nerveux central** :
  - Accumulation **homocystéine** tissulaire *(Blaise et al., 2007 ; Am J Pathol)*
  - Défauts **neurogenèse** *(Iskandar et al., 2010 ; JCI) (Pourié et al., 2015 ; FASEB)*
  - Altérations **comportementales** :



### Hippocampe :

- Cognition
- Apprentissage

*(Blaise et al., Am J Pathol.,2007)*

### Bulbes Olfactifs:

- Discrimination olfactive

*(El hajj chehadeh et al., Br J Nutr. 2013)*

### Cervelet:

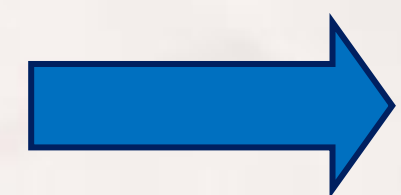
- Posture
- Motricité / Locomotion

*(Blaise et al., Am J Pathol.,2007)*

## INTRODUCTION

### LE CERVELET

- Développement **pré** et **post-natal**
- Particulièrement sensible à la **carence précoce en donneurs de méthyles**
  - Défauts de coordination de la locomotion à J<sub>21</sub> *(Pourié, 2015 ; FASEB Journal)*
  - Accumulation **homocystéine** tissulaire chez les femelles *(El Hajj Chehadeh et al., 2014, ajpendo)*
  - Altération de la **neurogenèse** chez les femelles *(Pourié, 2015 ; FASEB Journal)*
  - Défauts de **neurostéroïdogénèse** dans les cellules de Purkinje chez les femelles *(El Hajj Chehadeh et al., 2014, ajpendo)*



**Effets sexe-dépendants de la carence précoce en donneurs de méthyles**



**Carence délétère au niveau **cérébral** et encore **plus** chez les ♀**

## INTRODUCTION

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE

- Les **mécanismes moléculaires** impliqués dans la réponse à la carence restent **incompris**
- Dérégulations **épigénétiques** :
  - **Hypométhylation** globale de l'ADN dans le cerveau  
*(Kerek et al., 2013 ; Cell Death Dis.) (El Hajj Chehadeh et al., 2014 ; Br. J. Nutr.)*
  - **Modifications** des marques **histones**  
*(Pellanda et al., 2012 Mol Nutr Food Res.)*
  - Implication des **miARNs**  
*(Kerek et al., 2013 ; Cell Death Dis.)*



**La compréhension de la réponse à la carence passe par l'étude de ses effets moléculaires**

# INTRODUCTION

## DESIGN DE L'EXPERIENCE

Modèle **MDD** (*Methyl Donor Deficiency*)

↳ Modèle de carence **précoce** en **donneurs de groupements méthyles**

Déprivation en vitamines B9 et B12

Gestation

Allaitement

Reproduction

J<sub>-30</sub>

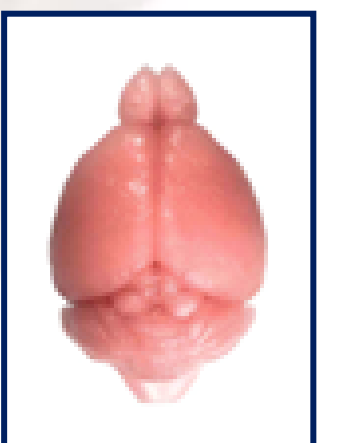
Naissance

J<sub>0</sub>

Sevrage

J<sub>21</sub>

Récupération des cervelets



## DECRIRE LES MECANISMES MOLECULAIRES MIS EN JEU DANS LA REPONSE A LA CARENCE PRECOCE EN DONNEURS DE METHYLES

- Etude du **transcriptome** du cervelet de rats MDD à J<sub>21</sub>
  - ↳ Gènes, **fonctions** et **voies de signalisation** dérégulés en réponse à la carence
- Etude des mécanismes **épigénétiques** et **épigénomiques** dans le cervelet des rats MDD à J<sub>21</sub>
  - ↳ **miRnome** du cervelet des rats MDD par rapport aux contrôles
  - ↳ Modifications des **marques histones** + **enzymes de modification** de la **structure de la chromatine**



**RESULTATS 1ere partie**

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

# RÉSULTATS



## TRANSCRIPTOMIQUE



- Uniquement **femelles**



**Car plus touchées par la carence que mâles**

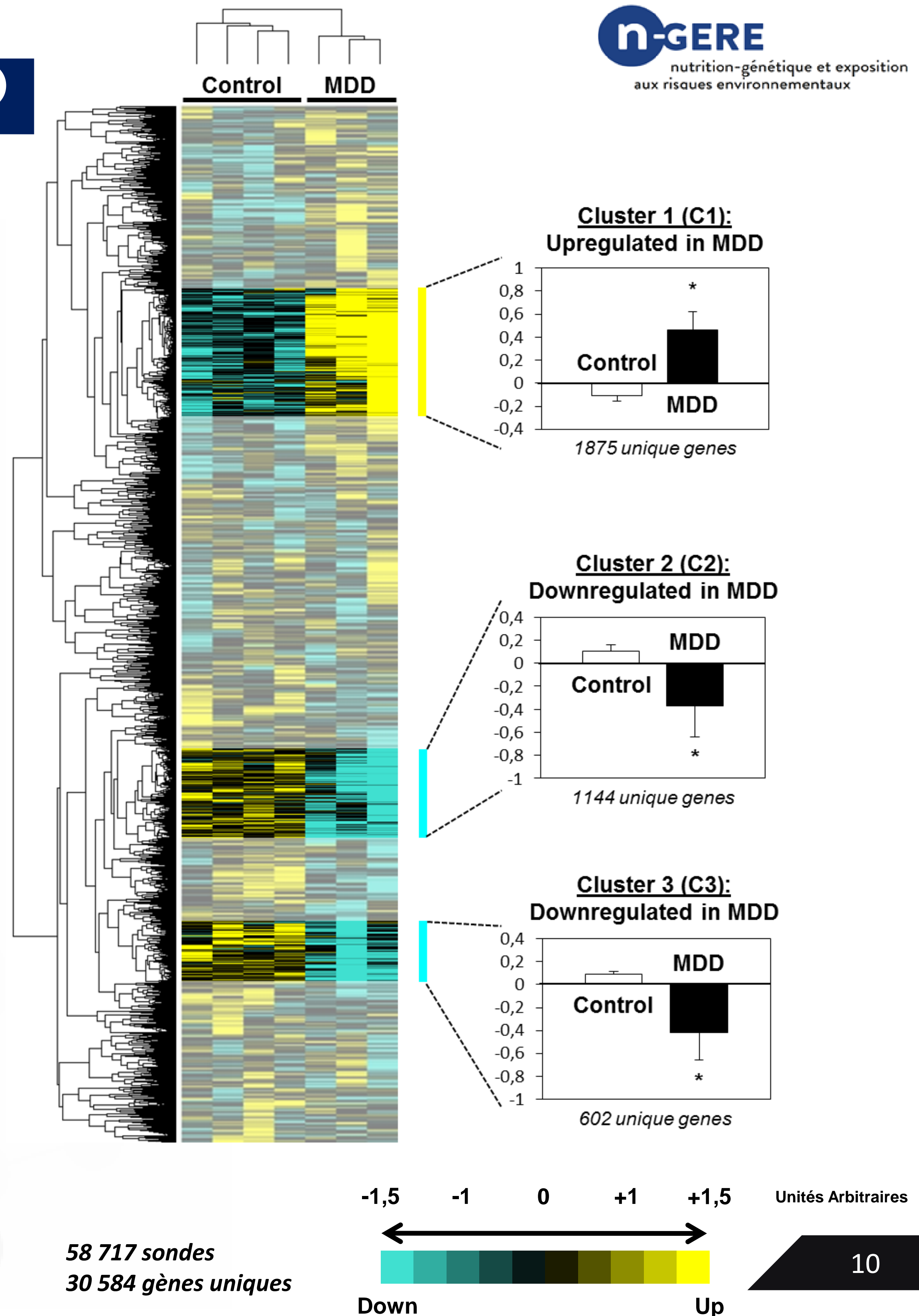
- Cervelet

• J<sub>21</sub>



**Dernier jour de formation  
cervelet**

*(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)*

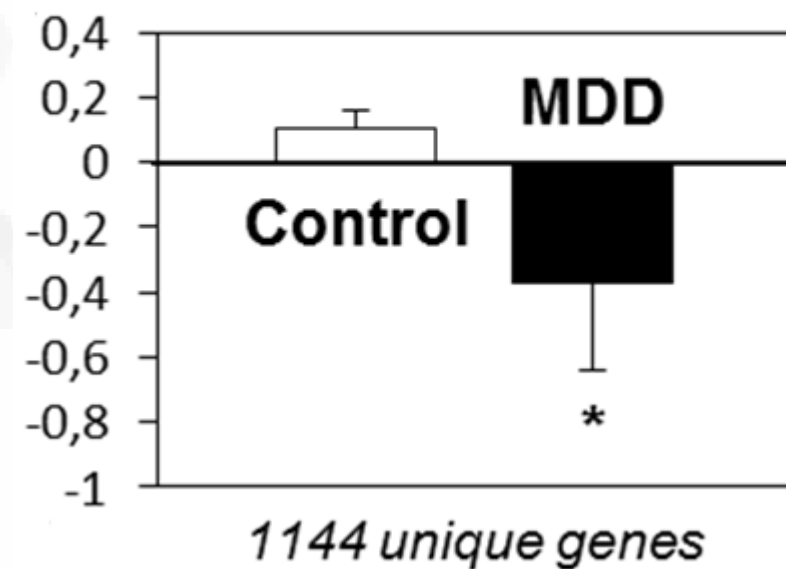




## TRANSCRIPTOMIQUE : CLUSTER 2



**Signature 2:**  
Downregulated in MDD



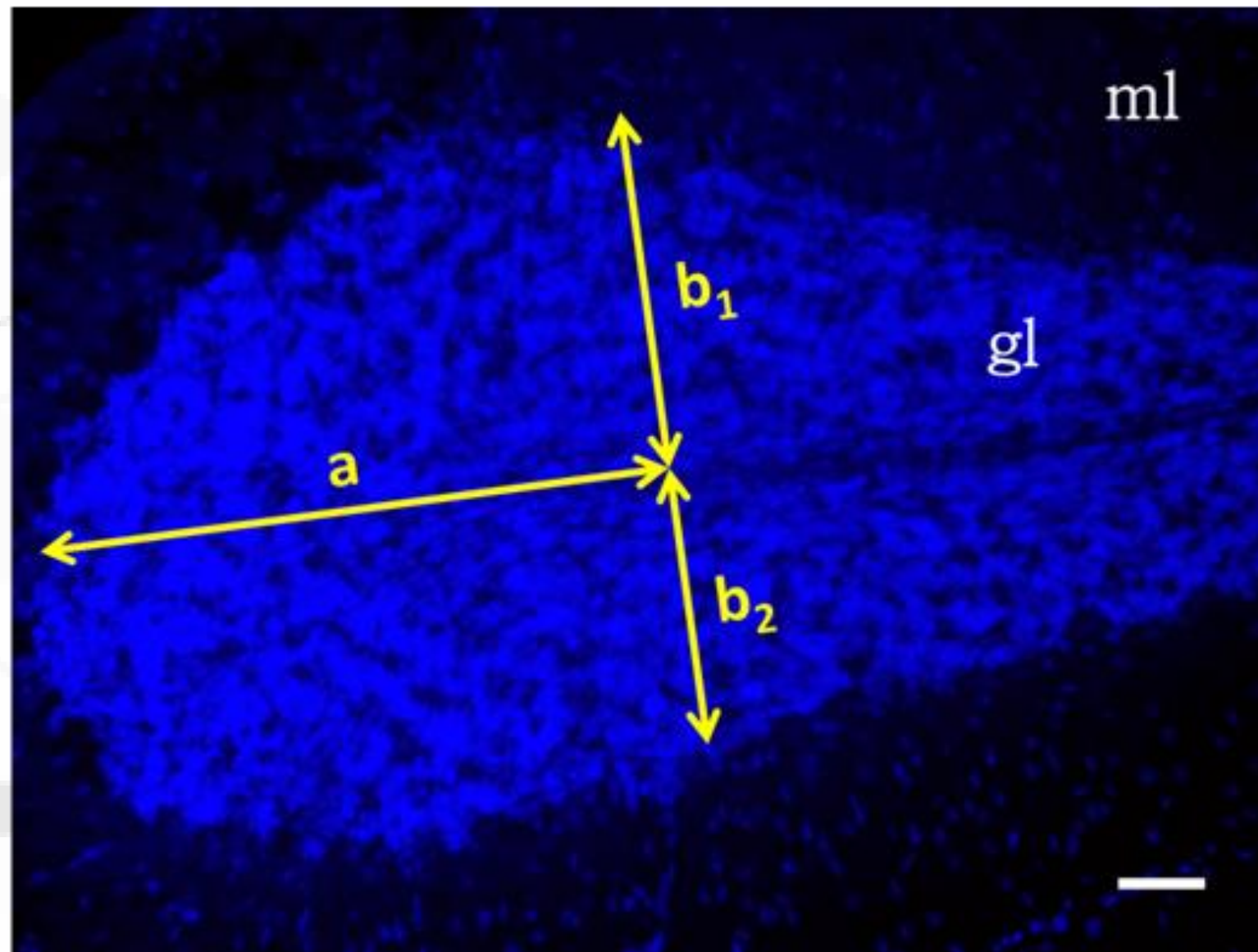
**Gènes sous-exprimés**

(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)

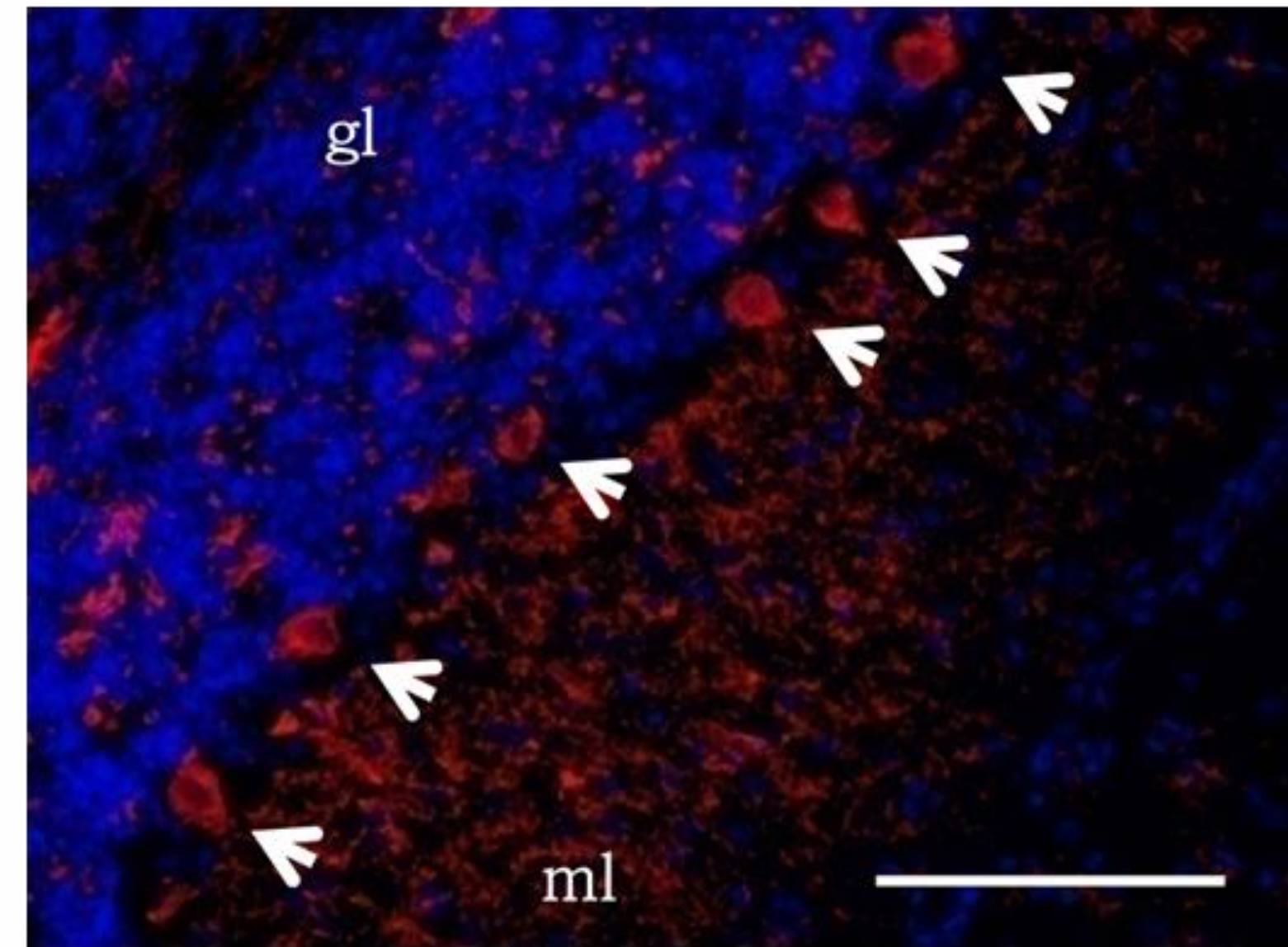
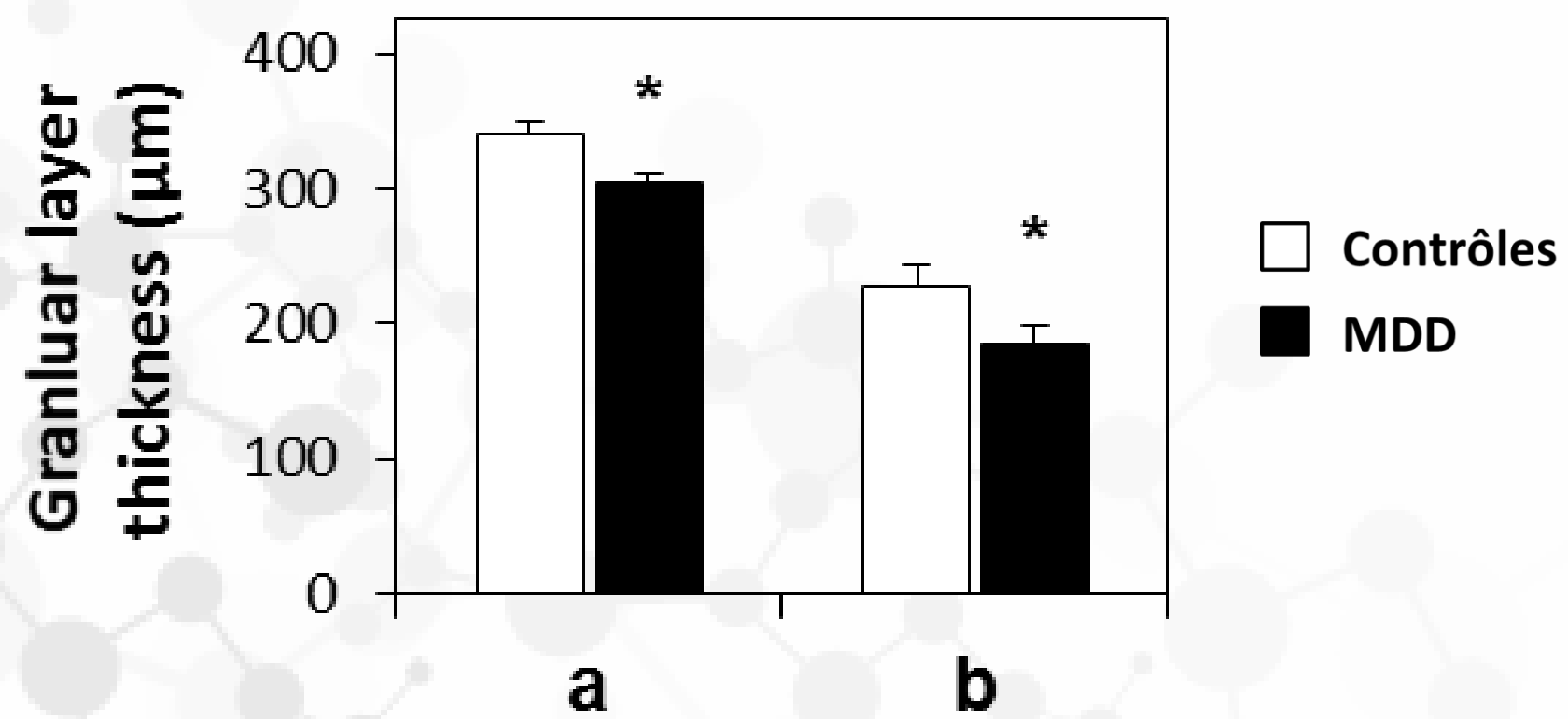
GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
1904861	9	6	8,505	0	3,00E-04	excitatory synapse assembly
97470	9	6	8,505	0	3,00E-04	ribbon synapse
90129	8	5	7,974	1,00E-04	0,0019	positive regulation of synapse maturation
97119	10	6	7,655	0	9,00E-04	postsynaptic density protein 95 clustering
32239	11	6	6,959	1,00E-04	0,0011	regulation of nucleobase-containing compound transport
70571	12	6	6,379	1,00E-04	0,0019	negative regulation of neuron projection regeneration
21683	15	7	5,954	1,00E-04	0,0011	cerebellar granular layer morphogenesis
32452	18	8	5,670	0	7,00E-04	histone demethylase activity
21692	19	8	5,372	0	8,00E-04	cerebellar Purkinje cell layer morphogenesis
70076	17	7	5,253	2,00E-04	0,0019	histone lysine demethylation
21681	17	7	5,253	2,00E-04	0,0019	cerebellar granular layer development
21697	29	11	4,839	0	3,00E-04	cerebellar cortex formation
21533	30	11	4,678	0	3,00E-04	cell differentiation in hindbrain
1105	33	12	4,639	0	4,00E-04	RNA polymerase II transcription coactivator activity
35371	22	8	4,639	2,00E-04	0,002	microtubule plus-end
21587	46	16	4,438	0	0	cerebellum morphogenesis
98815	33	11	4,253	0	7,00E-04	modulation of excitatory postsynaptic potential
21575	54	16	3,780	0	0	hindbrain morphogenesis
35176	52	15	3,680	0	3,00E-04	social behavior
2000171	35	10	3,645	3,00E-04	0,0045	negative regulation of dendrite development
45773	46	12	3,328	2,00E-04	0,002	positive regulation of axon extension
60079	59	15	3,244	0	7,00E-04	excitatory postsynaptic potential
99565	69	16	2,958	1,00E-04	0,0011	chemical synaptic transmission, postsynaptic
60078	70	16	2,916	1,00E-04	0,0013	regulation of postsynaptic membrane potential
35249	68	15	2,814	2,00E-04	0,0031	synaptic transmission, glutamatergic
21549	126	27	2,734	0	0	cerebellum development



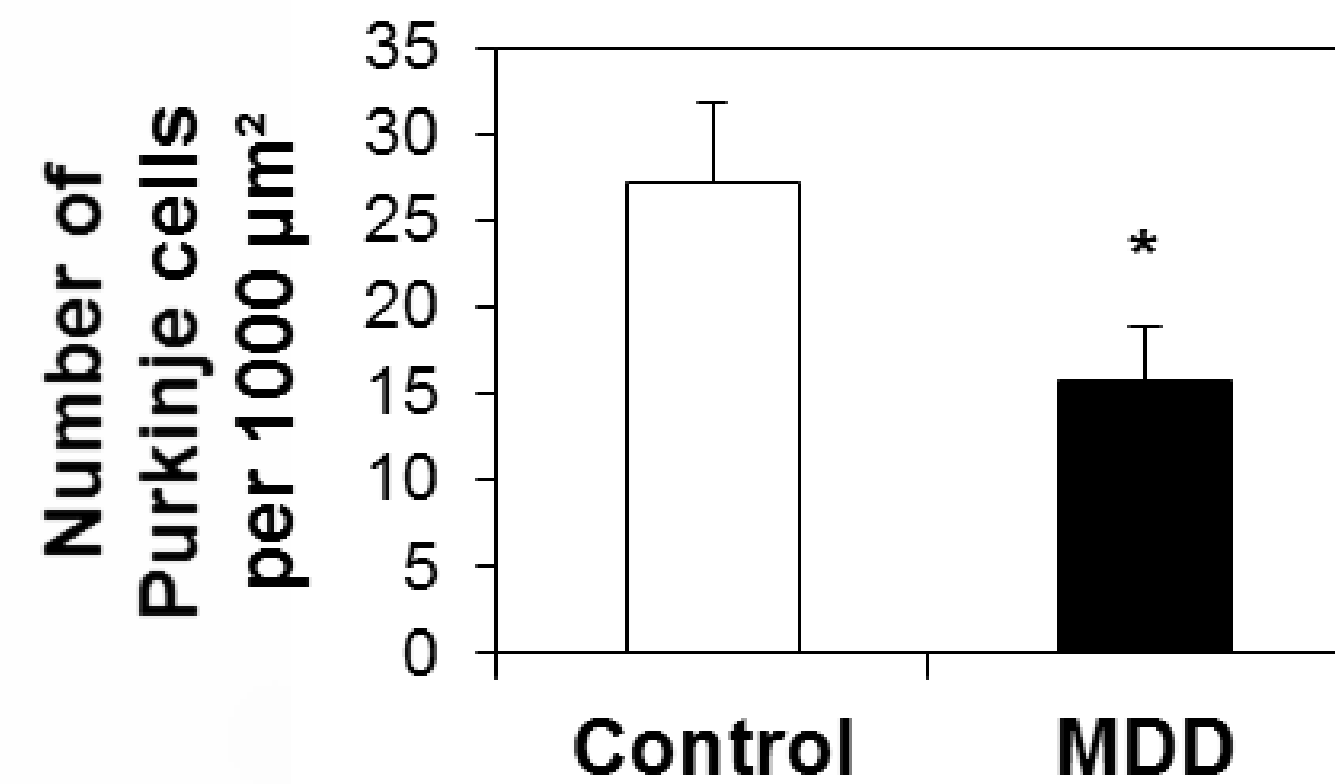
## STRUCTURE CERVELET



*N = 3 per group, \* p ≤ 0,05*



*N = 5 per group, \* p ≤ 0,05*



*(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)*

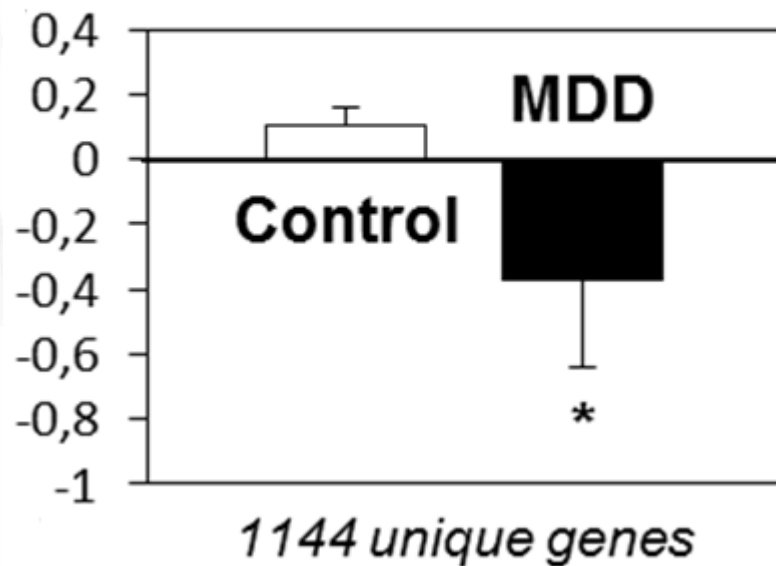
➔ **La structure du cervelet est altérée chez les femelles MDD**



## TRANSCRIPTOMIQUE : CLUSTER 2



**Signature 2:**  
Downregulated in MDD



GO ID	Total	Change	Enrichment	P-Value	FDR	Term
51899	75	16	2,722	2,00E-04	0,0029	membrane depolarization
7269	129	27	2,670	0	0	neurotransmitter secretion
99531	135	28	2,646	0	0	presynaptic process involved in chemical synaptic transmission
60076	193	40	2,644	0	0	excitatory synapse
14069	175	36	2,624	0	0	postsynaptic density
1505	171	35	2,611	0	0	regulation of neurotransmitter levels
99572	176	36	2,610	0	0	postsynaptic specialization
97060	147	30	2,604	0	0	synaptic membrane
50773	148	28	2,414	0	3,00E-04	regulation of dendrite development
7626	269	44	2,087	0	0	locomotory behavior
16358	273	44	2,056	0	4,00E-04	dendrite development
45666	350	56	2,041	0	0	positive regulation of neuron differentiation
43087	193	30	1,983	2,00E-04	0,0032	regulation of GTPase activity
16055	415	53	1,629	3,00E-04	0,0047	Wnt signaling pathway

**Gènes sous-exprimés**

*(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)*

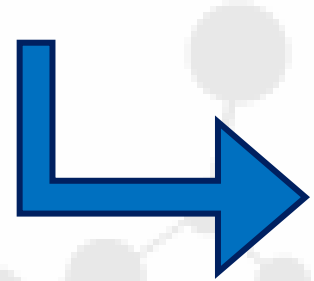
**RESULTATS 2<sup>ème</sup> partie**

**Diminution d'activation des voies de  
signalisation dépendantes des ligands  
wnt chez les femelles MDD**

# RÉSULTATS

## LE CERVELET

- Développement **pré** et **post-natal**

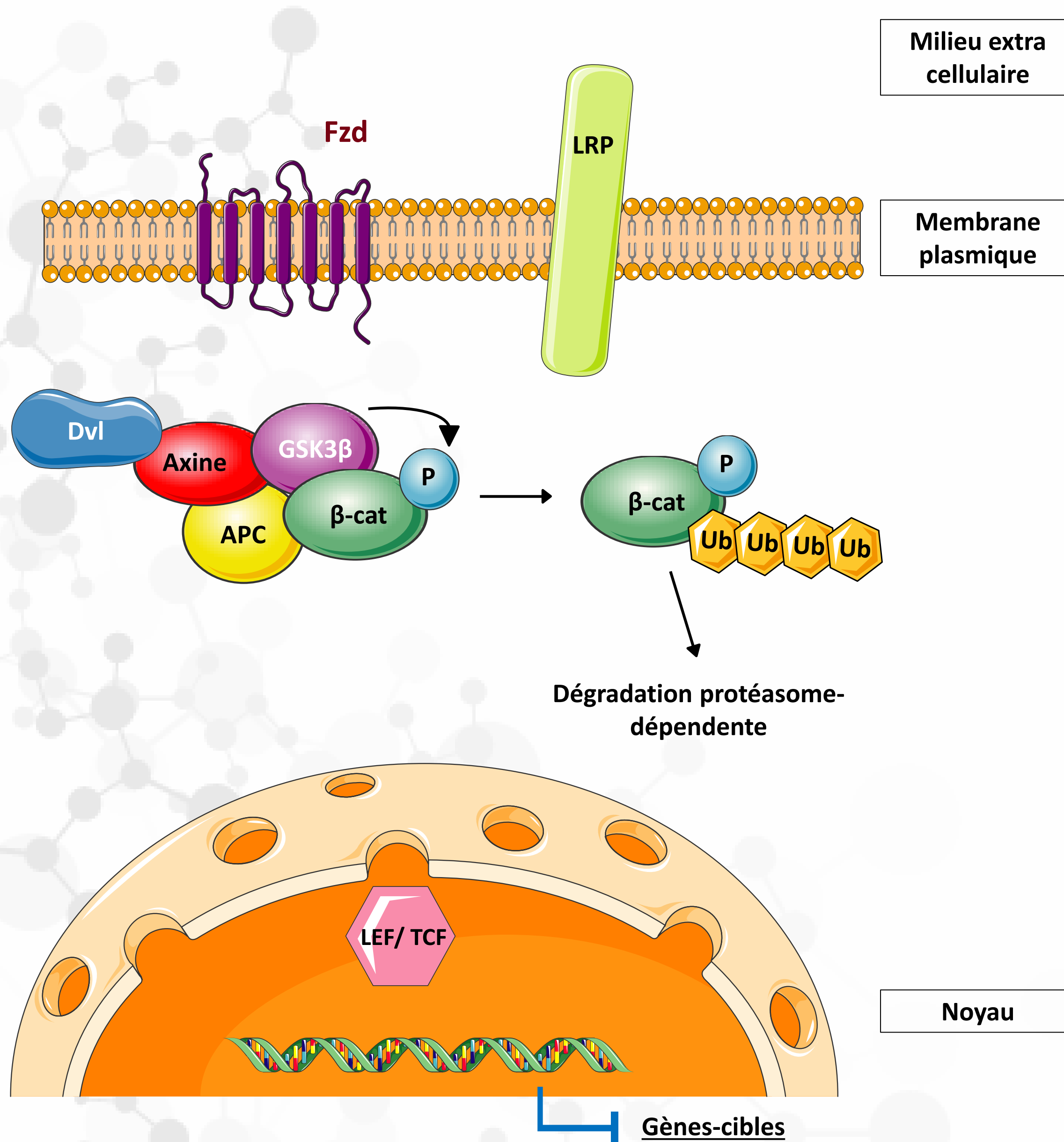


Implication des **voies Wnt**

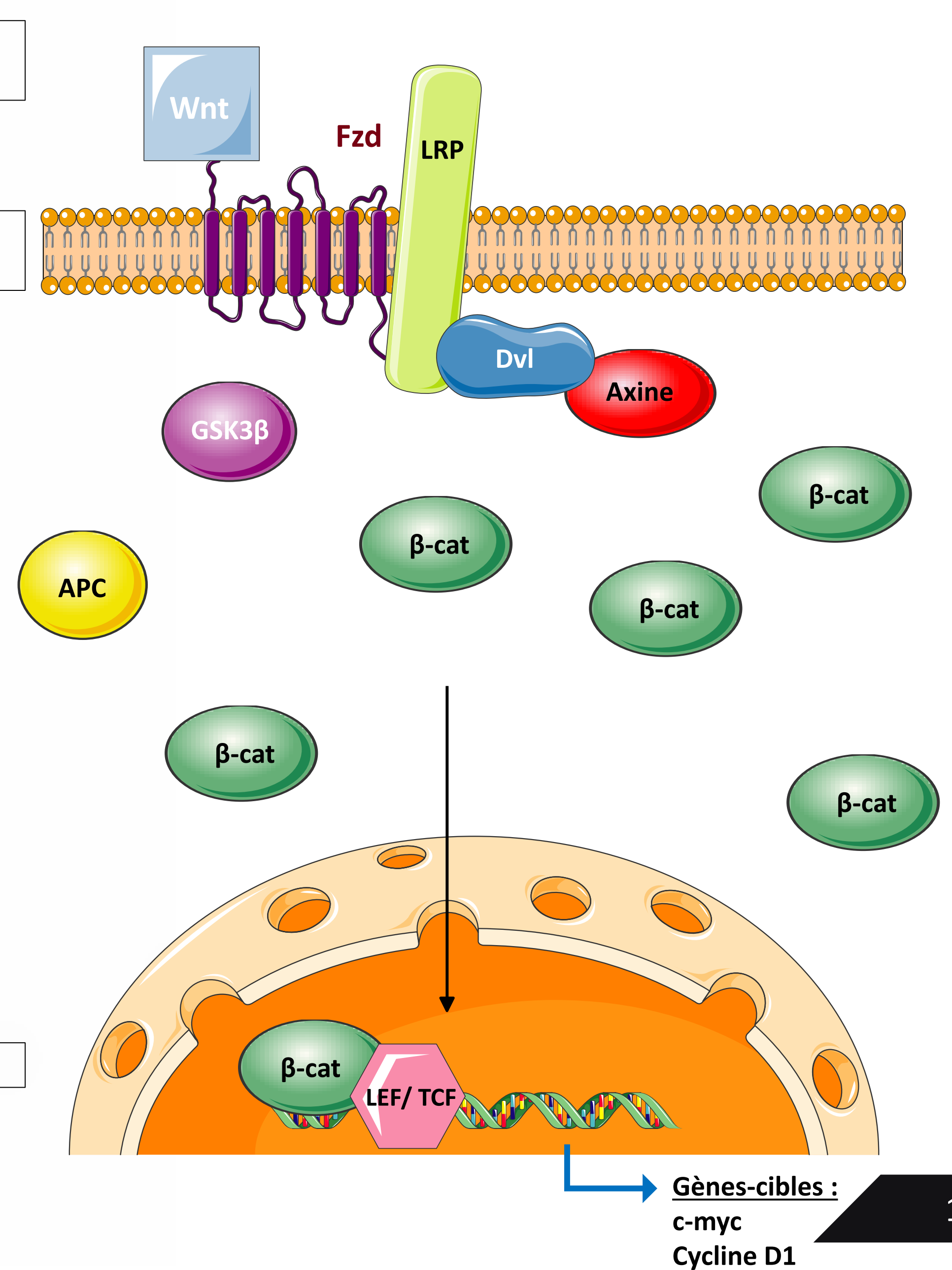


Rôles **structure / développement** du cervelet  
**Fonction synaptique** (adulte)

a) Absence de ligand



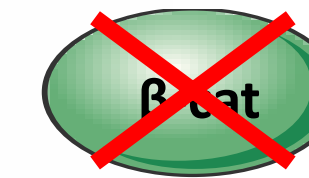
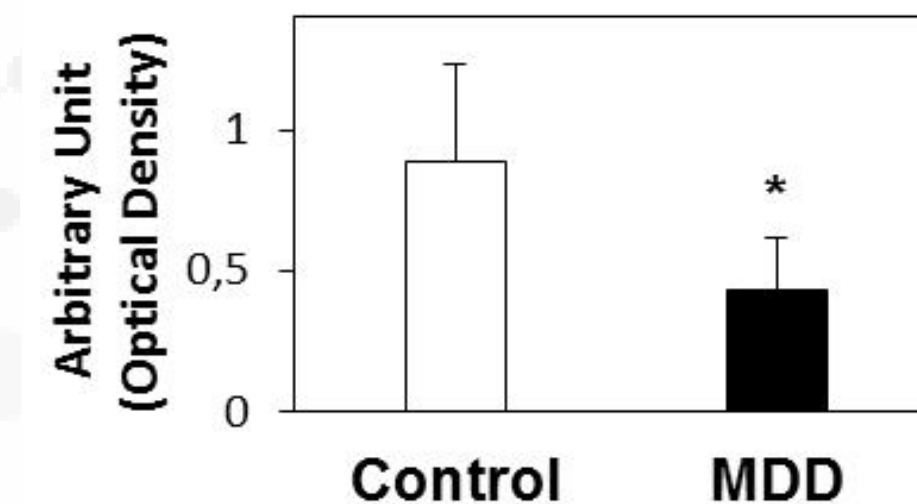
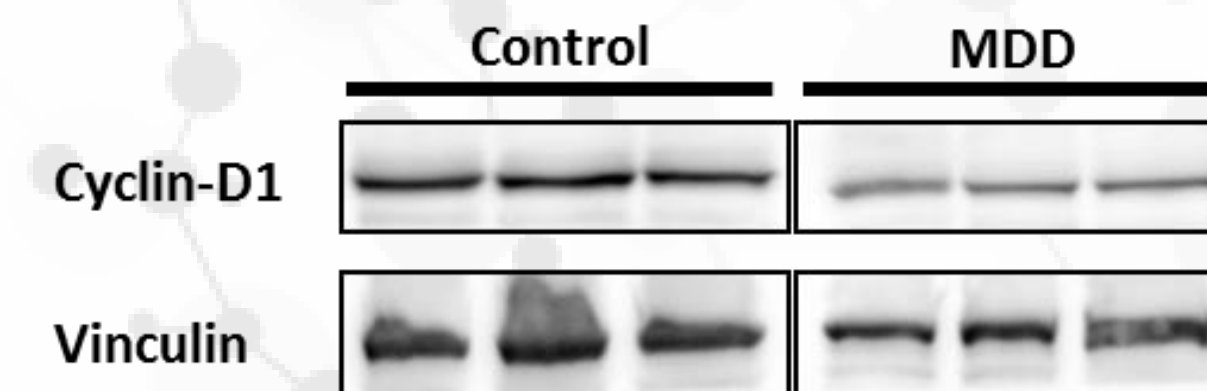
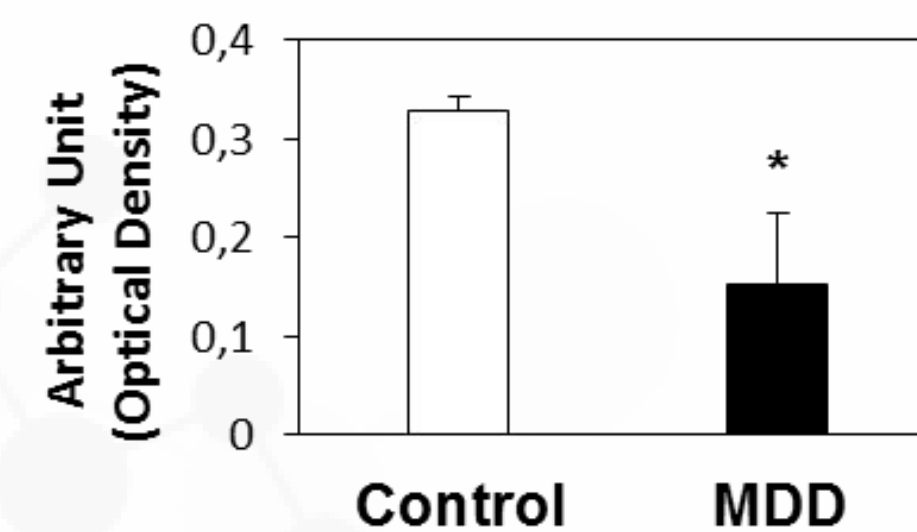
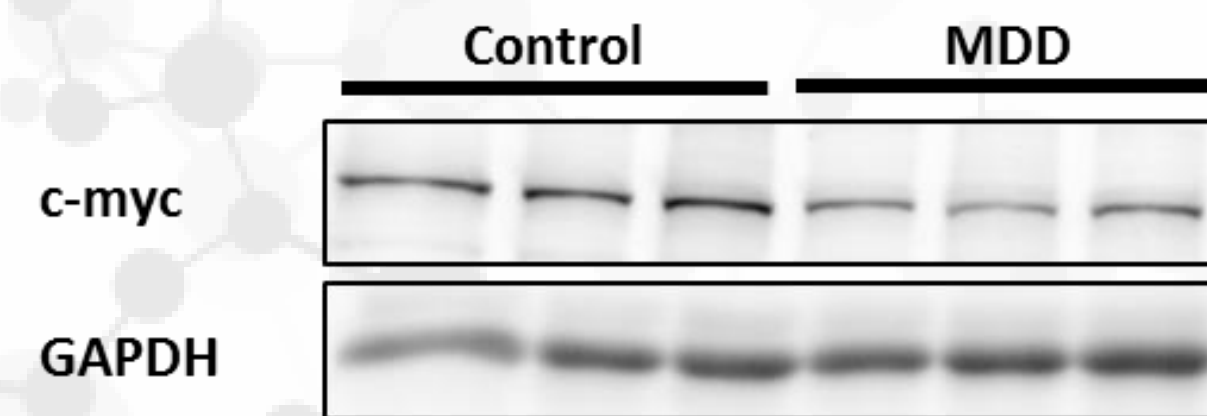
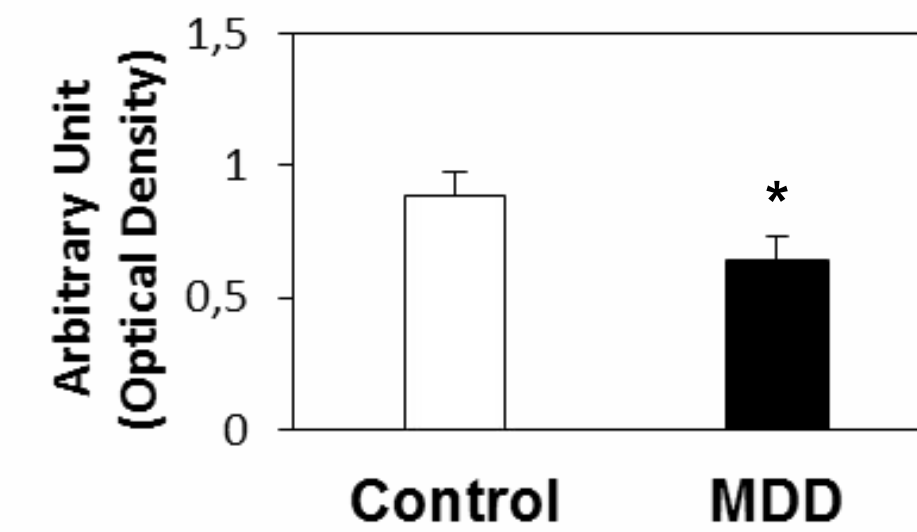
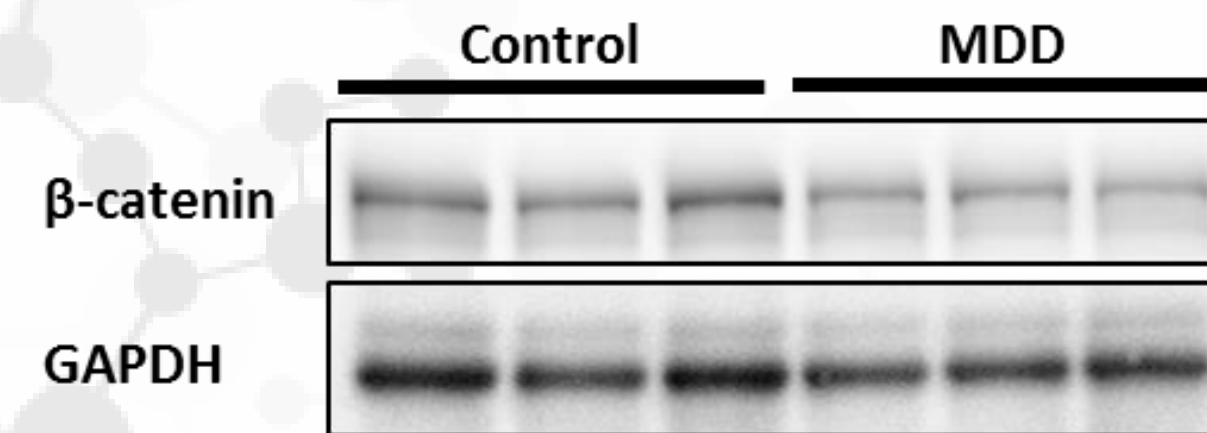
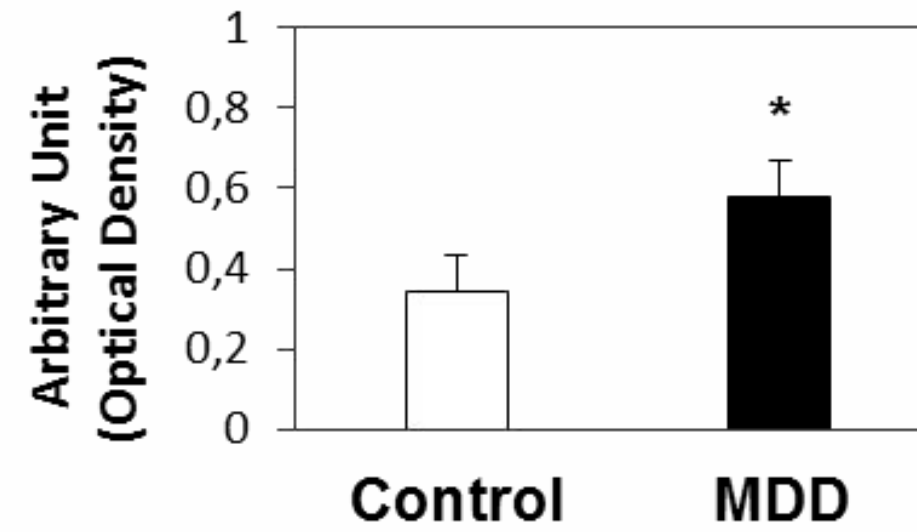
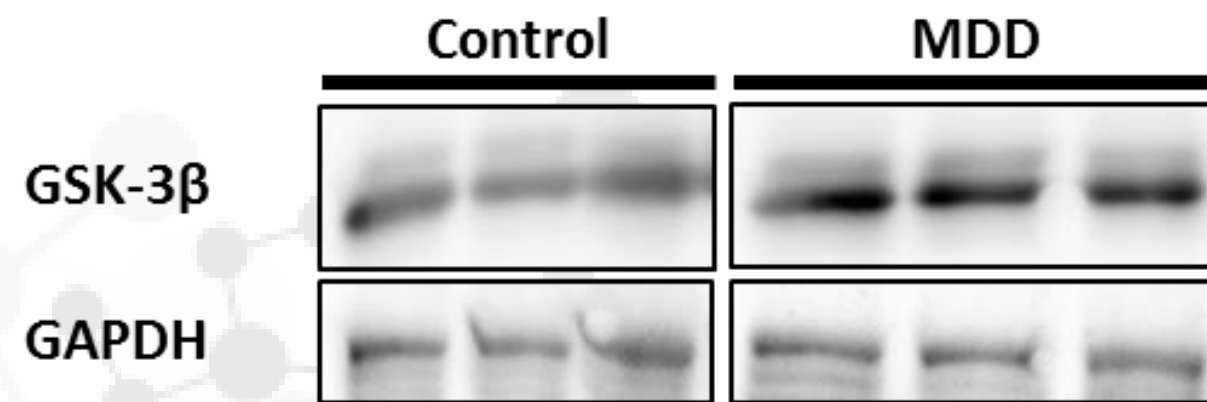
b) Fixation du ligand







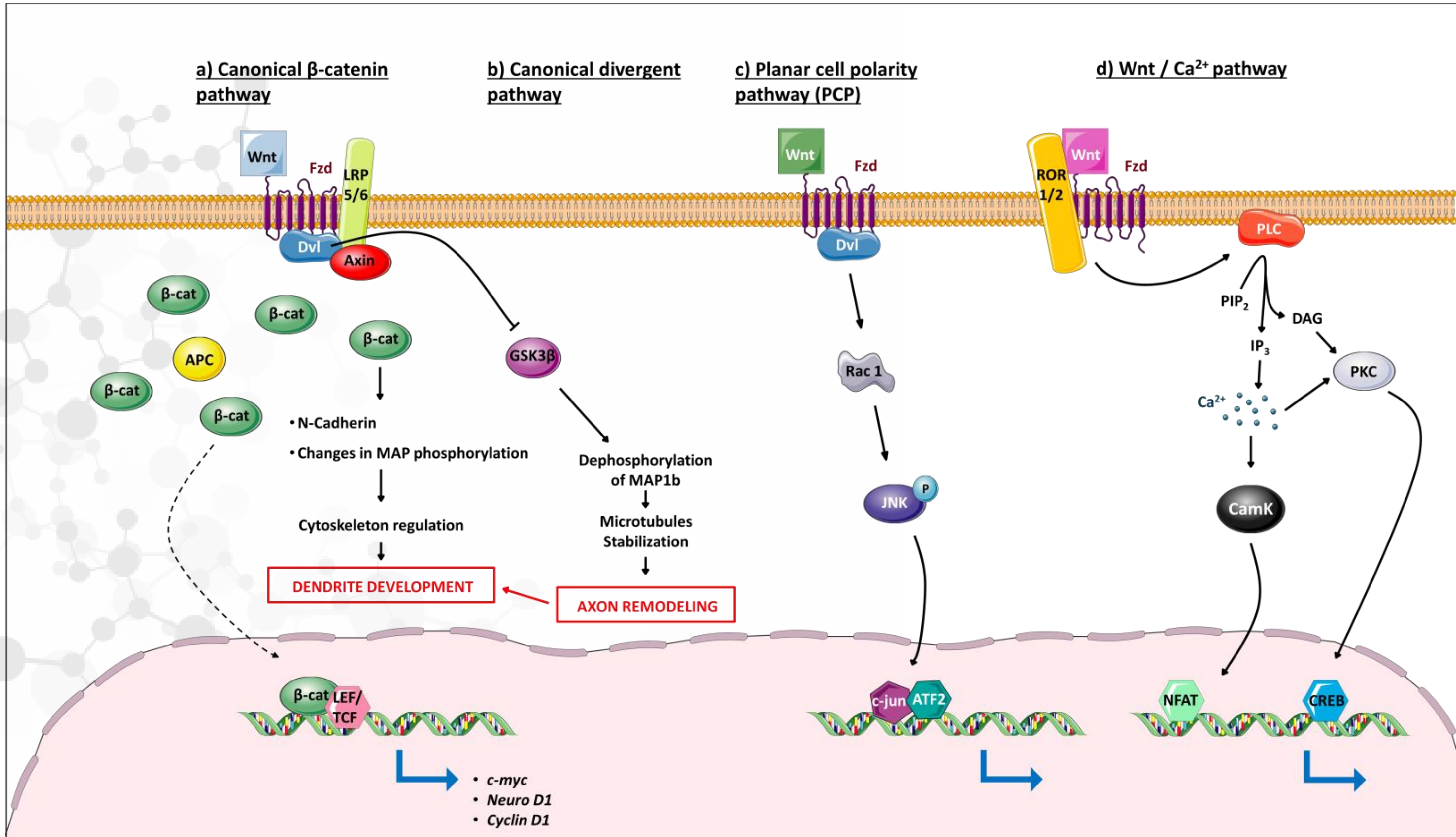
## VOIE WNT CANONIQUE



L'activation de la voie wnt canonique est diminuée chez les femelles MDD

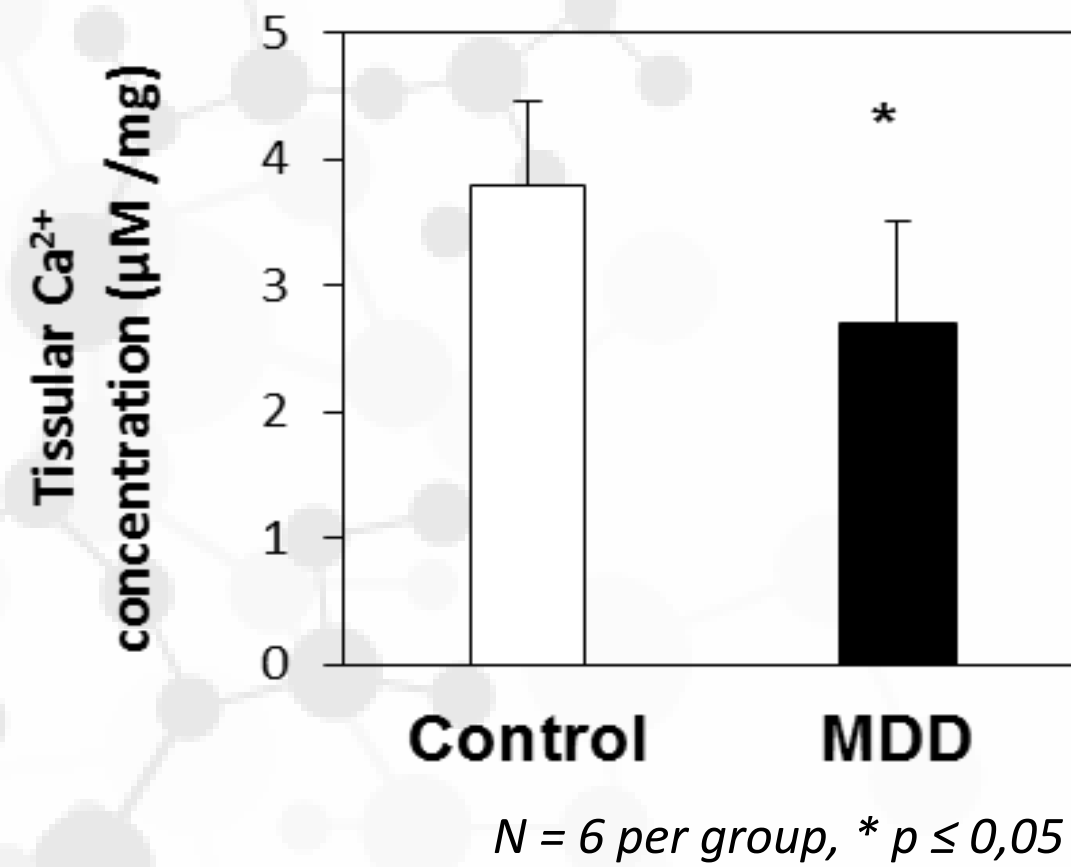
(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)

N = 3 per group, \* p ≤ 0,05

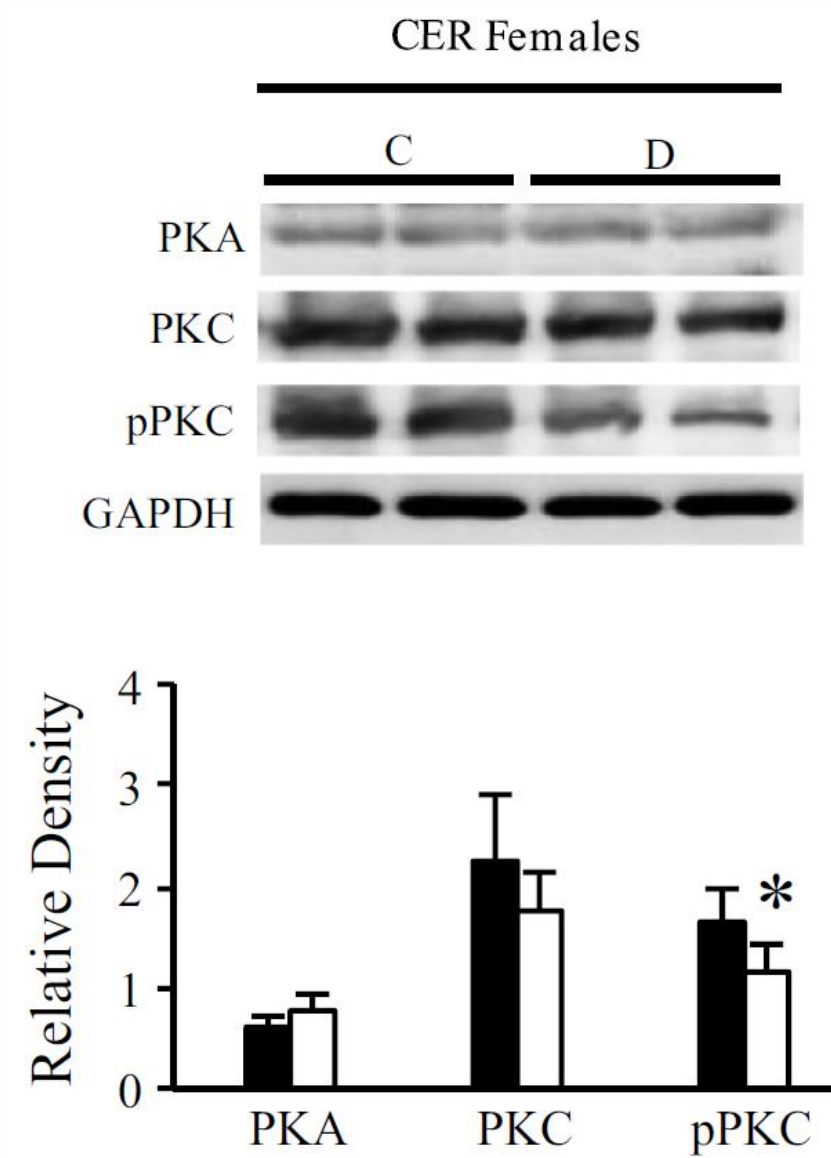




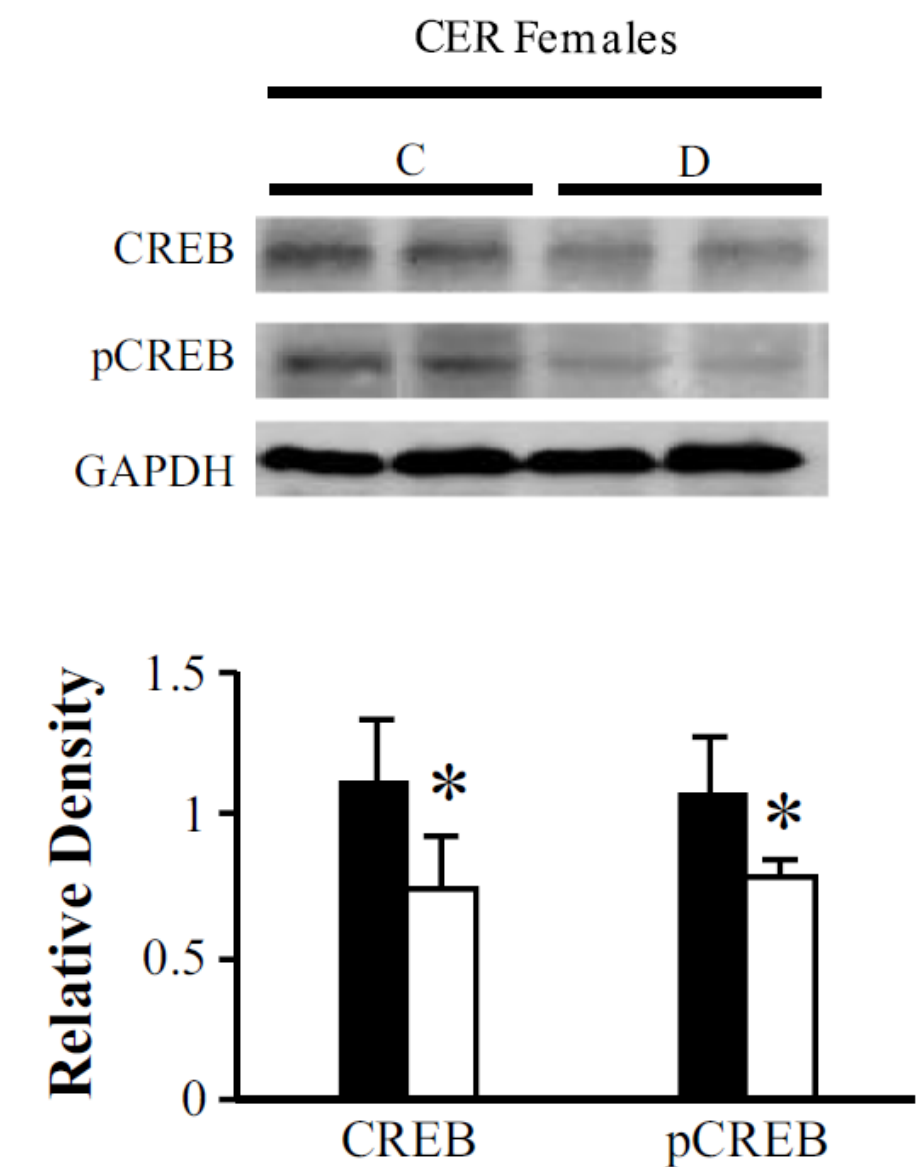
## VOIE WNT Ca<sup>2+</sup>-DÉPENDANTE



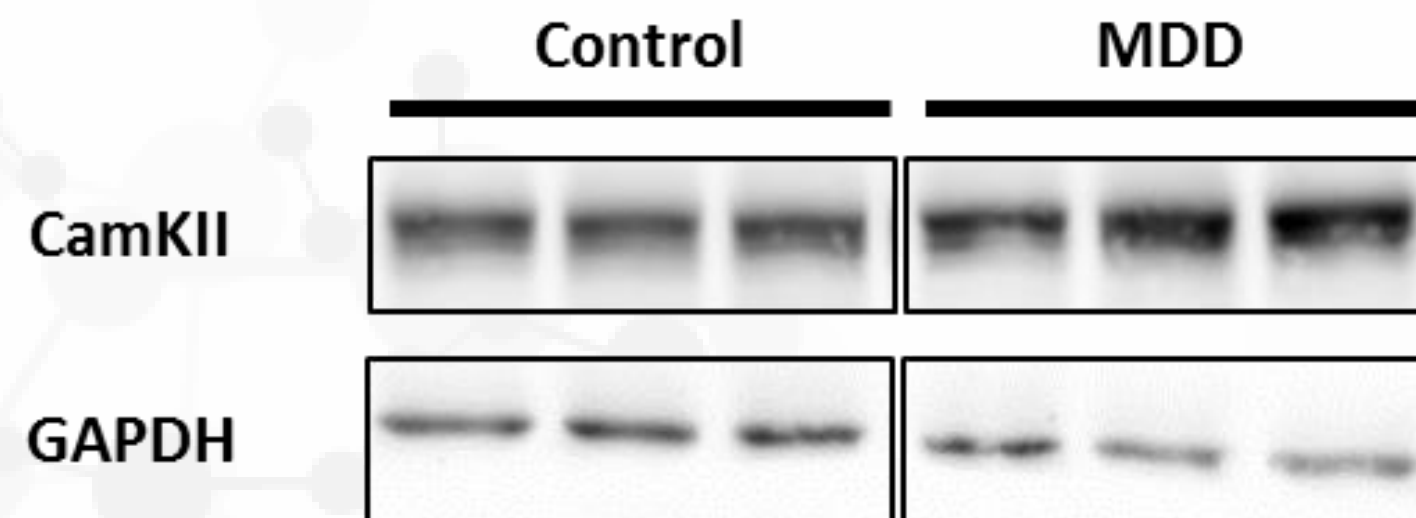
*(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)*



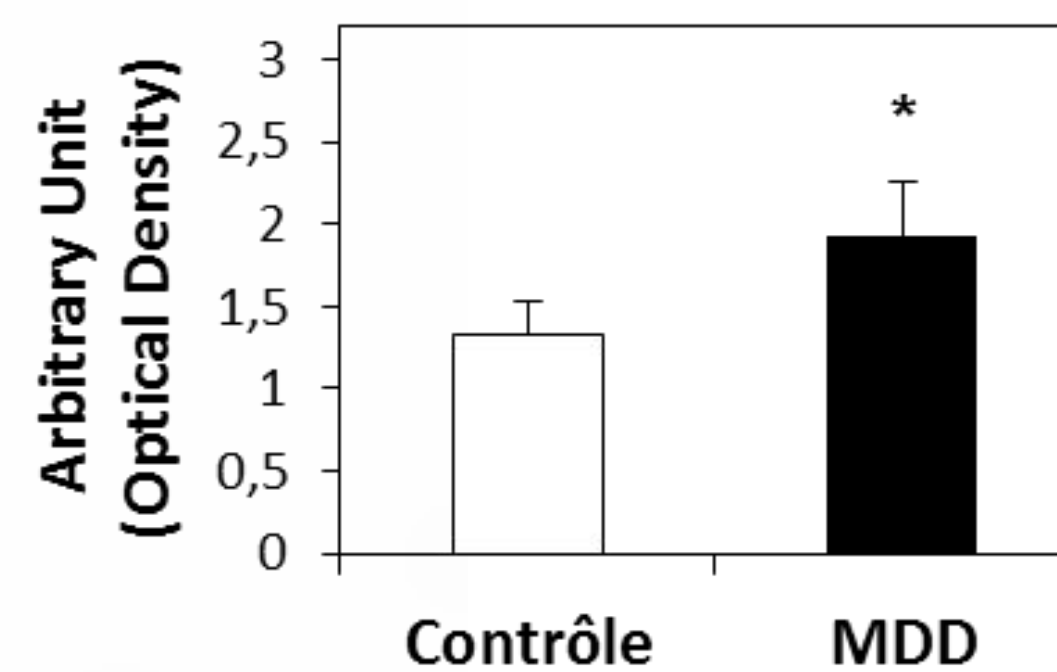
*(El Hajj Chehadeh et al., 2014, ajpendo)*



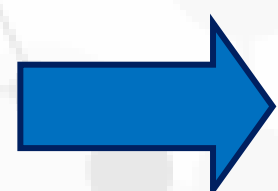
*(El Hajj Chehadeh et al., 2014, ajpendo)*



*(Willekens et al., 2018 ; Mol. Neurobiol.)*



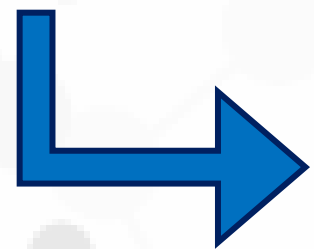
*N = 3 per group, \* p ≤ 0,05*



**La MDD cause des défauts dans la régulation du Ca<sup>2+</sup> et dans la voie wnt qui en dépend**



- Voies wnt sont **dérégulées** dans le cervelet des **femelles** à J<sub>21</sub>
- Impliquées dans le **développement** du cervelet



Pourrait expliquer les **défauts structuraux** et **fonctionnels** observés chez les **MDD**

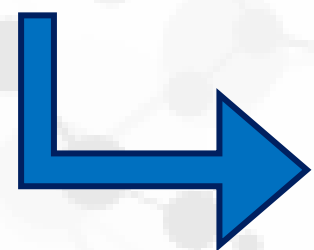


↳ **Épaisseur couche granulaire**  
↳ **Nombre  $\zeta$  Purkinje**

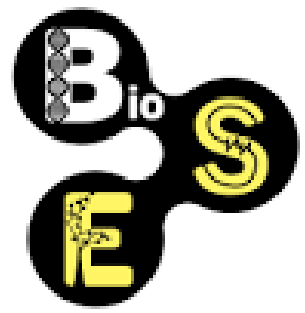


**Défauts de locomotion**

- Voies wnt **non altérées** chez les **mâles** :



**Dimorphisme sexuel** : pourrait expliquer que les femelles sont **plus sensibles** que les mâles à la carence



ECOLE DOCTORALE BioSE  
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT  
ED 266



**Inserm**



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



nutrition-génétique et exposition  
aux risques environnementaux

CONCLUSION

**Dérégulations moléculaires, en réponse  
à la carence précoce en donneurs de  
méthyles**

## CONCLUSION

### ALTÉRATIONS MOLECULAIRES

- **Carence précoce** en donneurs de méthyles → Dérégulations **moléculaires** dans le cervelet  
Gènes de **structure** et **développement** du cervelet  
Fonction **synaptique**

→ **Altérations structurales et comportementales** ←

- **Diminution** d'activation des voies **wnt**
  - Pas de diminution d'expression des ligands wnt → **Augmentation** expression **GSK-3 $\beta$**
  - Dérégulations de la **voie Ca<sup>2+</sup>-dépendante** → Défauts de la **fonction synaptique**

→ **Réponse moléculaire à la carence varie en fonction du sexe**



La Région  
**Lorraine**

