



HAL
open science

Role of the genomic and epigenomic alterations in the molecular mechanisms at the origin of the pathologies associated with rare inborn errors of vitamin B12 metabolism

Charif Rashka

► **To cite this version:**

Charif Rashka. Role of the genomic and epigenomic alterations in the molecular mechanisms at the origin of the pathologies associated with rare inborn errors of vitamin B12 metabolism. Human health and pathology. Université de Lorraine, 2019. English. NNT : 2019LORR0193 . tel-02528991

HAL Id: tel-02528991

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02528991>

Submitted on 19 Jan 2021

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



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 **Charif RASHKA**

Rôle des altérations génomiques et épigénomiques dans les mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies associées aux maladies rares du métabolisme de la vitamine B12

Le 9 décembre 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :

M Jean-François BENOIST	PU-PH, Hôpital Robert Debré, Paris
Mme Rikke NIELSEN	Associate Professor, Hôpital Universitaire d'Aarhus

Examineurs :

M Edward QUADROS	PU, Université des sciences de la santé SUNY Downstate, New-York
Mme Ariane BOUDIER	PU, EA 3452 UL, Nancy
M François FEILLET	PU-PH, UMRS Inserm-UL U1256, Nancy (Directeur de thèse)
M David COELHO	CRCN, UMRS Inserm-UL U1256, Nancy Co-directeur de thèse)

Membres invités :

M Jean-Louis GUEANT	PU-PH, UMRS Inserm-UL U1256, Nancy (Directeur de laboratoire, U1256)
Mme Véronique REGNAULT	DR, UMRS Inserm-UL U1116, Nancy

Remerciements :

Je tiens à remercier **Monsieur Jean-Louis GUÉANT**, Directeur de l'Unité Inserm U1256 NGERE et Professeur de l'UL, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses nombreux conseils, son expertise et son suivi tout au long de ma thèse.

Je remercie sincèrement mon directeur de thèse, **Monsieur François FEILLET**, Professeur de l'UL et praticien hospitalier, pour son encadrement, ses précieux conseils et sa disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Qu'il soit remercié pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués.

Je remercie mon co-directeur de thèse **Monsieur David COELHO**, Chargé de recherche classe normale à l'Inserm, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse. A travers ses compétences, ses recommandations, son investissement, il m'a encadré tout au long de cette thèse et m'a fait partager ses brillantes intuitions, ses compétences et connaissances. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués pour réaliser ce travail et surmonter les différentes épreuves de mon doctorat.

J'adresse tous mes remerciements à **Monsieur Jean-François BENOIST**, Professeur à l'Université de l'hôpital Robert Debré, ainsi qu'à **Madame Rikke NIELSEN**, Professeure associée à l'Université d'Aarhus, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à **Madame Ariane BOUDIER**, Professeure à l'UL et **Monsieur Edward QUADROS**, Professeur à l'Université des sciences de la santé SUNY Downstate, qui ont bien voulu être examinateurs.

Je remercie profondément **Madame Véronique REGNAULT**, Directrice de l'unité Inserm U1116 DECAC, pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir accepté d'être membre de mon jury et de mon comité de suivi de thèse. Merci pour votre expertise et vos précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Je tiens aussi à remercier **Monsieur Sébastien HERGALANT**, Ingénieur bio-informatique de notre laboratoire, pour les analyses bio-informatiques du séquençage de l'ARN (RNA-seq), du méthylome et du protéome. Merci pour ta disponibilité et ton aide.

Je remercie également **Monsieur Abderrahim OUSSALAH**, Maître de conférence des Universités et praticien hospitalier, pour les analyses du méthylome

Je remercie **Madame Natacha DREUMONT**, Maître de conférence des Universités, pour mes nombreuses questions et sa disponibilité, ainsi que ses précieux conseils qui ont contribué à l'avancement de mes travaux de recherches

Je tiens à exprimer sincèrement ma profonde gratitude envers **Madame Céline CHÉRY**, Ingénieure de recherche au CHRU de Nancy et **Monsieur Jean-Marc ALBERTO**, Ingénieur de recherche des Universités qui ont répondu avec patience aux questions quotidiennes dont je les accablais ainsi que pour leurs conseils et leur disponibilité.

Un grand merci aux secrétaires **Dominique, Catherine, Aline** et **Frédérique** pour leur formidable travail qu'elles fournissent au quotidien, leur disponibilité, leur gentillesse et leur patience.

Un grand merci aussi à tous les collègues, ami(e)s et membres de l'unité U1256 : **Aurélie, Amélia, Jérémie, Rémy, Ziad, Racha, Viola, Lynda, Maelle, les 3 Pauline (Mosca, Dimofski, Renard), Djésia, Tunay, Karim, Youssef, Pierre, Thomas, Isabelle, Philippe, Carine, Shyue-Fang, Fereshteh, Ramia.** Je vous suis très reconnaissante de votre contribution à mes travaux de recherche et dans ma vie au laboratoire durant ces 3 années.

Merci infiniment à ma famille d'être toujours là pour moi, **Maman, Papa, Isma, Irchad, Housni, Fazia, Tata Siti** ! Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous faites pour moi ! Votre patience, votre soutien, votre confiance et vos encouragements m'ont permis de tenir bon et de surmonter les différentes épreuves tout au long de mon doctorat.

A ma puce, ma raison de vivre, mon amour de fille **Lilia.** Cette thèse, je te la dédie. Toutes ces épreuves n'ont pas été faciles mais tu as su être patiente malgré ton jeune âge et Maman te remercie beaucoup. Je t'aime fort !

Liste des publications et communications

Publications

- **Charif Rashka**, Sébastien Hergalant, Abderrahim Oussalah, Yuri Motorin, Ziad Hassan, Matthias R. Baumgartner, David S. Rosenblatt, François Feillet, Jean-Louis Guéant, David Coelho. Transcriptomic analysis of fibroblasts from patients with cblC and cblG inherited defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing (**soumis à Human Molecular Genetics**)
- Rose Ghemrawi, Carole Arnold, Shyue-Fang Battaglia-Hsu, Grégory Pourié, Isabelle Trinh, Christine Bassila, **Rashka Charif**, Arnaud Wiedemann, Justine Flayac, Aurélie Robert, Natacha Dreumont, François Feillet, Jean-Louis Guéant, David Coelho. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metabolism*, 2019 (accepté).

Communications affichées

- **C. Rashka**, J. Do cao, K. Matmat, JL. Guéant, F. Feillet et D. Coelho. “Transdifferentiation of fibroblasts of patients with genetic defects of intracellular metabolism of vitamin B12 into neurons for study of neurological disorders” **3 rd thematic meeting of the French Neuroscience Society: Advances in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders, 7/8 june 2018- Strasbourg**
- **C. Rashka**, S. Hergalant, A. Oussalah, C. Chery, N. Dreumont, F. Feillet, J.L. Guéant, D. Coelho “Role of the genomic and epigenomic alterations in the molecular mechanisms at the origin of the pathologies associated with rare inborn errors of vitamin B12 metabolism” **12th International Conference on One Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine, June 9th-13th 2019, Catalonia, Spain**

Communications orales

- **Charif Rashka**, Céline Chery, Natacha Druemont, Yuri Motorine, Rémi Houlgatte, Sébastien Hergalant, Jean-Louis Guéant, François Feillet, David Coelho « Rôle des altérations génomiques et épigénomiques dans les mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies associées aux maladies rares du métabolisme de la vitamine B12 », **Journée de la fédération FR3209 Bioingénierie Moléculaire cellulaire et Thérapeutique (BMCT), 15 décembre 2016**
- **C. Rashka**, R. Houlgatte, S. Hergalant, C. Chery, A. Oussalah, N. Dreumont, J.L. Guéant, F. Feillet, D. Coelho “ Role of the genomic and epigenomic alterations in the molecular mechanisms at the origin of the pathologies associated with rare inborn errors of vitamin B12 metabolism”, **Journée de l'école doctorale Biose, Nancy, 2017**
- **C Rashka**, S Hergalant, A Oussalah, C Chery, N Dreumont, F Feillet, J-L Gueant, D Coelho “Role of the genomic and epigenomic alterations in the molecular mechanisms at the origin of the pathologies associated with rare inborn errors of vitamin B12 metabolism” **Journées scientifiques des FHU CARTAGE et ARRIMAGE, 4 et 5 avril 2019, Nancy**
- R. Ghemrawi, C. Arnold, G. Pourié, BSF. Battaglia-Hsu, C. Bassila, **C. Rashka**, A. Wiedemann, J. Flayac, A. Robert, N. Dreumont, F. Feillet, J.L. Guéant, D. Coelho. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and the cognitive defects induced by impaired cobalamin metabolism. **12th International Conference on One Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine, June 9th-13th 2019, Catalonia, Spain.**

Table des matières

Liste des publications et communications	4
Table des matières	7
Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Liste des fiches techniques	14
Liste des abréviations	16
Synthèse bibliographique	23
I. La vitamine B12 ou cobalamine	24
I.1. Définition	24
I.2. Structure chimique	24
I.3. Historique	26
II. Métabolisme de la vitamine B12	27
II.1. Absorption digestive et transport sanguin	27
A. Besoins, apports et réserves	27
B. Absorption digestive	28
C. Transport sanguin	29
II.2. Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12	31
A. Voie de synthèse de la cbl mitochondriale (Adocbl)	34
B. Voie de synthèse de la méthylcobalamine et cycle de la méthionine	35
III. Carence en vitamine B12, manifestations cliniques et traitements.....	40
III.1. Déficit d'apport	43
III.2. Défauts génétiques du métabolisme de la cbl	43
A. Défauts génétiques de l'absorption digestive et transport sanguin	44
IV. Impact des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 sur les systèmes hématopoïétiques et nerveux	57
IV.1. Implication sur le système hématopoïétique.....	57
IV.2. Conséquences sur le système nerveux	57
V. Conséquences moléculaires des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 sur l'apparition des symptômes cliniques.....	59
V.1. Régulation de l'expression des gènes	59
A. Influence sur le transcriptome	59
B. Impact sur le protéome	62
V.2. Régulations épigénomiques	63
A. Méthylation de l'ADN	63
B. Modifications des histones	67

C.	Méthylation de l'ARN.....	69
V.3.	Régulation du stress cellulaire	73
A.	Stress oxydatif	73
B.	Stress du réticulum endoplasmique.....	75
	Objectifs de la thèse.....	77
	Résultats	79
I.	Modèles d'étude de fibroblastes de patients cb1C et cb1G.....	80
II.	Altération des métabolites impliqués dans le cycle de la méthionine	81
III.	Dysfonctionnement de l'activité de la méthionine synthase	83
	Partie 1 : Analyse du transcriptome, des modifications de l'épissage alternatif et du protéome des fibroblastes de patients cb1C et cb1G	84
I.	Altération du transcriptome des fibroblastes cb1C et cb1G.....	86
I.1.	Séquençage de l'ARN et statistiques d'alignement des « read ».....	86
I.2.	Analyse de l'expression génique	87
I.3.	Analyse de l'enrichissement ontologique (GO) des DEG et voies métaboliques associées	90
I.4.	Validation des DEG par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	93
I.5.	Validation de l'altération du niveau d'expression de DMD et de MYH1 par western blot (WB) et immunofluorescence (IF)	96
I.6.	Analyse de l'épissage alternatif.....	100
I.7.	Analyse fonctionnelle des gènes affectés significativement par des évènements d'épissage alternatifs	107
I.8.	Validation expérimentale d'épissage alternatif par RT-PCR.....	109
I.9.	Identification des protéines de liaison à l'ARN (RBP) impliquées dans l'AS.....	110
I.10.	Analyse de l'enrichissement en cibles des RBP.....	114
I.11.	Étude des modifications des RBP	115
A.	Étude de la localisation subcellulaire	115
B.	Étude des modifications post-traductionnelles.....	115
II.	Altération du protéome des fibroblastes cb1C et cb1G.....	118
II.1.	Identification des protéines différentiellement exprimées	118
II.2.	Classification fonctionnelle des DEP et identification des réseaux d'interaction protéine-protéine.....	120
II.3.	Analyse de l'enrichissement en cibles de HNRNRPL et HuR.....	124
II.4.	Mise en évidence d'un stress cellulaire endogène	125
II.5.	Stress oxydatif et mesure des espèces réactives à l'oxygène	129
II.6.	Stress du réticulum endoplasmique.....	130
	Partie 2 : Analyse des mécanismes épigénomiques incluant la méthylation de l'ADN, de l'ARN et des histones dans les fibroblastes de patients cb1C et cb1G	131
I.	Altérations de la voie de transméthylation	132

I.1. Analyse du méthylome.....	132
I.2. Analyse de la méthylation des histones.....	138
I.3. Analyse de la méthylation de l'ARN m6A ou « épitranscriptome »	139
Partie 3 : Validation des hypothèses mécanistiques en lien avec les pathologies neuronales dans les modèles de neurones transdifférenciés.....	140
I. Validation des altérations moléculaires dans les modèles neuronaux cb1C et cb1G transdifférenciés	141
I.1. Neurones transdifférenciés.....	141
I.2. Etude de la morphologie et caractérisation des « i-neurones ».....	142
I.3. Validation de l'expression de MYH1 et étude du cytosquelette des neurones transdifférenciés.....	144
Discussion.....	145
Conclusion et perspectives.....	157
Matériels et méthodes	160
Annexes	217
Références bibliographiques	321

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la vitamine B12 (cobalamines)	25
Figure 2 : Absorption digestive et transport de la Cobalamine	30
Figure 3 : Métabolisme intracellulaire de la cobalamine	32
Figure 4 : Réactions catalysées par MMACHC	33
Figure 5 : Méthionine synthase : le carrefour entre les cycles du folate et de la méthionine)	36
Figure 6 : Synthèse de la Mecbl et réactivation de MS (MTR) par MSR (MTRR)	37
Figure 7 : Cellules sanguines périphériques et moelle osseuse d'un patient avec une carence en cbl	41
Figure 8 : Différents types de pathologies associées à une carence en cbl	42
Figure 9 : Défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12	49
Figure 10 : Signes cliniques généraux, neurologiques et oculaires chez les patients cblC, au début et au cours de l'évolution de la maladie	52
Figure 11 : Mécanisme de base de l'épissage alternatif	60
Figure 12 : Représentation schématique des différents types d'évènements d'épissage alternatif	61
Figure 13 : Réaction de méthylation du 5-mC	64
Figure 14: Mécanismes de méthylation de l'ADN par les DNMT	65
Figure 15 : Profil de méthylation de l'ADN	66
Figure 16: Méthylation des histones sur les résidus lysines et arginines	68
Figure 17: Schéma représentatif de la proportion de m6A dans les différentes sections du gène	70
Figure 18 : Méthylation réversible de l'ARNm (m6A) par les methyltransférase/demethylase m6A	71
Figure 19 : La phosphorylation oxydative	74
Figure 20 : Dosages des métabolites intracellulaires dans les fibroblastes de patients cblC et cblG	82
Figure 21 : Mesure de l'activité de la méthionine synthase	83
Figure 22 : Identification des gènes différentiellement exprimés (DEG) et identifiés par RNA-Seq	87
Figure 23 : Classification ontologique des gènes différentiellement exprimés (DEG)	91

Figure 24 : Validation des gènes différentiellement exprimés par RT-qPCR	95
Figure 25 : Validation de l'expression de DMD et MYH1 par western blot et immunofluorescence.....	97
Figure 26 : Validation de l'expression de DMD dans d'autres lignées.....	99
Figure 27 : Analyse de l'épissage alternatif (AS).....	101
Figure 28 : Annotations fonctionnelles des gènes différentiellement épissés de manière significative	108
Figure 29 : Validation expérimentale par RT-PCR des différences d'épissage alternatif entre les groupes de patients et les contrôles	109
Figure 30 : Carte d'ARN de SRSF1	113
Figure 31 : Enrichissement des cibles en RBP.....	114
Figure 32 : Marquage cellulaire et modifications post-traductionnelles des RBP	116
Figure 33 : Identification de protéines exprimées différentiellement dans les fibroblastes de patients cblC et cblG	119
Figure 34 : Processus biologiques impliquant les protéines différentiellement exprimées et réseaux d'interactions protéine-protéine	121
Figure 35 : Analyse des voies KEGG des protéines différentiellement exprimées.....	122
Figure 36 : Expression protéique de HNRNPL	123
Figure 37 : Mécanismes d'action des molécules agissant sur la chaîne respiratoire mitochondriale.....	126
Figure 38 : Respiration mitochondriale des fibroblastes cblC et cblG	128
Figure 39 : Mise en évidence des ROS par coloration au DHE	129
Figure 40 : Expression protéique de SIRT1.....	130
Figure 41 : Méthylation altérée dans les corps des gènes « Body » et les régions isolées des îlots CpG « Island »	132
Figure 42 : Méthylation de l'ADN dans les régions promotrices des gènes.....	134
Figure 43 : Comparaison du profil de méthylome des fibroblastes cblC et cblG vs 62 contrôles	137
Figure 44 : Analyse de la méthylation des histones.....	138
Figure 45 : Profil global de méthylation de l'ARN m6A	139
Figure 46 : Transdifférenciation des fibroblastes en neurones.....	141
Figure 47 : Neurones transdifférenciés	143
Figure 48 : Validation de l'expression de MYH1 dans les neurones transdifférenciés et étude du cytosquelette d'actine	144

Liste des tableaux

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés en 2011 par l'AFSSA	27
Tableau 2 : Mise à jour des recommandations de la valeur de référence de la cobalamine en 2018	28
Tableau 3 : Défauts génétiques du métabolisme digestif et du transport sanguin de la cobalamine	46
Tableau 4 : Défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la cobalamine	48
Tableau 5 : Tableau de comparaison des signes cliniques chez les patients cblC et cblG	55
Tableau 6 : Phénotypes des fibroblastes de patients cblC et cblG	80
Tableau 7 : Composition et contrôle qualité des read séquencés par la technique RNA-Seq	86
Tableau 8 : Top20 des gènes sous-surexprimés et surexprimés communs aux groupes cblC et cblG, classés par facteur de variation (FC)	88
Tableau 9 : Termes GO des DEG identifiés dans les groupes cblC et gènes associés	92
Tableau 10 : Termes GO des DEG identifiés dans le groupe cblG et gènes associés	92
Tableau 11 : Nombres d'évènements d'épissage alternatif différentiel et gènes affectés (Analyse rMATS)	102
Tableau 12 : Top20 des gènes affectés significativement par des événements d'épissage alternatif	104
Tableau 13 : Liste des gènes différentiellement épissés et exprimés de manière significative dans les groupes de patients	105
Tableau 14 : Nombre de motifs de reconnaissance de RBP significatifs (Nombre de RBP)	111
Tableau 15 : Top 20 des motifs de reconnaissance des RBP identifiés par l'analyse rMAPs	112
Tableau 16 : Enrichissement en cibles de HNRNPL et HuR dans les gènes transcrits, épissés et exprimés différentiellement par rapport aux témoins	125
Tableau 17 : Liste des gènes différentiellement méthylés dans la lignée cblC	134
Tableau 18 : Liste des gènes différentiellement méthylés dans la lignée cblG	135

Tableau 19 : Composition du milieu utilisé pour l'entretien des fibroblastes des patients	161
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différents volumes de réactifs utilisés en fonction du support de culture cellulaire	163
Tableau 21 : Milieu 1 de différenciation des fibroblastes en « neurones »	166
Tableau 22 : Milieu 2 de maturation des "neurones"	167
Tableau 23 : Listes des amorces utilisées en PCR quantitative	174
Tableau 24 : Composition du tampon RIPA	175
Tableau 25 : Références et conditions d'utilisation des anticorps en Western blot	187
Tableau 26 : Listes des anticorps étudiés en immunofluorescence	190
Tableau 27 : Liste des amorces utilisés pour la validation des évènements d'épissage alternatif identifiés par l'analyse rMATS	199

Liste des fiches techniques

Fiche 1 : Mise culture des fibroblastes de patients cblC et cblG

Fiche 2 : Congélation et décongélation des cellules

Fiche 3 : « Ineurones » transdifférenciés à partir de fibroblastes de patients cblC et cblG

Fiche 4 : Extraction d'ADN (QIAamp DNA Mini)

Fiche 5 : Extraction des ARNs totaux (RNeasy plus mini kit)

Fiche 6 : Digestion de l'ARN total à la DNase

Fiche 7 : Quantification des acides nucléiques

Fiche 8 : Vérification de la qualité des acides nucléiques avec le Bioanalyseur

Fiche 9 : Retro-transcription de l'ARN et expression génique par PCR quantitative

Fiche 10 : Extraction des protéines par différents tampons d'extraction

Fiche 11 : Dosage des protéines par la méthode « BCA Assay »

Fiche 12 : Dosage des protéines par la méthode « DC Assay »

Fiche 13 : Dosage des métabolites intracellulaires

Fiche 14 : Dosage de l'activité de la méthionine synthase

Fiche 15 : Analyse des protéines par Western blot

Fiche 16 : Déshybridation douce des membranes

Fiche 17 : Marquage des protéines par immunofluorescence

Fiche 18 : Co-immunoprécipitation de protéines d'intérêt

Fiche 19 : Séquençage de l'ARN ou « RNA Sequencing » (RNA-Seq)

Fiche 20 : Analyse bio-informatique du RNA-Seq

Fiche 21 : Analyse du protéome

Fiche 22 : Analyse bio-informatique du protéome

Fiche 23 : Bisulfitation de l'ADN génomique

Fiche 24 : Méthylome

Fiche 25 : Analyse bio-informatique du méthylome

Fiche 26 : Méthylation des histones

Fiche 27 : Quantification de la méthylation de l'ARN m6A ou « épitranscriptome »

Fiche 28 : Évaluation du stress cellulaire par mesure des paramètres de la respiration mitochondriale

Fiche 29 : Coloration des cellules par le dihydroéthidium (Marqueur des ROS cellulaires)

Fiche 30 : Analyses statistiques des données

Liste des abréviations

2'-O-Me : 2'-O-méthylation

5hmC : 5-hydroxyméthylecytosine

A3SS : Site d'initiation de l'épissage en 3'

A5SS : Site d'initiation de l'épissage en 5'

ABCD4 : ATP Binding Cassette Subfamily D Member 4

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

Adocbl : Adénosylcobalamine

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

ALKBH5 : AlkB Homolog 5, RNA Demethylase

AMN : Amnionless

AMT : apport maximal tolérable

ANC : Apports nutritionnels conseillés

AP : Anémie pernicieuse

ARN : Acide ribonucléique

AS : Epissage alternative

ATP : Adénosine TriPhosphate

ATR : ATP cob(I)alamine adénosyltransférase

B12 ou cbl : : Vitamine B12 ou cobalamine

BCA : Dosage de l'acide bicinchoninique

BHMT : Bétaïne-homocystéine méthyltransférase

CBS : Cystathionine β -synthase

CD320 : Récepteur de la Transcobalamine

CN-cbl : Cyanocobalamine

Co : Cobalt

Co-IP : Co-immunoprécipitation

COX : Cycloxygénases

CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale

CUB : Cubiline

Cubam : cubuline + amnionless

CyL : Cystathionine lyase

d-TMP : Désoxythymidine monophosphate

d-UMP : Désoxyuratyridyl monophosphate

DC : Dosage de de détergent compatible

DEG : Gènes différentiellement exprimés

DHE : Dihydroéthidium

DHF : Dihydrofolate

DHFR : Dihydrofolate réductase

DMB : 5,6 diméthylbenzimidazole-cobamide

DMD : Dystrophie musculaire de duchenne (pathologie) ou Dystrophine (protéine)

DMG : Gènes différentiellement méthylés

DNMT : ADN Méthyl Transférase

DSG : Gènes différentiellement épissés

ELAVL1 ou HuR : protéine de liaison à l'ARN ELAV1

ESE : Activateur de l'épissage de l'exon

ESS : Inhibiteur de l'épissage de l'exon

FAD : Flavine-Adénine-Dinucléotide

FI : Facteur intrinsèque

FTO : Fat mass and Obesity associated protein

GIF : Gène du facteur intrinsèque

GNMT : Glycine N-méthyle transférase

GO : ontologies des gènes

H3 : Histone 3

H3K36me3 : Tri-méthylation de la lysine 36 de l'histone 3

H3K4me2 : Diméthylation de la lysine 4 de l'histone 3

H4 : Histone 4

HC : Haptocorrine

HCF1 : Host Cell Factor C1

HCl : Acide chlorhydrique

Hcy : Homocysteine

hg38 : Version 38 du génome humain de référence

HKMTs : Méthyltransférases

hRNPs : Ribonucléoprotéine hétérogènes

IF : Immunofluorescence

IM : Intra-musculaire

iPS : cellule pluripotente induite

IRF3 : Régulateur d'interféron 3

ISE : Activateur intronique de l'épissage

ISS : Inhibiteur intronique de l'épissage

LDS1 : Déméthylase spécifique à la lysine 1

LMBD1 : LMBR1 Domain Containing 1

LOX : Lipoxigénases

m1A : N(1)-méthyladénosine

m5C : N(5)- méthyladénosine

m6A : N(6)- méthyladénosine

m6Am : N6, la 2'-O-diméthyladénosine

m7G : 7-méthylguanine

MAT : Méthionine Adénosyl Transférase

MB : Maladie de Biermer

MBD : Méthyl-CpG-binding domain

MCM (Protéine)/MUT (gène) : L-méthyl-malonyl-Coenzyme A mutase

Mecbl : Méthylcobalamine

Met : Méthionine

MeTHF : Méthyltétrahydrofolate

METTL : Méthyltransférase Like

MMA : Acide méthylmalonique

MMAA : Acidurie méthylmalonique type A

MMAB : Acidurie méthylmalonique type B

MMACHC : Acidurie méthylmalonique type C avec homocystinurie

MMADHC : Acidurie méthylmalonique type D avec homocystinurie

MPR1 : Multiple drug resistant protein 1 receptor

MS : Méthionine Synthase

MT : Méthyle transférase(s)

MTHFD : 5, 10-méthylènetétrahydrofolate déhydrogénase

MTHFR : 5, 10-méthylènetétrahydrofolate réductase

MTR (gène), MS (protéine) : Méthionine synthase

MTRR (gène) : 5-Méthyltétrahydrofolate-Homocysteine-Méthyltransférase Réductase ;

MSR (protéine) : méthionine synthase réductase

MXE : Exon mutuellement exclusif

MYH1 : Chaîne lourde de myosin 1

NIE115 : Cellules de neuroblastome humain

NOX : NADPH oxydase

O2- : Anion superoxyde

OH-cbl : Hydroxocobalamine

OT : Construction Oléosine-Transcobalamine

PBS : Solution de tampon saline

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PDH : Pyruvate déshydrogénase

Pré-ARNm : ARN pré-messager

PRMTs : Arginine méthyltransférases

PSI : pourcentage d'épissage

PTB : Polypyrimidin-tract-binding protein

PTBP1 : Polypyrimidine tract-binding protein 1

RBP : Protéine de liaison à l'ARN

RE : Reticulum endoplasmique

RI : Rétention d'intron

rMAPs : Analyse des motifs d'ARN

rMATs : Analyse multivariées de l'épissage de transcrit

RMM : Motifs de reconnaissance de l'ARN

RNA-Seq : Séquençage de l'ARN

RNP : Ribonucléoprotéines

ROS : Espèces réactives à l'oxygène

RT-qPCR : Retro-transcription et PCR quantitative

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAHH : S- adénosylhomocystéine hydrolase

SAM : S-adénosylméthionine

SAMS : S-Adénosyl-Homocystéine Synthétase

SE : Saut d'exon

SHMT : Sérine hydroxyméthyltransférase

ShRNA : short hairpin RNA

SIRT1 : Sirtuine 1

SNPs : Single Nucleotide Polymorphism

SO : Stress oxydatif

SR : Familles de facteurs d'épissage riches en sérine-arginine

TCII : Transcobalamine II

TCN2, TC ou TCII : Transcobalamine II

THAP11 : THAP Domain Containing 11

THF : Tétrahydrofolate

TO : Construction de transcobalamine-oléosine

TS : Thymidylate synthase

TSS : Site d'initiation de la transcription

UTR : Région non transcrite

VO : Voie orale

WB : Western blot

WT : Wild type

YTHDC : YTH domain containing

ZNF143 : Zinc Finger Protein 143

Synthèse bibliographique

I. La vitamine B12 ou cobalamine

I.1. Définition

La vitamine B12 ou cobalamine (cbl) est une molécule hydrosoluble, avec un aspect cristallin rouge foncé, stable à la chaleur mais sensible à la lumière. Elle est synthétisée uniquement chez les procaryotes tels que les bactéries, les levures et les archées (Watanabe et al. 2013), (Girard et al. 2009). Chez l'homme, l'apport se fait exclusivement par une alimentation d'origine animale incluant la viande, le poisson, les œufs et les produits laitiers (Watkins and Rosenblatt 2011). Les animaux récupèrent cette vitamine à partir de leur microflore gastro-intestinale ou du phytoplancton et les êtres humains comblent leurs besoins en cbl par le biais de la chaîne alimentaire (Stabler and Allen 2004).

I.2. Structure chimique

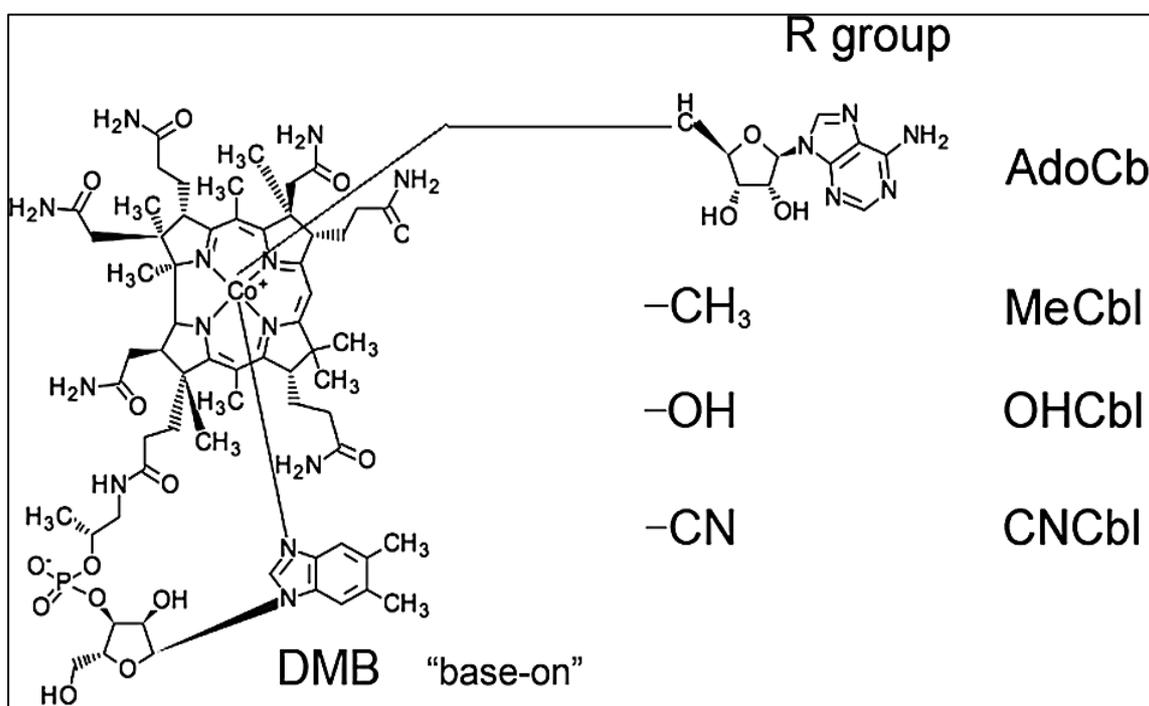
Sur le plan chimique, la cbl est connue pour être la plus grosse et la plus complexe des vitamines du groupe B (environ 1300 et 1500 daltons). Sa structure est proche de l'hème mais l'atome de fer est remplacé par un atome de cobalt, ce qui a été à l'origine de la dénomination du mot « Cobalamine ». La structure de base est composée de quatre parties dont les trois premières sont communes à toutes les cbl (Fig. 1) :

- Un atome de cobalt central qui peut lier de quatre à six ligands. Cet atome peut exister sous trois degrés d'oxydation : +3 pour la cob (III) alamine (le plus oxydé), +2 pour la cob (II) alamine et +1 pour la cob(I) alamine (le plus réduit).
- Quatre cycles pyrrole ou tétrapyrrolique possédant quatre atomes d'azotes liées à l'atome de cobalt et formant un cycle corrine.
- Un nucléotide relié à l'atome de cobalt et dont la base est spécifique à la cbl.

La quatrième partie liée à l'atome de cobalt, est variable et permet de définir les différentes formes de cbl (Froese and Gravel 2010). Chacune des différentes formes de cbl possède des propriétés physiologiques particulières en fonction du groupement variable R. Ainsi, nous distinguons le cyanure (CN), le groupement méthyle (CH₃), le nucléoside (5'-déoxadénosine) et l'hydroxyl (OH). La liaison de ces groupements à l'atome de cobalt définit respectivement les formes de cbl suivantes :

- Cyanocobalamine (CN-cbl)
- Méthylcobalamine (Mecbl)
- Adénosylcobalamine (Adocbl)
- Hydroxocobalamine (OH-cbl)

L'OH-cbl et la CN-cbl représentent les formes dites « stables » des cbl (Raux et al. 2000). Pour cette raison, elles sont recommandées en thérapeutique pour le traitement des déficits en cbl. Au niveau physiologique, ces deux formes de cbl sont métabolisées en deux coenzymes actives : la Mecbl et l'Adocbl.



(Froese and Gravel 2010)

Figure 1 : Structure chimique de la vitamine B12 (cobalamines)

Les cobalamines sont des 5,6 diméthylbenzimidazole-cobamide (DMB). Elles sont constituées d'un atome central de cobalt lié à quatre atomes d'azote formant un noyau tétrapyrrolique (ou un cycle corrine), d'un ribonucléotide situé dans la partie inférieure du cycle corrine appelé ligand axial inférieur (ou ligand α -axial) et d'un radical libre R situé dans l'extrémité supérieure du noyau corrine (ligand axial supérieur ou β -axial). Ce radical libre est substituable et permet l'obtention de différentes formes de cobalamine : l'adénosylcobalamine (Adocbl), le méthylcobalamine (Mecbl), l'hydroxocobalamine (OH-cbl) et la cyanocobalamine (CN-cbl).

I.3. Historique

Découverte pour la première fois dans les années 1800, la cbl a intéressé la communauté scientifique du fait de l'apparition d'une épidémie de désordres sanguins auxquelles s'ajoutaient des signes neurologiques. C'est en 1849 que Michael Anton Biermer décrit une forme « remarquable d'anémie générale », que son évolution mortelle lui fit qualifier de « pernicieuse ». L'anémie pernicieuse (AP) ou maladie de Biermer est une gastrite auto-immune résultant de la destruction des cellules pariétales gastriques et associée à l'absence du facteur intrinsèque (FI) qui est une protéine de liaison à la cbl, lui permettant d'être ingérée.

En 1926, George Minot, William Murphy et George Whipple ont montré qu'un régime à base de foie riche en cbl ralentissait la maladie de l'AP, ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine et physiologie en 1934. Chez les patients, l'anémie se caractérise par une augmentation de la taille des globules rouges, dite « macrocytaire ». William Castle a mis en évidence l'absence d'un FI indispensable et d'un facteur extrinsèque issu de l'alimentation d'origine animale. Cet élément curatif, qui reçut ensuite le nom de vitamine B12, ne fut purifié et isolé du foie qu'en 1948 par Karl Folker, du laboratoire Merck et Lester Smith, du laboratoire Glaxo. La structure complexe de la vitamine B12, fut définitivement élucidée en 1964 par l'équipe de cristallographie aux rayons X de Hodgkin (Hodgkin et al. 1956) à Oxford (Prix Nobel de Chimie en 1964). Ce n'est qu'en 2007 que fut achevée l'étude de la synthèse de la cbl par les micro-organismes (Oh and Brown 2003), (Ebbing et al. 2009).

II. Métabolisme de la vitamine B12

II.1. Absorption digestive et transport sanguin

A. Besoins, apports et réserves

Les besoins quotidiens en cbl ont été fixés à 2,4 µg (Finglas 2000) ; (Rodriguez et al. 2009) mais peuvent atteindre 4 à 7 µg par jour - ce qui est courant chez les personnes qui mangent des produits d'origine animale ou qui prennent des compléments multivitaminés.

Selon les pays, les apports journaliers en cbl ne sont pas tout à fait les mêmes et diffèrent même en fonction de la catégorie sociale. D'après les recommandations de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), les apports nutritionnels conseillés (ANC) étaient de 3,4 µg/jour chez l'Homme adulte, de 2,4 µg/jour chez la femme adulte, de 2,6 µg/jour chez la femme enceinte et de 3 µg/jour chez les personnes âgées (tableau 1) (Schlienger 2011). Aux États-Unis, l'apport médian en cbl était de 5 µg/jour pour les hommes et de 3,5 µg/jour pour les femmes alors que dans une province canadienne, l'apport alimentaire moyen était estimé à environ 7 µg/jour chez les hommes et 4 µg/jour chez les femmes.

Tableau 1 : Apports nutritionnels conseillés en 2011 par l'AFSSA

Statut	Apports nutritionnels conseillés en cbl (µg/jour)
Homme adulte	3,4
Femme adulte	2,4
Femme enceinte	2,6
Personne âgée	3

En 2018, les valeurs de référence de la cbl mises à jour par les sociétés de nutrition de l'Allemagne, l'Autriche et la Suisse (Ströhle et al. 2018) étaient de 3 à 4 µg/jour chez les adultes, de 4,5 à 5,5 µg/jour chez les femmes enceintes et allaitantes et de 0,5 à 4,5 µg/jour chez les nourrissons, les enfants et les adolescents (tableau 2). Aujourd'hui, il n'existe pas suffisamment de preuves scientifiques pour établir un niveau d'apport maximal tolérable (AMT) de la cbl.

Tableau 2 : Mise à jour des recommandations de la valeur de référence de la cobalamine en 2018

Statut	Valeurs de référence de la cbl (µg/jour)
Adulte	3 à 4
Femme enceinte ou allaitante	4,5 à 5,5
Nourrisson, enfant et adolescent	0,5 à 4,5

La capacité de stockage totale de la cbl dans l'organisme est d'environ 3 à 5 mg (Finglas 2000). Ce qui représente environ 1000 jours d'apport. Le principal site de stockage est le foie (50 % de la capacité de stockage totale de la cbl), ceci étant dû à la réabsorption de la cbl lié à la transcobalamine (TCII) par la mégaline (Moestrup et al. 1996). Le reste de la cbl est stocké dans les autres tissus de l'organisme. Les réserves en cbl étant importantes et la perte très faible, la mise en place d'une carence n'est détectable qu'au bout de plusieurs années (Carmel 2000) et en cas d'excès, elle est principalement éliminée par voie urinaire.

B. Absorption digestive

Dans l'estomac, sous l'action des sécrétions gastriques (pepsine et gastrine) et de l'action de l'acide chlorhydrique (HCl) produite par les cellules pariétales, la cbl est libérée des complexes protéiques alimentaires. Elle est ensuite prise en charge par deux transporteurs endogènes : l'haptocorrine (HC) (Quadros 2010) et le facteur intrinsèque (FI) (Fig. 2). L'HC provient essentiellement de la salive et le FI est une glycoprotéine synthétisée par les cellules pariétales

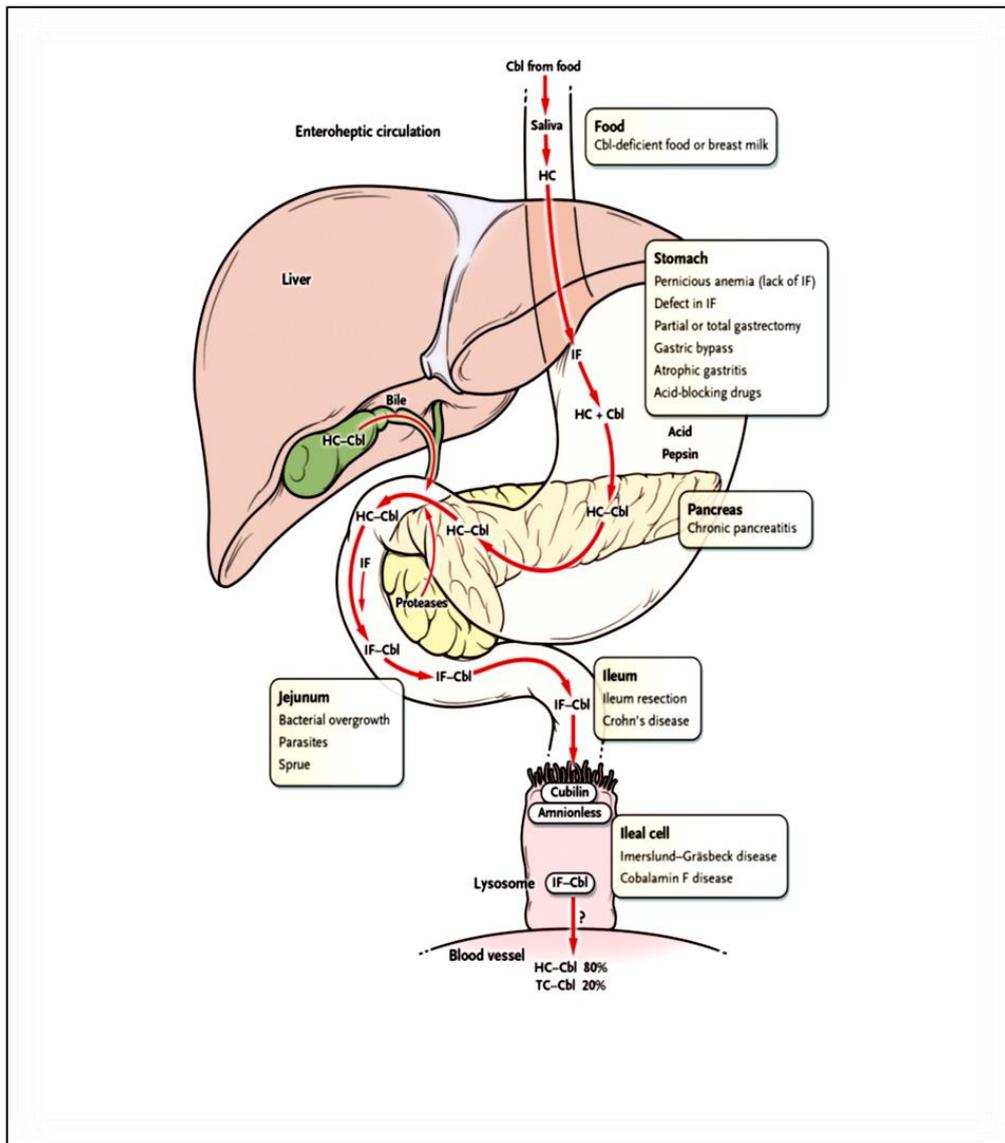
de l'estomac. L'HC possède une bonne capacité de liaison et une affinité plus importante à la cbl que le FI. Sous l'effet des protéases pancréatiques, l'HC est dégradée et la cbl est ainsi libérée au niveau du duodénum. Le FI acquiert alors une plus grande affinité pour la cbl par rapport à l'HC. Elle est ainsi transférée de l'HC vers le FI qui la protège des dégradations enzymatiques et la transporte jusqu'à l'iléon terminal (Gottlieb et al. 1965) ; (Nicolas and Guéant 1995). Le complexe FI-cbl est reconnu par un récepteur constitué d'un hétérodimère d'amnionless et de cubiline, nommé cubam (Fyfe et al. 2004) (Moestrup et al. 1998). Ce récepteur permet l'internalisation de la cbl par endocytose dans les cellules iléales dans lesquelles, la cbl se lie au récepteur MRP1 (multiple drug resistant protein 1 receptor) (Beedholm-Ebsen et al. 2010) afin d'être internalisée dans la circulation sanguine.

C. Transport sanguin

Dans la circulation sanguine, le transport de la cbl est assuré par deux protéines :

- L'haptocorrine (HC) transporte 80 % de la cbl jusqu'aux organes de réserve, principalement le foie.
- La transcobalamine (TCII) transporte les 20 % restantes jusqu'aux cellules utilisatrices (Stabler 2013).

La plus grande majorité de la cbl et de ses analogues est liée à l'haptocorrine, cependant, c'est la transcobalamine qui possède la plus grande affinité pour la cbl (Hodgkin et al. 1956) permettant une libération rapide pour les tissus dans lesquels elle va exercer son rôle physiologique (Quadros et al. 1999), (Stabler 2013).



(Stabler 2013)

Figure 2 : Absorption digestive et transport de la Cobalamine

HC : Haptocorrine, FI ou IF : Facteur intrinsèque, cbl : Cobalamine, TC ou TCII : Transcobalamine. La cbl est libérée des complexes alimentaires par l'action des enzymes salivaires et est prise en charge par l'HC dans l'estomac. Une partie de la cbl est transportée par l'IF mais avec moins d'affinité que l'HC. Cette dernière est dégradée par les enzymes pancréatiques et le FI acquiert une plus grande affinité vis-à-vis de la cbl et la transporte jusqu'à l'iléon terminal. La cbl est alors reconnue par le récepteur cubam (cubiline et amnionless) et internalisée dans la circulation sanguine via le récepteur MRP1. Dans le sang, la cbl est majoritairement transportée par l'HC (80%) mais avec beaucoup moins d'affinité que la TCII (20%).

II.2. Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12

Au cours de son métabolisme intracellulaire, la cbl est presque toujours liée à des protéines qui assurent son transport (enzymes, chaperonnes, etc.) et agissent en complexes de plusieurs protéines (Fig. 3).

Au niveau cellulaire, le complexe TCII-cbl se fixe au récepteur membranaire CD320 qui permet l'absorption cellulaire de la cbl par une réaction d'endocytose clathrine-dépendante (Quadros and Sequeira 2013). L'endosome formé fusionne avec un lysosome pour former une endolysosome. Le complexe TCII-cbl est ensuite hydrolysé, la protéine TCII est relarguée dans la membrane plasmique et la cbl se trouve à l'état libre (Kapadia et al. 1983). Deux protéines membranaires lysosomales sont alors nécessaires pour le transport de la cbl de l'endolysosome vers le cytoplasme : il s'agit de LMBD1 (LMBR1 Domain Containing 1) (Rutsch et al. 2009a) et de ABCD4 (ATP Binding Cassette Subfamily D Member 4) (Coelho et al, 2012). Une troisième protéine, MMACHC (Methyl Malonic Aciduria cblC type with HomoCystinuria) s'associe au complexe protéique LMBD1 et ABCD4 (Deme et al. 2014) pour récupérer la cbl et assurer son transport cytoplasmique (Lerner-Ellis et al. 2006).

MMACHC est une protéine enzymatique qui se lie à la cbl (Koutmos et al. 2011) ; (Froese et al. 2012) et catalyse le retrait de groupements alkyl- et CN- de la cbl (Fig.4) pour produire une forme réduite de la cbl (cob (II)alamine). Les formes alkyles de cbl subissent une réaction de désalkylation (Hannibal et al. 2009) alors que les formes cyanures subissent une réaction de décyanation réductrice (Kim et al. 2008). Après réduction en cob(II)alamine, la cbl protégée par MMACHC est ensuite ciblée par MMADHC (Methyl Malonic Aciduria cblD type with HomoCystinuria), une protéine qui interagit avec MMACHC uniquement après que MMACHC ait lié et traité la cbl (Froese et al. 2015). Les étapes finales du métabolisme intracellulaire de la cbl correspondent à la synthèse des deux co-facteurs biologiquement actifs Mecbl et Adocbl.

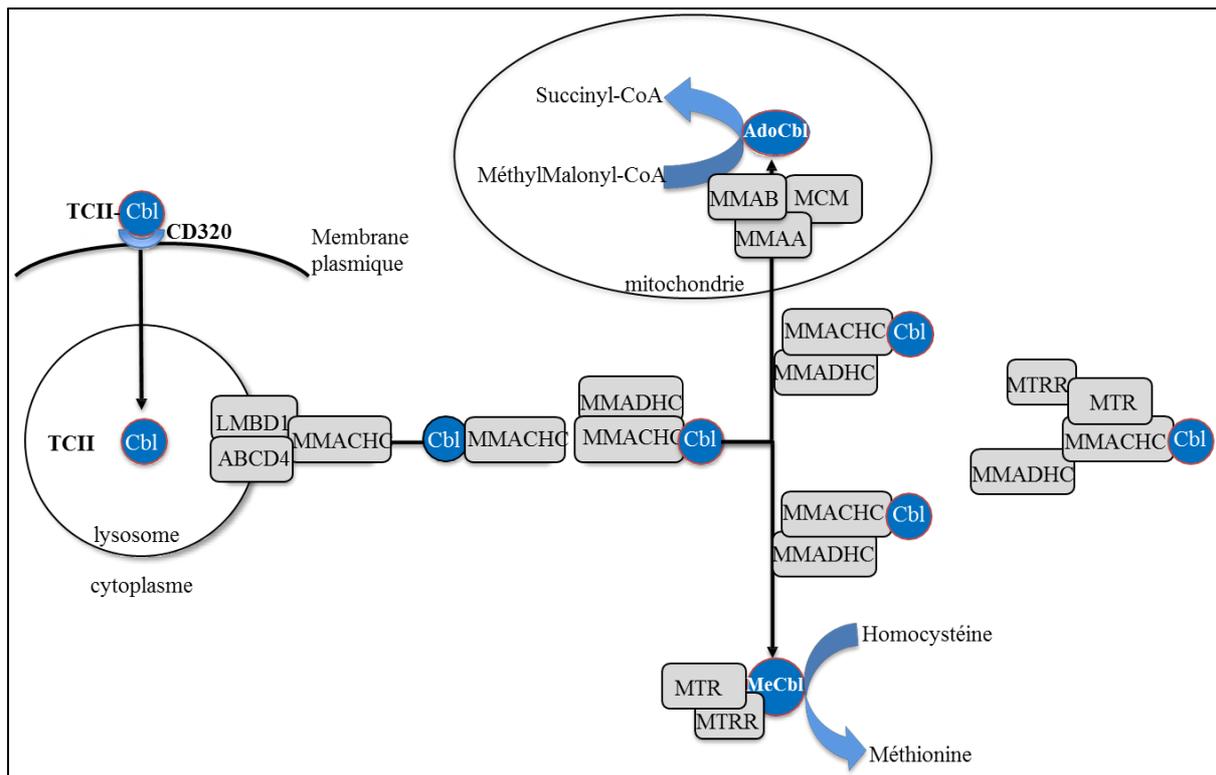
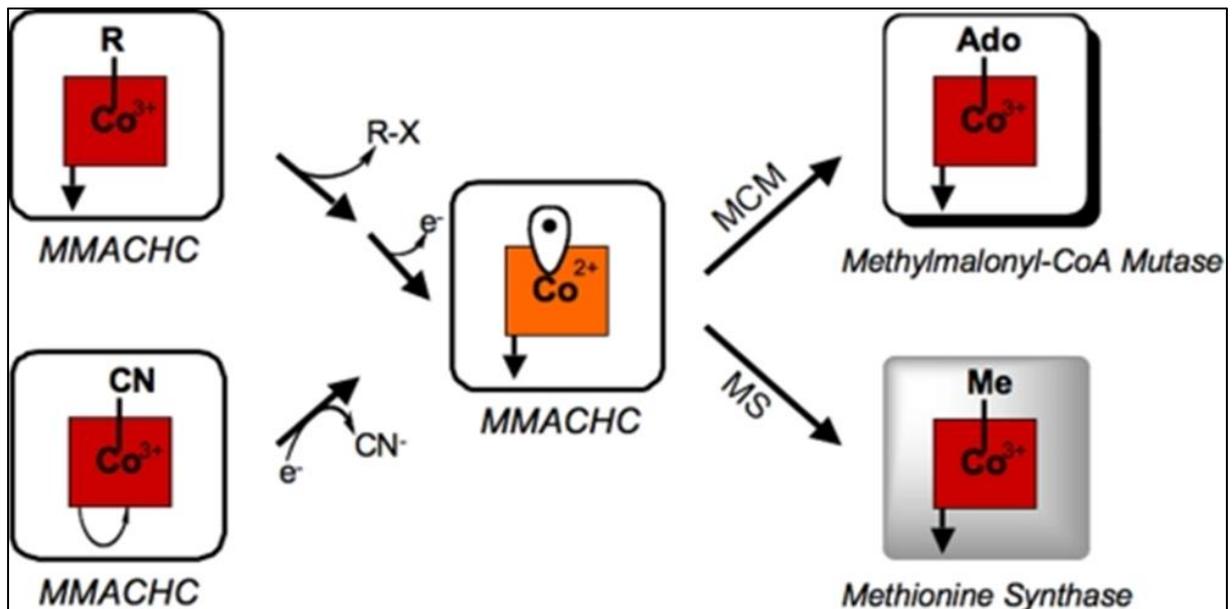


Figure 3 : Métabolisme intracellulaire de la cobalamine

Le complexe TCII-cbl se fixe au récepteur CD320 qui permet son absorption cellulaire par endocytose. Dans le lysosome, le complexe est hydrolysé, la cbl est relarguée dans le cytoplasme grâce à l'action de deux protéines membranaires du lysosome : LMBD1 et ABCD4. La protéine MMACHC s'associe aux deux autres protéines pour permettre la libération de la cbl dans le cytoplasme. La protéine MMADHC se lie par la suite à MMACHC pour orienter la cbl soit dans la mitochondrie, soit dans le cytoplasme. L'étape finale du métabolisme de la cbl est de synthétiser les deux cofacteurs Adocbl et Mecbl : la synthèse et l'utilisation de l'Adocbl font intervenir 3 protéines MMAB, MMAA et MCM. MCM est l'enzyme qui catalyse la réaction de transformation de la L-méthylmalonyl Coenzyme A en succinyl-Coenzyme A, avec l'aide de son coenzyme l'Adocbl. La Mecbl est un cofacteur de la MS (MTR) permettant la re-méthylation de l'homocystéine en méthionine. Toutes les 200-1000 réactions catalytiques, la cbl se trouve sous une forme oxydée, ce qui inactive la MS. La protéine MSR (MTRR) intervient alors pour réactiver la MS. Dans le cytoplasme, la cbl est protégée par un complexe multiprotéique composé de MMADHC/MMACHC /MTR/MTRR (d'après Bassila et al, 2017).



R = alkyl, CN= cyano

(Kim et al. 2009)

Figure 4 : Réactions catalysées par MMACHC

Les formes alkyl (R-X) subissent une perte d'électrons et la cbl passe ainsi d'un degré oxydation cob (III) alamine en cob (II) alamine. La CNcbl subit une décyanation réductrice qui se transforme en cyanure puis en cob (II) alamine. Sous ce degré d'oxydation, la cob (II) alamine peut être converti en cofacteurs actifs (Mecbl et Adocbl). Ces deux cofacteurs sont nécessaires pour l'activité des enzymes méthionine synthase (MS) et méthyl-malonyl-CoA mutase (MCM).

A. Voie de synthèse de la cbl mitochondriale (Adocbl)

Dans le cytoplasme, le complexe MMADHC-MMACHC lié à la cbl oriente la cbl vers la voie mitochondriale par un mécanisme qui est encore inconnu. Cependant, chez le modèle *Caenorhabditis elegans*, il a été découvert que la protéine WHT-6 de la famille G des transporteurs ABC est responsable du transport de la cbl dans la mitochondrie suggérant que son orthologue humain ABCG (ATP- binding cassette type G) pourrait avoir un rôle similaire chez les mammifères (McDonald et al. 2017)..

Une fois dans la mitochondrie, trois protéines interviennent dans la synthèse et l'utilisation de l'Adocbl : MMAA (Acidurie méthylmalonique type A), MMAB (Acidurie méthylmalonique type B) et MUT (L-méthyl-malonyl-Coenzyme A mutase). La MMAB est une adénosyl-transférase qui catalyse la synthèse ATP-dépendant de l'Adocbl, co-facteur de la MCM (Schubert and Hill 2006). MMAA permet le transfert de l'Adocbl de MMAB à la MUT. L'activité de la MCM dépendante de l'Adocbl, est requise pour la conversion de la L-méthylmalonyl CoA en succinyl CoA, un intermédiaire du cycle de Krebs. Cette voie est une extension de la voie catabolique du propionate impliquée dans le catabolisme des acides aminés ramifiés tels que la valine, l'isoleucine, la méthionine et la thréonine, des acides gras à chaîne impaire et de la chaîne latérale du cholestérol (O'Leary and Samman 2010). Au cours de cette catalyse, l'Adocbl se trouve parfois sous une forme oxydée (OH-cbl) et l'accumulation d'OH-cbl entraîne l'inactivation de la MCM (Takahashi-Íñiguez et al. 2011). La protéine MMAA permet non seulement la protection de la MCM, mais la réactive en cas d'inactivation (Takahashi-Íñiguez et al. 2011).

Dans une étude récente, il a été montré que la protéine MMAA était importée dans les mitochondries où elle forme un complexe avec la MCM pour remplacer l'Adocbl oxydée en une Adocbl intacte (Takahashi-Íñiguez et al. 2017). Une autre étude a montré que l'association des protéines MMAA, MMAB et MCM était nécessaire à la synthèse et à la bonne utilisation de l'Adocbl (Padovani et al. 2006), (Watkins and Rosenblatt 2013) ; (Plessl et al. 2017).

B. Voie de synthèse de la méthylcobalamine et cycle de la méthionine

Dans le cytoplasme, la cbl est utilisée par la méthionine synthase (MTR/MS) dont l'activité est affectée par des interactions avec MMACHC, MMADHC et MSR (Bassila et al. 2017). Une fois que la cbl a été efficacement liée à la MS, elle est réduite en cob(I)alamine qui correspond à la forme la plus réduite et la plus réactive. Le groupement méthyle du 5-méthyltétrahydrofolate (MTHF) est alors transféré à la cob(I)alamine pour former la Mecbl, qui le transmet à l'homocystéine (Hcy) formant ainsi de la méthionine (Met) et du tétrahydrofolate (THF) (Fig. 5).

Approximativement toutes les 1/200-1/1000 réactions catalytiques de la MS, la cob(I)alamine est oxydée et prend la forme cob(II)alamine (Fujii et al. 1977). Cette forme oxydée de la cbl rend la MS enzymatiquement inactive (Olteanu and Banerjee 2001). La méthionine synthase réductase (MSR) codée par le gène MTRR intervient alors pour réactiver la MS par une méthylation réductrice de la cob(II)alamine en cob(I)alamine (Fig.6) (Wilson et al. 1999) ; (Olteanu and Banerjee 2001) grâce à l'utilisation du groupement méthyle de la S-adénosylméthionine (SAM ou Adomet), le donneur universel de groupement méthyle dans les mécanismes épigénomiques (Wolthers and Scrutton 2009). Ainsi, en transférant le groupement méthyle du 5-MeTHF à l'Hcy, la MS joue un rôle de carrefour entre le cycle de la méthionine et celui des folates (Fig. 5) (Forges et al. 2007) ; (Guéant et al. 2013a) ; (Yang et al., 2016) ; (Froese et al. 2018).

Il existe deux isoformes de la MS ayant la capacité d'interagir avec MMACHC. L'interaction entre la forme inactive de la MS et MMACHC pourrait conduire à une diminution de l'activité de MMACHC (Fofou-Caillierez et al. 2013).

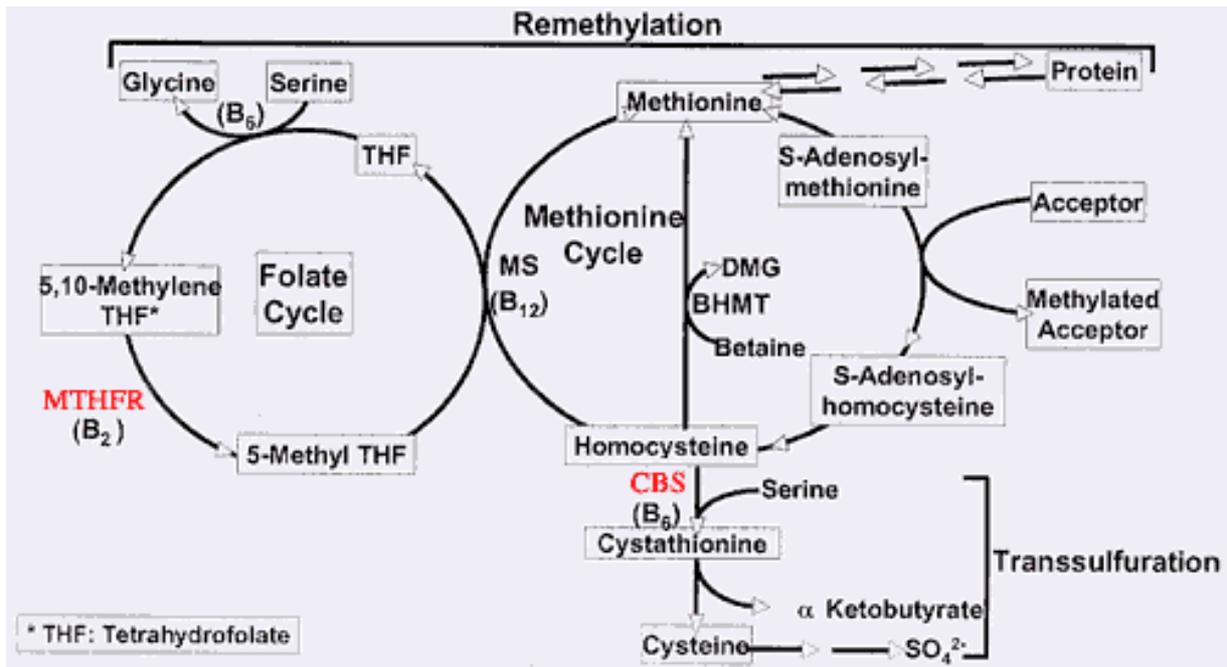
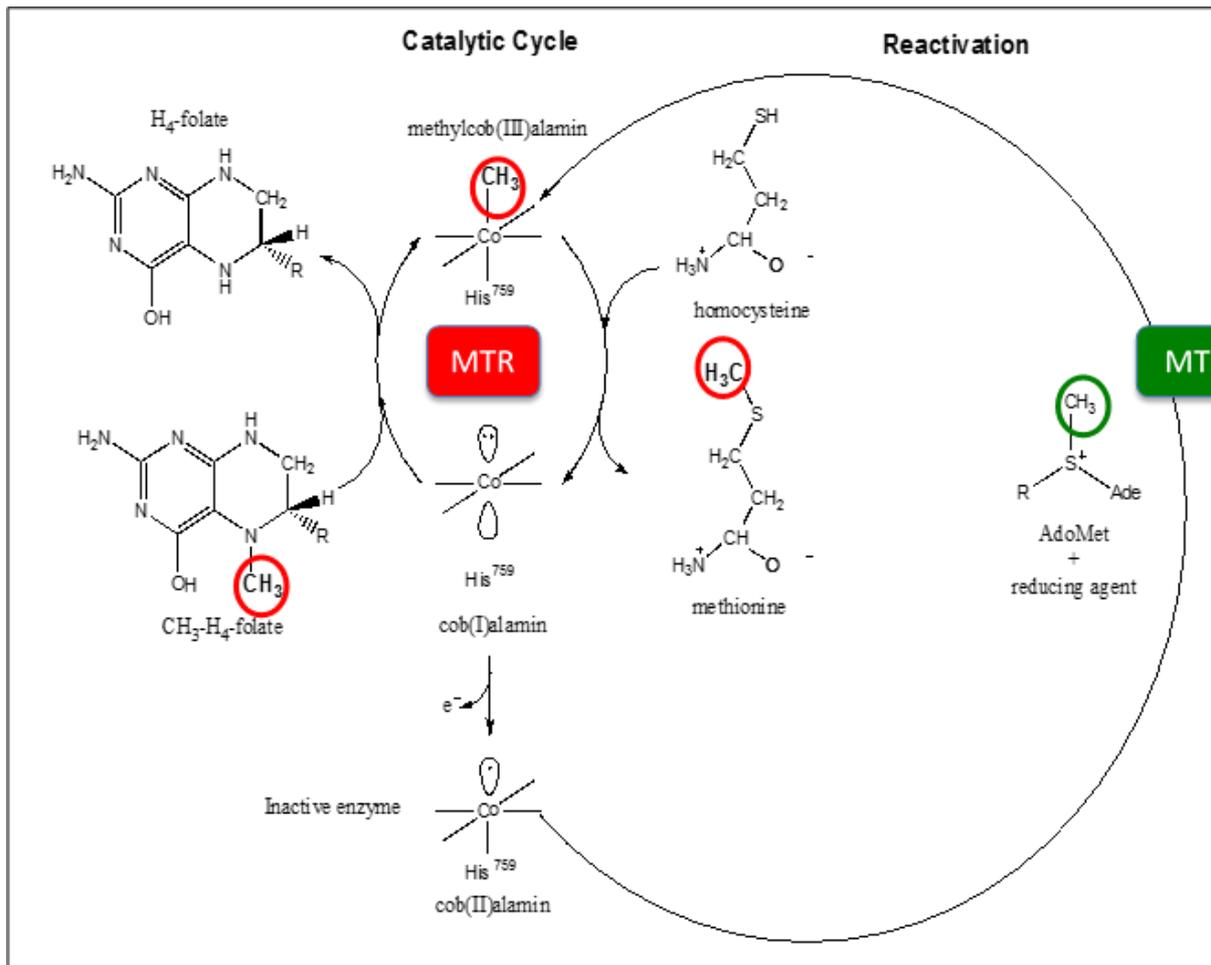


Figure 5 : Méthionine synthase : le carrefour entre les cycles du folate et de la méthionine)

La MS joue un rôle intermédiaire entre le cycle des folates et celui de la méthionine. Elle catalyse la reméthylation de l'Hcy en Met dans le cycle de la méthionine en utilisant le groupement méthyle du 5-MeTHF du cycle des folates. La méthionine exogène ou régénérée à partir de l'homocystéine est utilisée comme précurseur de la S-adenosyl-méthionine (SAM), le donneur de groupe méthyle pour les réactions de transméthylation de divers composés. Cette réaction produit également de la S-adenosyl-homocystéine (SAH). La S-adenosylhomocystéine hydrolase (AHCY=SAHH) catalyse la réaction de transformation de la SAH qui produit l'Hcy et l'adénosine (Ado). L'Hcy produite est utilisée soit pour la régénération de la Met dans la voie de reméthylation, soit catabolisée pour la synthèse de la cystéine en utilisant la vitamine B6 co-cofacteur dans la voie de transulfuration. Dans le cycle des folates, la formation du 5-MeTHF dépend de la N5,10méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) qui catalyse la réduction du méthylèneTHF en 5-meTHF.



D'après (Wolthers and Scrutton 2009)

Figure 6 : Synthèse de la Mecbl et réactivation de MS (MTR) par MSR (MTRR)

La MS, protéine codée par le gène MTR, utilise le groupement méthyle du 5-MeTHF, pour former le tétrahydrofolate (THF) et la Methyl (III)alamin, un intermédiaire réactionnel pour la reméthylation de l'homocystéine (HCy) en méthionine (Met). Une fois toutes les 2000 réactions environ, la cbl se trouve sous forme oxydée (Cob (II)alamin). La protéine MSR codée par le gène MTRR intervient pour réactiver la cbl par une réaction réductrice pour transformer la cbl en Mecbl en utilisant le groupement méthyle de la SAM.

- La Méthionine

La méthionine présente dans les cellules provient de deux sources : la méthionine exogène apportée par l'alimentation et la méthionine synthétisée à partir de l'homocystéine (Fig. 5). Lorsqu'elle n'est pas utilisée dans la cellule pour la synthèse protéique, la Met est convertie en SAM. La synthèse de méthionine peut être effectuée par deux enzymes :

- la MS qui utilise la cbl pour pouvoir transférer le groupement méthyle des folates
- la Bétaine Homocystéine transférase (BHMT) qui utilise le groupement méthyle de la bétaine

La BHMT est très exprimée dans le foie et le rein (Delgado-Reyes et al. 2001) ; (Wright et al. 2007) et joue un rôle très important dans la production de Met dans ces tissus. Cette réaction est néanmoins utilisée alternativement par rapport à celle de la MS.

- Les Méthionine adénosyltransférases

L'étape suivante du cycle de la méthionine est la synthèse de SAM à partir de la Met et de l'adénosine triphosphate (ADP) par la méthionine adénosyltransférase (MAT). La MAT est une enzyme possédant plusieurs isoformes tissu-spécifique : deux isoformes spécifiques du foie, MATI et MATIII, constituées respectivement de quatre ou de deux sous-unités du produit du gène *MAT1A* et *MATII*, constituée des produits des gènes *MAT2A* (sous-unité catalytique) et *MAT2B* (sous-unité régulatrice). Il a été montré qu'un dysfonctionnement de *MAT1A* est liée génétiquement à un trouble métabolique inné de l'hyperméthioninémie (Gaull and Tallan 1974) ; (Ubagai et al. 1995).

- S-adénosyl-méthionine, S-adénosyl-homocystéine

La SAM formée est le donneur universel de groupement méthyle dans les réactions de transméthylation biologique, servant de substrat à une multitude de méthyltransférases (MT). Ces enzymes sont impliquées dans de nombreuses voies cellulaires et sont responsables de la méthylation de métabolites, d'ADN, d'ARN et de protéines (Finkelstein 1990) y compris les histones. (Mentch and Locasale 2016b). Le groupe méthyle de la SAM peut aussi servir pour méthyler de nombreux composés d'importance vitale tels que la créatine, l'épinéphrine et la sarcosine. Après transfert du groupe méthyle par les MTs, la S-adénosylhomocystéine (AdoHcy=SAH) est formée et transformée en Hcy et en adénosine (Ado) par la S-adénosylhomocystéine hydrolase (AHCY=SAHH).

- **Production et métabolisme de l'homocystéine**

L'Hcy produite par hydrolyse de la SAH, est à nouveau disponible pour redémarrer un nouveau cycle de transfert de méthyle. Soit l'Hcy est re-méthylée en méthionine par la MS, soit elle est combinée à de la sérine pour former la cystathionine par la cystathionine bêta-synthase (CBS) dépendante de la vitamine B6, au début de la voie de transsulfuration. La voie de reméthylation sert ainsi à conserver et régénérer la méthionine à partir de l'Hcy et au contraire, la voie de transsulfuration sert à cataboliser de manière irréversible l'Hcy lors de la synthèse de la cystéine (Fig. 5). L'hydrolyse de la SAH est une réaction réversible, préférentiellement orientée vers la synthèse de Hcy et des concentrations cellulaires élevées de SAH précèdent et accompagnent toutes les formes d'hyperhomocystéinémie.

L'accumulation d'Hcy dans la cellule a été associée à des effets toxiques tels que des cassures d'ADN, un stress oxydatif (SO), un stress du réticulum endoplasmique (RE), une homocystéinylation des protéines et de l'apoptose (Mattson and Shea 2003) ; (Akchiche et al. 2012); (Ghemrawi et al. 2013) ; (Jeong et al. 2017). L'hyperhomocystéinémie a été mise en évidence dans plusieurs pathologies incluant des maladies cardiovasculaires (de jaeger et al. 2010), neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, épilepsie, démence, schizophrénie, dépression etc.) (Murray and Jadavji undefined/ed) des problèmes d'anémie, des fonctions cognitives, une faiblesse musculaire, cancer colorectal , un défaut de fermeture du tube neural, des maladies inflammatoires chroniques du tube digestif, dégénérescence maculaire, ostéoporose (de jaeger et al. 2010).

- **Potentiel de méthylation cellulaire (SAM/SAH) : lien entre le métabolisme de la vitamine B12 et réactions de transméthylation**

Le ratio SAM/SAH est un indicateur important de l'index de méthylation des substrats cellulaires (Finkelstein 2007) . Une altération du métabolisme des monocarbone influence le potentiel de méthylation cellulaire via une diminution du rapport SAM/SAH par une diminution du taux de SAM, une augmentation de SAH ou des deux. Cette diminution de l'index de méthylation a été associée à une modification des mécanismes épigénomiques incluant la méthylation de l'ADN, l'ARN, les protéines dont les histones et les régulateurs de l'expression des gènes (Guéant et al. 2013b) ; (Mentch and Locasale 2016a). La méthylation de la chromatine incluant les bases cytosine des îlots CpG d'ADN (Feil 2009) et celle des histones sur les résidus lysine et arginine (Mosammaparast and Shi 2010), affectent directement l'activité et la fonction des protéines de liaison à l'ADN, ce qui régule l'expression des gènes.

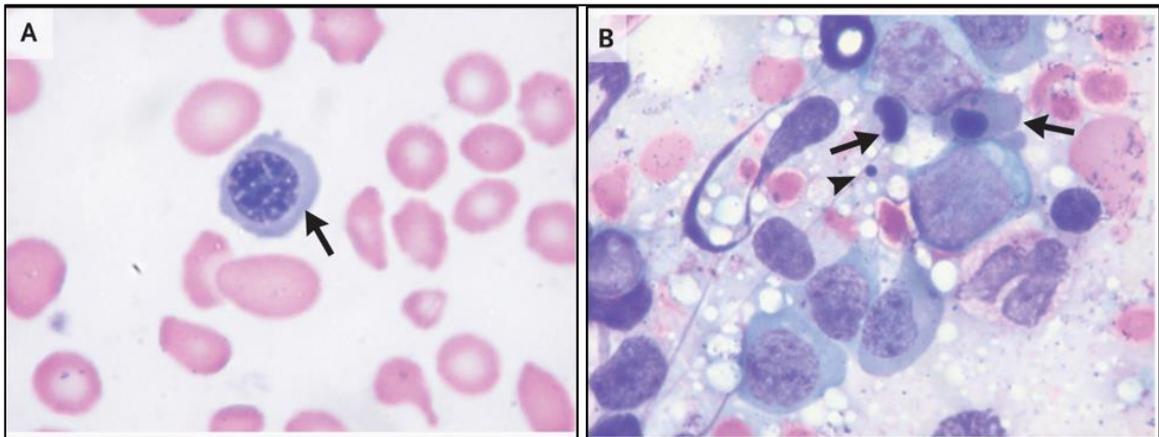
La méthylation de l'histone et de l'ADN sont liées et régulées de manière coordonnée (Ciccone et al. 2009).

III. Carence en vitamine B12, manifestations cliniques et traitements

La carence en cbl est relativement fréquente dans la population générale. Elle a été décrite pour la première fois en 1849 et a été considérée comme maladie fatale jusqu'en 1926 lorsqu'un régime à base de foie, riche en cbl, a ralenti l'évolution de la maladie. Selon des études menées par Andrès et al, la prévalence de la carence en cbl peut varier de 15 à 40% en fonction du seuil considéré (Andrès et al. 2004).

Cliniquement, les patients présentent principalement des problèmes hématologiques incluant une anémie mégaloblastique (Fig. 7) et/ou des problèmes neurologiques démyélinisant. L'anémie mégaloblastique peut être réversible tandis que les problèmes neurologiques sont le plus souvent persistants même après traitement (Stabler, 2013). La carence en cbl induit également d'autres types de symptômes qui affectent plusieurs tissus chez les patients. Il s'agit de symptômes d'ordre ophtalmologique (atrophie optique, rétinite pigmentaire, cécité), neurologique (défauts cognitifs, myélopathie, microcéphalie), neuromusculaire (hypotonie, léthargie, spasticité musculaire, troubles de la marche), hépatique (stéatose hépatique), cardiaque (cardiomyopathie) en plus des désordres métaboliques d'homocystinurie et acidurie méthylmalonique (Fig. 8).

Le traitement recommandé inclut soit des injections intra-musculaire (IM) d'OH-cbl et de CN-cbl (Carmel 2008) dont environ 10% de la dose (100 sur 1000 µg) est retenue, soit un traitement orale à forte dose (Berlin et al. 1968) dont 1-4% de la dose est absorbée passivement (5 à 40 µg sur 1000 µg). Le choix de la voie d'administration dépend de la carence identifiée et des lignes directrices bien définies ont été formulées (Carmel et al. 2003) ; (Stabler, 2013). La carence en cbl peut ainsi, être classée en trois catégories : les carences nutritionnelles, les syndromes de malabsorption et autres causes gastro-intestinales et enfin des carences dues à des causes génétiques (Carmel et al. 2003) ; (Stabler, 2013). Les carences liées aux troubles héréditaires affectant l'absorption, le transport et l'utilisation intracellulaire de la cbl sont considérées comme étant sévères.

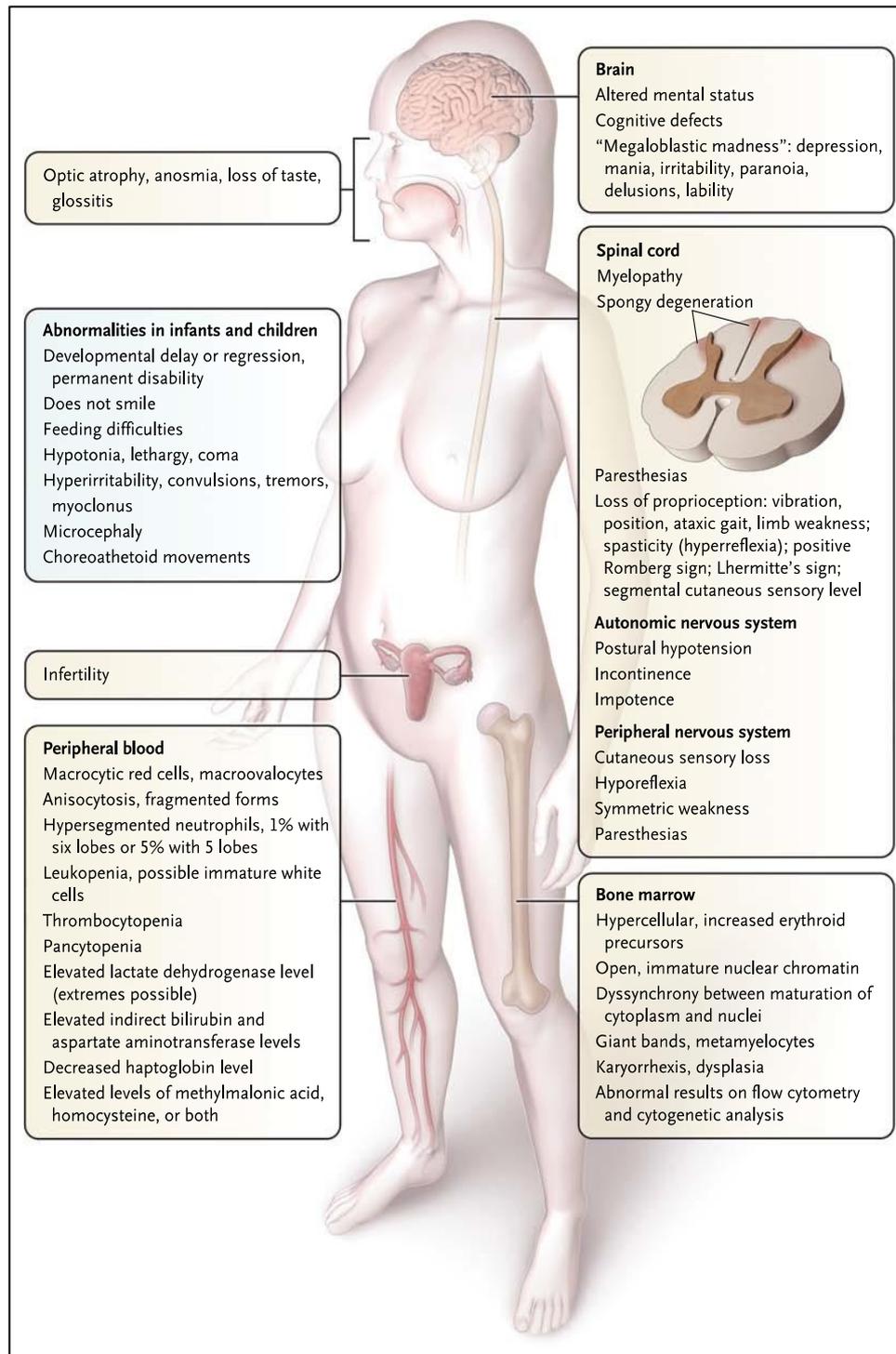


(Stabler 2013)

Figure 7 : Cellules sanguines périphériques et moelle osseuse d'un patient avec une carence en cbl

A. Frottis sanguin périphérique : le frottis sanguin montre des macrocytes ovaux, des cellules fragmentées à deux formes et un globule rouge nucléé mégaloblastique immature (flèche) noire.

B. Moelle osseuse : plusieurs cellules mégaloblastiques sont présentes incluant des gros érythroblastes et autres précurseurs de globules rouges. Il existe une dyssynchronie entre la maturation de cytoplasme et celui des noyaux dans les précurseurs ultérieurs de globules rouges et de granulocytes. Plusieurs précurseurs de globules rouges possèdent des noyaux dysplasiques (flèches), avec des fragments nucléaires (tête de flèche) compatibles avec l'apoptose cellulaire et l'hémolyse intramédullaire qui en résulte. (Photographies autorisées dans les travaux de (Stabler 2013) par John W. Ryder, M.D., département de pathologie, School of Medicine de l'Université du Colorado).



(Stabler, 2013)

Figure 8 : Différents types de pathologies associées à une carence en cbl

Les patients présentant une carence en cbl dues à des défauts génétiques du métabolisme présentent différents types de symptômes d'ordre ophtalmologique, neurologique, neuromusculaire, métabolique hépatique, cardiaque ou encore hématologique.

La carence en cbl peut être classée en trois catégories : les carences nutritionnelles, les syndromes de malabsorption et autres causes gastro-intestinales et enfin des carences dues à des causes génétiques (Carmel et al. 2003).

III.1. Déficit d'apport

Les déficits d'apport sont rencontrés plus fréquemment dans les pays en voie de développement où l'approvisionnement en alimentation d'origine animale est souvent insuffisant. Dans les pays développés, cette carence est plutôt la conséquence d'une malnutrition chez :

- les sujets végétaliens et les ovo-lacto-végétariens avec un régime alimentaire strict
- les sujets alcooliques chroniques chez lesquels la consommation d'alcool entraîne indirectement une malnutrition par maldigestion ou malabsorption liée aux complications organiques (foie, pancréas, intestin grêle).
- les personnes âgées qui présentent des difficultés à s'alimenter correctement avec l'âge. La prévalence de la carence en cbl chez les sujets âgés de plus de 65 ans a été estimée à 10% (Fernández-Roig et al. 2012)(Urbanski et al. 2015) contre 1 à 2% dans la population générale.
- les femmes enceintes et allaitantes qui voient aussi leurs besoins augmentés pendant cette période (Salinas et al. 2018).

III.2. Défauts génétiques du métabolisme de la cbl

Les troubles génétiques affectent le métabolisme de la cbl à plusieurs niveaux (Guéant et al. 2014) :

- l'absorption digestive : déficit en FI et Imerslund – Gräsbeck)
- le transport sanguin : déficit en TCII et HC
- le métabolisme intracellulaire de la cbl

Tous ces défauts génétiques sont hérités d'un trait autosomique récessif et les causes les plus fréquentes d'une carence en cbl sont les maladies liées à son absorption digestive.

A. Défaits génétiques de l'absorption digestive et transport sanguin

- Déficit en Facteur Intrinsèque (FI) héréditaire et Syndrome d'Imerslund – Gräsbeck

Le déficit en FI représente le trouble classique rencontré parmi les maladies liées à l'absorption digestive. Il est connu sous le nom d'anémie pernicieuse (AP) ou maladie de Biermer (MB) et représente environ 20 à 50% des causes de carence en cbl chez l'adulte (Andrès et al. 2005). Il est dû à des mutations dans les gènes qui codent pour le FI (*GIF*) sur le chromosome 11q13 (Ament et al. 2009) et pour les composants du récepteur cubam (Gräsbeck 2006) (*CUBN* sur le chromosome 10p12.1 et *AMN* sur le chromosome 14q32 (Tanner et al. 2004) qui assurent la réabsorption tubulaire des protéines urinaires primaires.

C'est une maladie auto-immune affectant les cellules pariétales gastriques qui sont responsables de la production de l'acide chlorhydrique (HCl) et du FI. Dans certains cas, le FI n'est pas produit par les sécrétions gastriques alors que dans d'autres, le FI est produit mais dysfonctionnel. La maladie se caractérise par une sécrétion altérée du FI, une sécrétion normale du HCl et l'absence d'atrophie des cellules pariétales et d'anticorps anti-FI (Carmel 1983a). Le FI possède alors, soit une faible affinité pour la cbl (Watkins and Rosenblatt 2011) ou le récepteur cubam, soit une sensibilité importante à la protéolyse (Katz et al. 1972) ; (Yang et al. 1985) ; Au niveau de l'intestin, l'absorption de la cbl alimentaire est également altérée mais, elle peut être rétablie par une alimentation en FI exogène alors que dans le cas d'un syndrome d'Imerslund–Gräsbeck, le déficit en FI n'est pas corrigé. Chez les patients atteints de déficit en FI et de syndrome d'Imerslund–Gräsbeck, le taux sérique de cbl est diminué, accompagné d'une hyperhomocystéinémie/homocystinurie et d'une acidémie/acidurie méthylmalonique. Cliniquement, les patients présentent un retard de croissance et des symptômes d'anémie mégalo-blastique. Si les symptômes persistent, des problèmes neurologiques apparaissent.

Le traitement proposé est une injection en IM d'OH-cbl ou de CN-cbl pour éviter la voie d'absorption intestinale qui est défectueuse. Les patients répondent plutôt bien au traitement tant que le taux de cbl circulant dans le sang est maintenu à un niveau approprié (Watkins and Rosenblatt 2011). Récemment, une forme congénitale du syndrome d'Imerslund–Gräsbeck chez un enfant a été décrite et la mise en place du traitement a permis une rémission complète du système hématologique bien que la macrocytose des globules rouges persistait (Kvezereli-Kopadze and Mtvarelidze 2019).

- **Déficit en Transcobalamine II (TCII)**

Ce trouble est caractérisé par des mutations dans le gène *TCN2* sur le chromosome 22q11.2–qter. Il se manifeste généralement au cours des premiers mois de vie par un retard de croissance, des vomissements et des faiblesses musculaires associés à une anémie mégalo-blastique (Cooper and Rosenblatt 1987). Si la maladie n'est pas traitée, un déficit immunologique et des problèmes neurologiques peuvent également se développer (Hall 1992).

Le traitement consiste en une administration par voie orale (VO) ou IM d'OHcbl ou de CN-cbl afin de maintenir des concentrations sériques en cbl très élevées de l'ordre de 1000-10000 pg/ml.

- **Déficit en Haptocorrine (HC)**

Le déficit en HC est causé par des mutations dans le gène *TCN1* situé dans le chromosome 11q11–q12 et la maladie se manifeste par une diminution des taux sériques en cbl, mais sans signes cliniques cohérents caractéristiques d'une carence en cbl. Une étude a montré que deux patients avec un déficit en HC présentaient une numération sanguine, un taux d'homocystéine et d'acide méthylmalonique ainsi qu'un test neurologique normaux mais ils souffraient de dépression et d'anxiété. Ces symptômes n'ont pas été corrigés malgré un traitement à la cbl (Carmel 1983b). Une autre étude réalisée chez des patients montrait un faible taux de cbl sérique inexplicable dans 15% des cas (Carmel 2003) alors que dans d'autres cas de déficit en HC, le taux de cbl est normal. Par la suite, Carmel et son équipe ont montré que les patients homozygotes mutés en HC présentaient un faible taux sérique en cbl alors que chez les hétérozygotes, le taux de cbl était légèrement faible voire normal (Carmel et al. 2009).

- **Déficit en récepteur à la transcobalamine II (CD320)**

L'équipe de Quadros a décrit une délétion de 3 nucléotides dans le gène CD320 du chromosome 19p13.2 de cinq patients qui code pour le récepteur cellulaire de la TCII. La délétion entraîne la perte d'un résidu glutamate dans le domaine extracellulaire du récepteur, ce qui provoque une perte de l'absorption cellulaire de la TCII in vitro (Quadros et al. 2010). Le dépistage se fait à la naissance et la maladie se manifeste par la présence d'une hyperhomocystéinémie/hyperhomocystéinurie et d'une acidémie/acidurie méthylmalonique. Cependant, les patients sont asymptomatiques.

Tableau 3 : Défaits génétiques du métabolisme digestif et du transport sanguin de la cobalamine

Désordres	Numéro MIM	Gène impliqué	Localisation	Conséquence pathologique
Déficit en Facteur Intrinsèque	261000	<i>FI</i>	11q13	Anémie mégaloblastique
Syndrome de Imerslund-Gräsbeck	261100	<i>AMN</i> <i>CUBN</i>	14q32 10p12.1	Anémie mégaloblastique
Déficit en Transcobalamine II	275350	<i>TCN II</i>	22q11.2-qter	Déficit en TCII
Déficit en Haptocorrine	193090	<i>TCN I</i>	11q11-q12	Déficit en TC I

- Défauts génétiques du métabolisme intracellulaire

Les maladies héréditaires ou erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la cbl sont des maladies rares et multi-systémiques dues à des défauts génétiques à caractère autosomiques récessifs. Elles sont associées à des mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse ou le transport intracellulaire de co-facteurs actifs dérivés de la cbl (Watkins and Rosenblatt 2011). Les patients présentent un phénotype et un âge d'apparition de la maladie qui est variable et grave selon l'emplacement du défaut génétique dans le métabolisme intracellulaire de la cbl.

Le diagnostic d'un trouble du métabolisme intracellulaire de la cobalamine chez un individu symptomatique repose sur des données génétiques cliniques, biochimiques et moléculaires. Pour les données moléculaires, il s'agit de l'identification de variants pathogènes bi-alléliques dans l'un des gènes suivants (groupes de complémentation correspondants indiqués entre parenthèses) : *MMAA* (cblA), *MMAB* (cblB), *MMACHC* (cblC), *MMADHC* (cblD, cblD variant 1, cblD variant-2), *MTRR* (cblE), *LMBRD1* (cblF), *MTR* (cblG), *ABCD4* (cblJ), *THAP11/ZNF143/HCFC1* (cblX) et *MUT* (mut). Ces troubles génétiques ont été décrits dans le tableau 4. Ils sont nommés selon la chronologie de leur découverte et affectent la capacité à générer ou à utiliser les deux cofacteurs Mecbl et Adocbl, nécessaires pour les activités enzymatiques de la MS et de la MCM (Watkins and Rosenblatt 2011). L'emplacement de chaque défaut génétique au niveau du métabolisme intracellulaire de la cbl est représenté dans la Fig. 9.

Au niveau biochimique, les défauts génétiques peuvent donner lieu à un déficit fonctionnel en MCM (cblA, cblB, cblD variant 2, mut) entraînant une acidurie méthylmalonique (MMA) isolée, un déficit fonctionnel en MS (cblD variant 1, cblE et cblG) entraînant une homocystinurie (Hcy) isolée ou les deux (cblC, cblX, cblD classique, cblF et cblJ), entraînant une MMA et une Hcy combinées. Chez certains patients, seule une accumulation de MMA est observée, mais aucune cause génétique n'a été identifiée parmi les défauts génétiques déjà connus malgré le séquençage du génome et du transcriptome (Abdrabo et al. 2019).

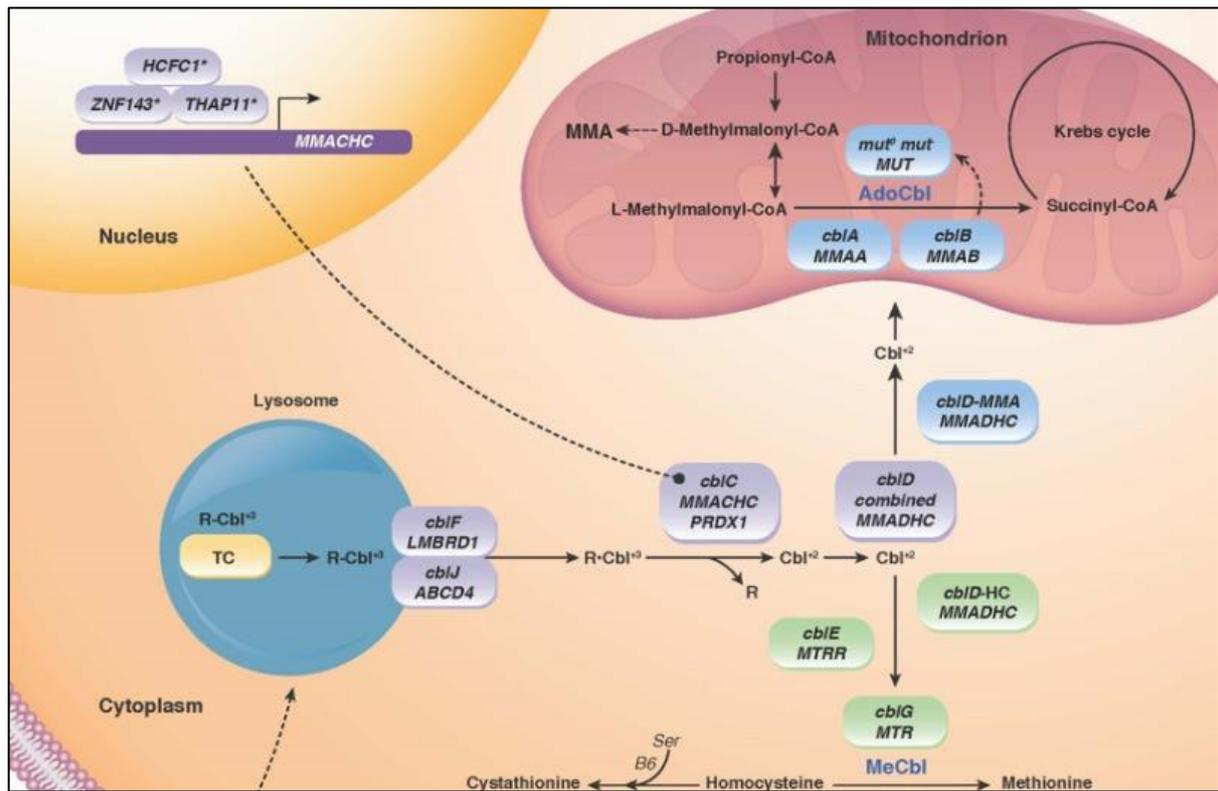
Sur le plan clinique, les patients présentent des manifestations principalement hématologiques (anémie mégalo-blastique, neutropénie, thrombocytopénie) et neurologiques (dégénérescence subaiguë de la moelle épinière, démence, psychose, etc). Cependant, d'autres organes peuvent également être affectés, ce qui conduit à l'apparition de symptômes neuromusculaires, ophtalmologiques, hépatiques et cardiaques.

Le traitement de base consiste essentiellement en une injection quotidienne en intraveineuse (IV) d'OH-cbl pendant les premiers jours, puis à des injections intramusculaires (IM) hebdomadaires de 1 à 2 mg / dose. L'ajout de bétaïne (3–6 g / jour), d'acide folique (5 mg / jour) et de carnitine (50–100 mg / kg / jour) est parfois envisagée. (Baulny et al. 1998) ; (Andrès et al. 2009). Dans la plupart des cas, le traitement permet la correction de l'anémie tandis que les désordres neurologiques restent irréversibles.

Tableau 4 : Défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la cobalamine

Groupe de complémentation	Numéro MIM	Gène	Localisation chromosomique Taille / Exons	Protéine	Anomalie Biochimique
cbIA	251100	<i>MMAA</i>	4q31.21 39kb / 6 ex	MMAA	Acidémie méthylmalonique
cbIB	251110	<i>MMAB</i>	12q24.11 19.8kb / 9 ex	MMAB	Acidémie méthylmalonique
cbIC	277400	<i>MMACHC</i>	1p34.1 10.8kb / 5 ex	MMACHC	Homocystéinémie et Acidémie méthylmalonique
cbID-variant 1	277410	<i>MMADHC</i>	2q23.2 18kb / 7 ex	MMADHC	Homocystéinémie
cbID-variant 2	277410	<i>MMADHC</i>	2q23.2 18kb / 7 ex	MMADHC	Acidémie méthylmalonique
cbID	277410	<i>MMADHC</i>	2q23.2 18kb / 7 ex	MMADHC	Homocystéinémie et acidémie méthylmalonique
cbIE	236270	<i>MTRR</i>	5q15.2 32kb / 14 ex	MSR	Homocystéinémie
cbIF	277380	<i>LMBRD1</i>	6q13 121kb / 31 ex	LMBD1	Homocystéinémie et acidémie méthylmalonique
cbIG	250940	<i>MTR</i>	1q42.3 1400.3kb / 31 ex	MS	Homocystéinémie
mut	251000	<i>MUT</i>	6p12.3 30kb / 13ex	MCM	Acidémie méthylmalonique
cbIJ	614857	<i>ABCD4</i>	14q24.3 18 kb/19 ex	ABCD4	Homocystéinémie et acidémie méthylmalonique

d'après (Quadros 2010) ; (Coelho et al. 2008) ; (Quintana et al. 2014)



(Sloan et al., 1993)

Figure 9 : Défaits génétiques du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12

Les gènes impliqués dans le transport intracellulaire de la vitamine B12 peuvent être affectés par différents défauts génétiques classés *cbIA* à *cbIJ* et *mut*. Les défauts génétiques sont classés selon leur ordre de découverte.

L'administration d'une forte dose de 1 ou 2 mg/jour par VO est tout aussi efficace qu'une injection en IM pour le traitement de l'anémie, mais la voie IM semble toutefois beaucoup plus efficace en terme de rapidité d'amélioration (Langan and Goodbred 2017). C'est pourquoi il est recommandé que le traitement par VO soit réservé aux patients ayant un déficit en cbl moins grave (Bjørke- Monsen and Ueland 2011).

a. Les défauts génétiques cblA, cblB et mut

Les troubles génétiques cblA (MIM #251100), cblB (MIM #251110) et mut (MIM #251000) sont causés respectivement par des mutations au sein des gènes *MMAA* (Dobson et al. 2002b) du chromosome 4q31.1 – q31.2 (Lerner- Ellis et al. 2004), *MMAB* (Dobson et al. 2002a) du chromosome 12q24 (Lerner-Ellis et al. 2006a) et *MUT* du chromosome 6p12.3 (Ledley et al. 1988). Le défaut génétique mut peut être classé en deux sous-groupes de déficit enzymatique de la MCM (Willard and Rosenberg, 1980) :

- défaut génétique mut⁻ caractérisé par la présence d'une activité résiduelle de la MCM et une concentration élevée d'Adocbl
- défaut génétique mut⁰ caractérisé par l'absence d'activité de la MCM

Ces trois désordres sont connus pour affecter la synthèse, le transport ou l'utilisation de l'Adocbl (Fig. 9). La conséquence est une accumulation de MMA dans le sang et les urines et une réduction de l'activité enzymatique de la protéine MCM (Watkins and Rosenblatt 2011), on parle alors d'une acidémie/acidurie méthylmalonique isolée. Sur le plan clinique, l'âge de déclenchement de la maladie va de la période néonatale à l'âge adulte. Dans la période néonatale, apparaissent un retard de croissance, une léthargie, une hypotonie, des vomissements récurrents, une déshydratation et une détresse respiratoire (Hörster et al. 2007). Une acidocétose et une acidose lactique sévères, une hyperammoniémie, une hyperglycémie, une hypoglycémie, une neutropénie, une anémie ou une pancytopenie sont fréquemment observées (Hörster and Hoffmann 2004) .

Le traitement proposé est une injection en IM d'OH-cbl qui s'avère relativement efficace dans la diminution du taux d'homocystéine et/ou d'acide méthylmalonique chez certains patients.

b. Les défauts génétiques cblC/cblD

Les défauts cblC (MIM # 277400) et cblD (MIM # 277410) sont causés par des mutations dans les gènes *MMACHC* et *MMADHC*. Le gène *MMACHC* code pour une protéine qui assure plusieurs fonctions (transport, enzyme de décyanation et déalkylation) de la cbl au niveau intracellulaire et le gène *MMADHC* code pour une protéine impliquée dans l'orientation de la cbl soit dans la mitochondrie pour la synthèse de l'Adocbl, soit dans le cytoplasme pour la synthèse de la Mecbl (Stucki et al. 2012).

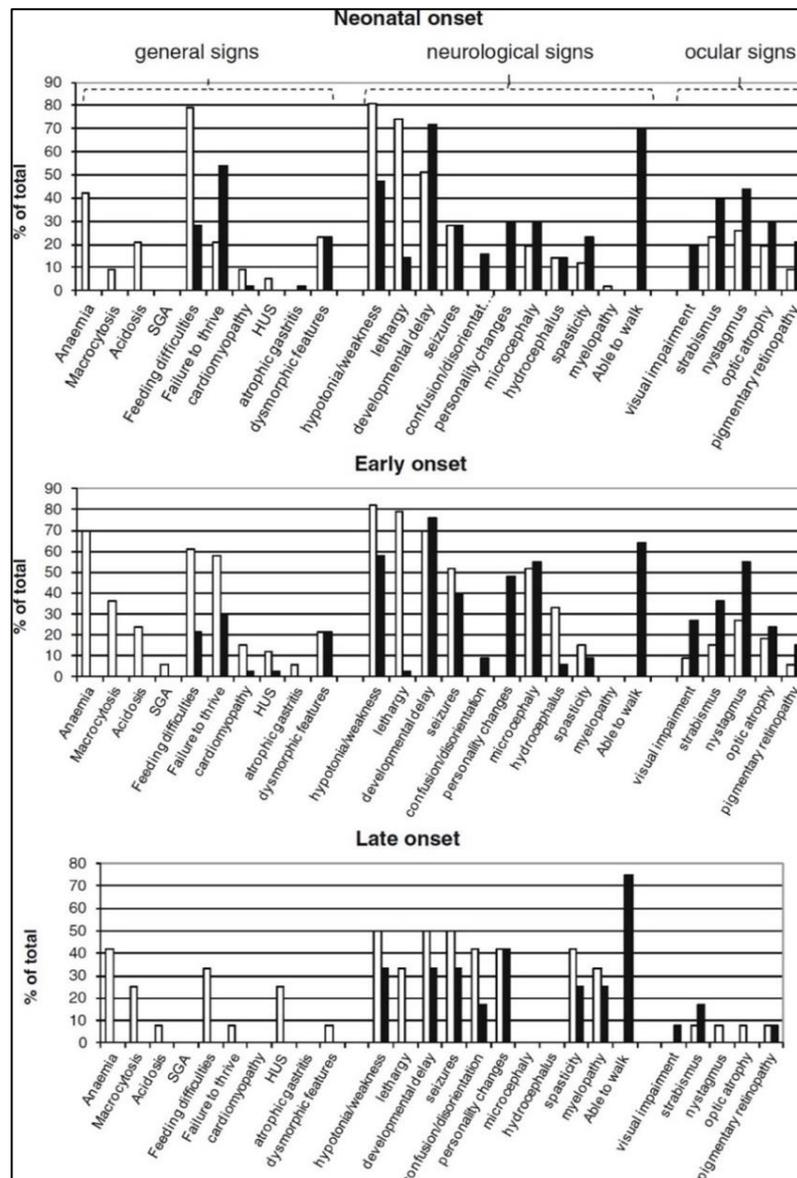
- Défaut génétique ou groupe de complémentation cblC

Avec plus de 500 patients connus dans le monde, le défaut cblC est le trouble le plus fréquemment rencontré parmi les erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la cbl (Lerner-Ellis et al. 2006b) ; (Lerner-Ellis et al. 2009) ; (Liu et al. 2010). Ce trouble génétique provoque chez les patients des symptômes cliniques d'une nature et d'une sévérité très variable selon l'âge d'apparition de la maladie (Fig. 11). Environ 70 mutations différentes ont été identifiées parmi lesquelles on retrouve les formes c.271dupA et c.331C> T qui ont été associées respectivement à une maladie d'apparition précoce (<1 an) et tardive (> 4 ans) (Morel et al. 2006) ; (Lerner-Ellis et al. 2009). La mutation c.271dupA est associée à une présentation clinique très sévère (Fischer et al. 2014). Récemment, une nouvelle étude a montré que le défaut cblC pouvait aussi être provoqué par une mutation qui n'affecte qu'un seul allèle du gène, l'autre allèle subissant une modification appelée « épimutation » qui est produit par une mutation dans le gène adjacent *PRDX1* (Peroxyredoxin 1) (MIM # 277400). L'épimutation d'un des allèles de *MMACHC* qui est non mutée, affecte son expression (Guéant et al. 2018).

Les symptômes cliniques se manifestent généralement par un retard de développement, des difficultés d'alimentation, une anémie mégaloblastique et des problèmes neurologiques tels qu'une hypotonie et une atrophie cérébrale. Des malformations cardiaques ont aussi été reportées (Profitlich et al. 2009). Contrairement aux autres défauts génétiques, le défaut cblC se caractérise fréquemment par des anomalies ophtalmologiques particulières (Fig. 11) chez les patients (rétinites pigmentaires, atrophie optique, maculopathie) (Schimel and Mets 2006) ; (Fischer et al. 2014) ; (Bacci et al. 2017)

Le traitement implique une injection en IM d'OH-cbl et dans d'autre cas l'OH-cbl est associée à d'autres agents notamment de la bétaine pour contrôler le niveau d'Hcy.

Malgré l'introduction du traitement, jusqu'à un tiers des patients avec des défauts cblC précoces sont décédés et ceux qui répondent au traitement continuent à présenter un certain degré de déficience neurologique irréversible (Rosenblatt et al. 1997).



(Fischer et al. 2014)

Figure 10 : Signes cliniques généraux, neurologiques et oculaires chez les patients cblC, au début et au cours de l'évolution de la maladie

Les pourcentages de patients présentant la pathologie indiquée sont représentés par des barres claires (lors du diagnostic) et des barres foncées (au cours de la maladie). Les pourcentages ont été représentés en fonction de l'âge des patients lors du diagnostic (<1 mois ou néonatal, <1 an ou précoce et tardif).

c. Les défauts génétiques cblF/J

Les mutations induites dans les gènes *ABCD4* et *LMBRD1* sont responsables respectivement des défauts génétiques cblJ (MIM # 614857) et cblF (MIM #277380) (Watkins and Rosenblatt 1986). Le gène *LMBRD1* sur le chromosome 6q13 code pour une protéine membranaire lysosomale contenant 9 domaines transmembranaires (Rutsch et al. 2009a) et le gène *ABCD4* sur le chromosome 14q24.3 code pour un transporteur ABC à activité ATPase (Coelho et al. 2012b) . Ces protéines membranaires lysosomales forment un complexe nécessaire à la translocation de la cbl du lysosome vers le cytoplasme (Deme et al. 2014). Dans une étude récente, il a été montré qu'une mutation dans le gène *ABCD4* perturbe l'interaction entre les protéines de transport *LMBD1* et *ABCD4* (Fettelschoss et al. 2017). La maladie apparaît au cours de la première année de vie avec la présence d'une hyperhomocystéinémie et une acidémie méthylmalonique ainsi que des caractéristiques cliniques très variables incluant un retard de croissance une hypotonie, une léthargie, des difficultés d'alimentation, une anémie mégaloblastique, une suppression de la moelle osseuse et des malformations cardiaques. Des malformations congénitales ainsi qu'une hyperpigmentation ont également été décrites chez les patients cblF. Chez les patients cblJ, il a été observé une hypopigmentation des cheveux qui étaient gris, ce qui les distingue des autres défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la cbl (Kim et al. 2012) ; (Takeichi et al. 2015); (Fettelschoss et al. 2017).

d. Les défauts génétiques cblG/E

Les défauts cblG (MIM # 250940) et cblE (MIM # 236270) sont causées respectivement par des mutations dans les gènes *MTR*, locus 1q43 et *MTRR*, locus 5p15.31. Les mutations du gène *MTR* qui code pour la méthionine synthase (MS) sont responsables d'une diminution de l'activité enzymatique de la MS. Les patients cblG sont également classés en deux sous-groupes :

- patients sans aucune activité résiduelle mesurable de la MS associée à l'absence de l'expression de l'isoforme active de la MS (cblG variant)
- patients avec par une activité résiduelle de la MS et la présence de deux isoformes de la MS (cblG-classique) (Fofou-Caillierez et al. 2013). Les deux isoformes de la MS peuvent interagir avec MMACHC et la forme inactive de la MS pourrait conduire à une diminution de l'activité de MMACHC.

La majorité des patients cblG et cblE, présentent plus fréquemment un retard de croissance, des problèmes d'alimentation, une hypotonie musculaire, des troubles cognitifs, et une anémie macrocytaire et ces symptômes restent persistant malgré mise en place du traitement (Huemer et al. 2014a).

- Défaut génétique ou groupe de complémentation cblG

Il a été référencé environ 50 cas de patients cblG dans le monde avec 41 mutations différentes (Huemer et al. 2014b). La maladie se déclenche généralement au cours des premières semaines de vie ou dans la petite enfance (Zavadáková et al. 2005) mais des patients adultes ont également été décrits.

Tout comme chez les patients cblC, les principales manifestations cliniques observées chez les patients cblG sont d'ordre hématologique et neurologique. Parmi les désordres neurologiques, nous retrouvons plus fréquemment un retard de croissance, des troubles du développement, des défauts cognitifs, des anomalies du tonus musculaire, mais également des désordres hématologiques telle qu'une anémie mégalo-blastique. Le schéma clinique des symptômes est commun chez les patients cblC et cblG (Tableau 5) avec des problèmes incluant une difficulté à s'alimenter et un retard de croissance, des troubles développementaux et défauts cognitifs, des troubles de la marche/hypotonie, une anémie mégalo-blastique. Cependant, comme le montre le tableau 5, certains désordres sont retrouvés beaucoup plus fréquemment chez les patients cblG que chez les patients cblC (Huemer et al. 2017). Par exemple, les troubles ophtalmologiques semblent être beaucoup plus fréquent chez les patients cblC alors que la plupart des désordres hématologiques et neurologiques apparaissent beaucoup plus fréquemment chez les patients cblG que chez les patients cblC (Tableau 5). Bien que les patients cblG aient aussi des problèmes visuels, certaines pathologies comme la rétinite pigmentaire ne sont observées que chez les patients cblC.

Tableau 5 : Tableau de comparaison des signes cliniques chez les patients cblC et cblG

Troubles	Symptômes	cblC	cblG
Croissance	Difficulté d'alimentation / retard de croissance	+++	++++
Neurologiques	Pertes de conscience +/- apnée	++	+++
	Ataxie	+	++
	Troubles du développement et défauts cognitifs	+++	++++
	Troubles du comportement/mental	++	(+)
	Microcéphalie	++	+
Neuromusculaires	Troubles de la marche et/ou anomalies du tonus musculaire	+++	++++
Ophthalmologiques	Rétinopathie, atrophie optique	+++	++
Hématologiques	Anémie mégaloblastique	++	++++
	Pancytopénie, neutropénie	++	+
Hépatiques	Stéatose hépatique	+	
Cardiaques	Malformations	+	
	Cardiomyopathie	++	

(Huemer et al, 2016)

++++ Très fréquent (> 50%) ; +++ fréquent (25-50%) ; ++ rarement (10-25%) ; + Occasionnellement (<10%) ; (+) cas unique

e. Le défaut génétique cblX

Des mutations dans le gène *HCFC1* (Host Cell Factor C1) situé sur le chromosome X, ont été associées à un défaut génétique appelé cblX (MIM309541), un trouble récessif lié au chromosome X. Ce gène code pour un régulateur de l'expression de *MMACHC* (Yu et al, 2013) ; (Quintana et al. 2014). Il interagit avec des facteurs de transcriptions pour la régulation de nombreux processus biologiques comme la prolifération cellulaire, la migration et la mort cellulaire (Luciano and Wilson 2003) ; (Machida et al. 2009) ; (van den Berg et al. 2010) ; (Yu et al. 2010). Le promoteur de *MMACHC* contient des motifs de liaison conservés pour HCFC1 mais aussi pour son co-régulateur THAP11 (THAP Domain Containing 11) (Dejosez et al. 2010). HCFC1 est connue pour avoir des motifs de liaison pour THAP11 et une autre protéine appelée ZNF143 (zinc finger protein 143) (Michaud et al. 2013). Le complexe HCFC1/THAP11/ZNF143 permet la régulation de la transcription de *MMACHC* (Pupavac et al. 2016) ; (Quintana et al. 2017).

Le défaut cblX, tout comme le défaut cblC, se caractérise par des anomalies du développement du système nerveux, des troubles neurologiques et un retard de croissance (Yu et al, 2013). Chez le modèle animal de poisson zèbre, des anomalies de développement cranio-facial ont été notifiées suite à des mutations dans le gène *HCFC1* (Quintana et al. 2014). Des mutations dans *HCFC1* ont été associées à une déficience intellectuelle liée à X et à de multiples autres anomalies congénitales chez les patients cblX (Gérard et al. 2015) ; (Yu et al. 2013b).

IV. Impact des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 sur les systèmes hématopoïétiques et nerveux

La cbl joue un rôle fondamental dans tous les tissus à renouvellement rapide : peau, muqueuse digestive, tissus hématopoïétique et tissus nerveux (Stabler et al. 1990) ; (Stabler 2013). Une carence en cbl impacte le fonctionnement normal de ces tissus.

IV.1. Implication sur le système hématopoïétique

La méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse le transfert du groupement méthyle du 5-MeTHF à la cbl pour former la Mecbl et le THF (Guéant et al. 2013c). Le THF intervient dans la synthèse des pyrimidines et la synthèse des purines qui sont nécessaires à la synthèse de l'ADN. En cas d'absence ou de déficit fonctionnel de la cbl, il s'ensuit une accumulation du 5-MeTHF ainsi qu'un défaut de réplication de l'ADN. Les cellules en division sont affectées, en particulier celles qui se répliquent rapidement, telles que les cellules de la moelle osseuse. Les mitoses sont donc insuffisantes et les cellules acquièrent une taille anormalement augmentée. Morphologiquement, ces grandes cellules nommées « mégalo blastomes » sont visibles dans la moelle osseuse et présentent une maturation asynchrone du nucléo-cytoplasme en défaveur du noyau (Carmel et al., 2004). Cette anomalie nommée anémie mégalo blastique est due à l'incapacité des cellules hématopoïétiques à se diviser, en raison de l'échec de la réplication de l'ADN.

IV.2. Conséquences sur le système nerveux

Chez l'homme, une carence en vitamine B12 provoque des manifestations du système nerveux central et périphérique (Carmel et al. 2003). La perte de myéline au niveau des nerfs périphériques et de la moelle épinière contribue à la neuropathie périphérique et aux déficits moteurs. La base métabolique de la démyélinisation et des troubles cérébraux est inconnue.

Dans une étude menée par Reynolds, l'administration de cbl pourrait prévenir la survenue de troubles neurologiques chez les personnes âgées (Reynolds, 2006). Battaglia-Hsu et al a montré qu'une carence en cbl induisait une diminution de la prolifération des cellules de neuroblastome humain (Battaglia-Hsu et al. 2009). La carence en vitamine B12 et en folate a été associée à des manifestations neurologiques (Alzheimer et Parkinson, la thrombose, les accidents vasculaires cérébraux) et cardiovasculaires (infarctus du myocarde) bien qu'ils n'aient pas le même rôle

dans le métabolisme des monocarbones (Scalabrino 2009). La carence en vitamine B12 provoque une myélopathie périphérique et centrale, non observée lors d'une carence en folate et une démyélinisation de la moelle épinière (Scalabrino 2009).

Dans un modèle de rat carencé en donneur de groupement méthyle (cbl, folates et choline) durant la gestation et la lactation, il a été observé une perte de mémoire et des troubles neurocomportementaux associés à une hyperhomocystéinémie dans les neurones et les astrocytes. Le retour à un régime normal a permis de rétablir les taux plasmatiques d'homocystéine. Cependant, la persistance des troubles neurocomportementaux suggère que l'homocystéine présente un effet neurotoxique (Blaise et al. 2007) ; (Daval et al. 2009). Chez les femmes enceintes, une carence en B12 a été associée à un risque élevé de défauts de fermeture du tube neural et à une altération des fonctions cognitives de l'enfant (Molloy et al. 2009) ; (Bhate et al. 2008) ; (Caramaschi et al. 2017).

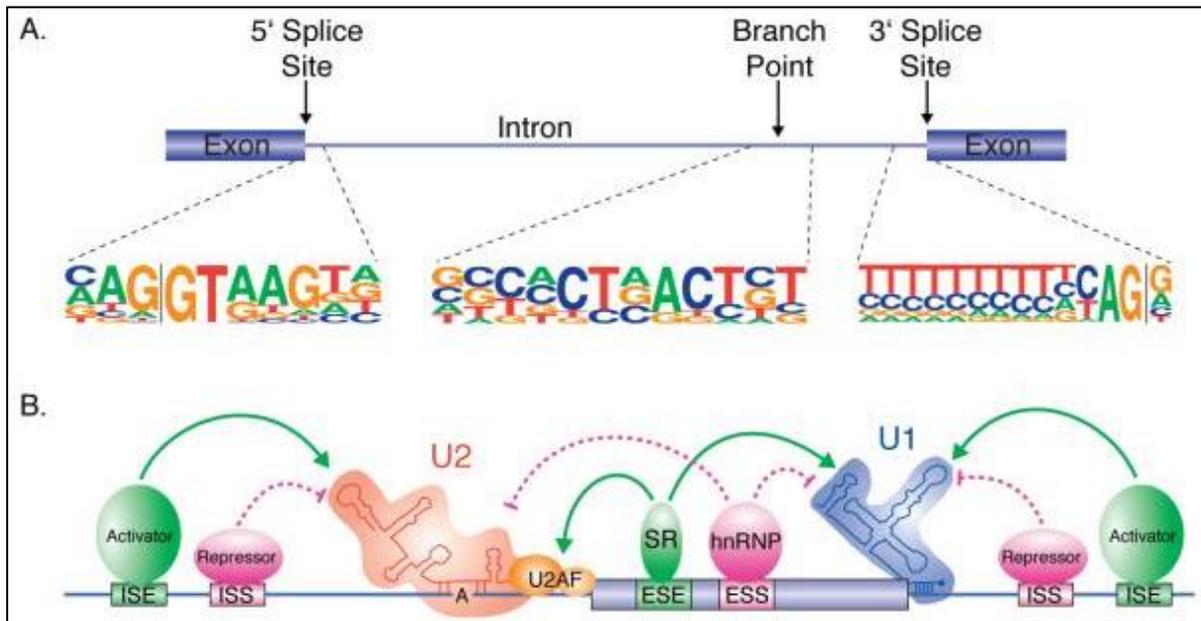
V. Conséquences moléculaires des dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 sur l'apparition des symptômes cliniques

V.1. Régulation de l'expression des gènes

A. Influence sur le transcriptome

Généralités sur l'épissage

L'épissage est un mécanisme qui consiste à éliminer les introns et garder les exons de l'ARN primaire (pré-ARNm) pour produire une molécule d'ARNm mature. Cette réaction est effectuée par une machine moléculaire complexe appelée « spliceosome » composée de cinq petites ribonucléoparticules (RNPs) nucléaires (UR, U2, U4, U5 et U6) et d'un grand nombre de protéines (Will and Lührmann 2011). Ces RNPs s'assemblent au fur et à mesure des étapes de l'épissage. Le spliceosome reconnaît des motifs spécifiques au niveau de l'ARN pré-messager. Ces sites dits « activateurs » ou « inhibiteurs » de l'épissage, sont localisés soit au niveau des exons (à l'intérieur, en 5' ou 3' de l'exon) soit au niveau de l'intron et appelés aussi « points de branchement » (Fig. 11A). Les séquences cis-régulatrices sont situées soit dans les exons, soit dans les régions introniques. Les éléments « *Exonic Splicing Enhancer* » (ESE) et « *Exonic Splicing Silencer* » (ESS) affectent l'épissage de l'exon dans lequel ils se trouvent, alors que les éléments « *Intronic Splicing Enhancer* » (ISE) et « *Intronic Splicing Silencer* » (ISS) influent sur les exons adjacents depuis leur position intronique. Ces sites sont reconnus par des facteurs d'épissages qui sont des protéines de liaison à l'ARN appelée en anglais (RNA-Binding Protein = RBP). La reconnaissance d'un exon et son inclusion dépend de la combinaison des facteurs d'épissage impliqués. Les séquences cis-régulatrices situés dans les exons (ESE et ESS) sont reconnues par deux grandes familles de RBPs : les protéines « SR » et « hRNPs » (Fig. 11B). Les protéines «SR» favorisent généralement l'épissage tandis que les protéines « hRNPs » sont des inhibiteurs (Wang and Burge 2008). Ces caractéristiques offrent la possibilité d'événements d'épissage alternatif (AS) augmentant ainsi la complexité et la diversité du transcriptome et du protéome (Kornblihtt et al. 2013). Les profils AS sont régulés pendant le développement et la différenciation cellulaire, de manière spécifique au tissu et en réponse à des stimuli physiologiques et à différents types de stress cellulaire (Montecucco and Biamonti 2013).

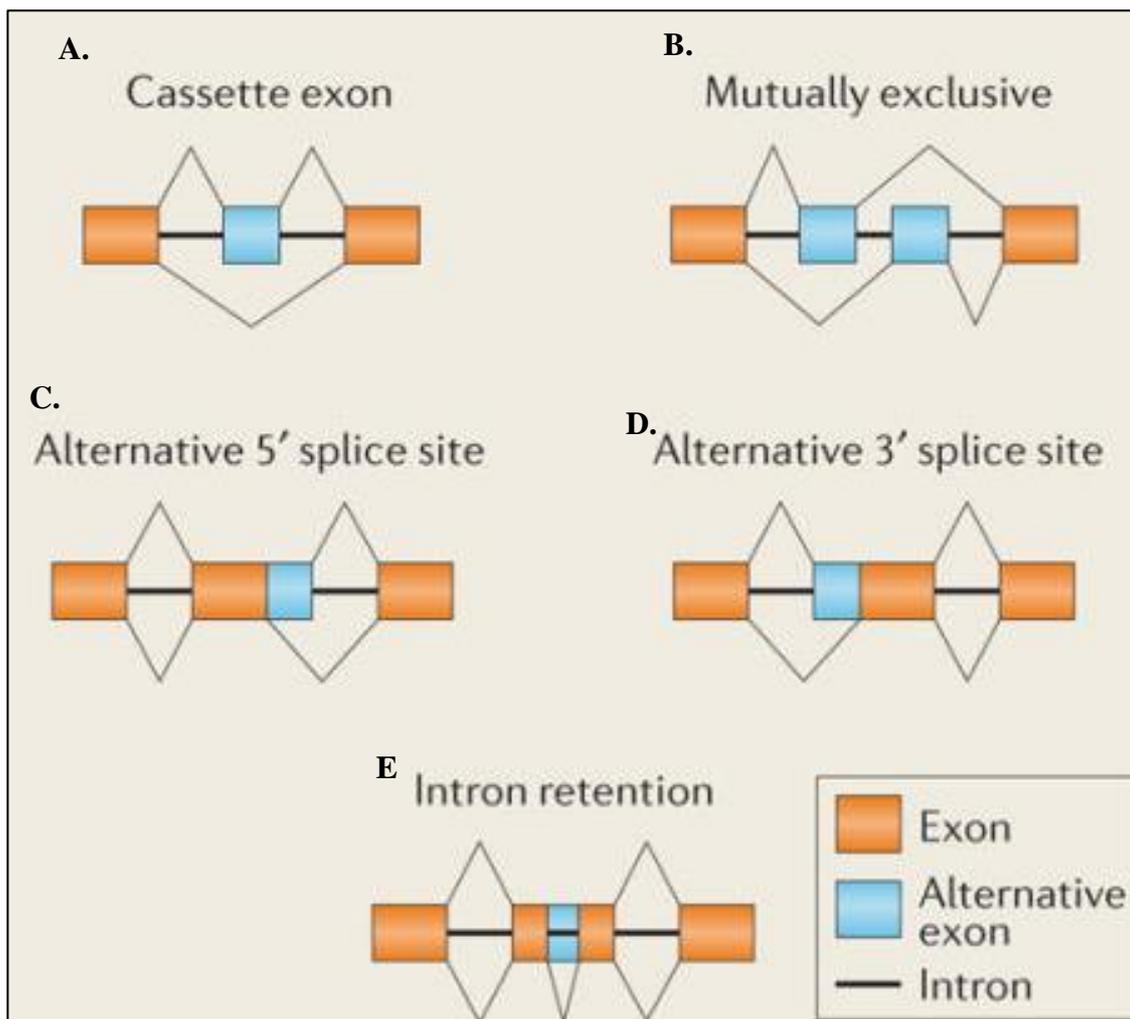


(McManus and Graveley 2011)

Figure 11 : Mécanisme de base de l'épissage alternatif

A. Schéma des sites d'épissage en 3' et 5', et du point de branchement. B. Représentation schématique des séquences et des protéines impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif. Quatre types de séquences régulatrices sont connus : les activateurs d'épissage intronique (ISE), les inhibiteurs d'épissage intronique (ISS), les activateurs d'épissage exoniques (ESE) et les inhibiteurs d'épissage exoniques (ESS). Les éléments activateurs sont reconnus par les protéines activatrices. Dans les exons, ces activateurs appartiennent le plus souvent à la famille des protéines SR. Les éléments inhibiteurs sont liés par des protéines répressives. Dans les exons, ces répresseurs appartiennent à la famille des protéines hnRNP. Indépendamment de leur emplacement de liaison, les activateurs ont tendance à augmenter la liaison des composants spliceosomaux au site d'épissage régulé, tandis que les répresseurs ont tendance à inhiber la liaison ou la fonction des composants spliceosomaux.

L'épissage alternatif est un mécanisme de diversification des protéines qui affecte l'expression des gènes en éliminant ou en insérant des facteurs d'épissage régulateurs, contrôlant la traduction, la stabilité ou la localisation de l'ARNm. Chez l'homme, 95% des gènes subissent un épissage alternatif (Pan et al. 2008); (Wang et al. 2008); (Yates et al. 2016). Cinq principaux événements d'AS (Fig. 12) ont été décrits dans la littérature (Black 2003) ; (Wang et al. 2015) incluant l'inclusion ou le saut d'exon (SE), les exons mutuellement exclusifs (MXE), l'épissage en 3'(A3SS) et en 5'(A5SS) du site d'initiation et la rétention d'intron (RI) (Black 2003) ; (Wang et al. 2015).



(Scotti and Swanson 2016)

Figure 12 : Représentation schématique des différents types d'évènements d'épissage alternatif

Différents types d'évènements ont été décrits : (A) exon cassette ou saut d'exon, (B) exons mutuellement exclusifs, (C) site d'épissage en 5', (D) site d'épissage en 3', (E) Rétention d'intron.

Influence du métabolisme de la vitamine B12 sur l'épissage alternatif

Des résultats récents du laboratoire ont montré un lien entre dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine B12 et une modification de l'épissage alternatif de certains transcrits via des modifications épigénomiques incluant la méthylation des protéines de liaison aux ARNm ELAV1/HuR ou HnRNPA1. Cette dernière subit des modifications post-traductionnelles incluant la méthylation et la phosphorylation de nombreux résidus et une localisation subcellulaire anormale associée à une modification de l'épissage alternatif du gène *IRF3*, une des cibles de HnRNPA1. Récemment, nous avons montré que la déacétylase SIRT1 avait la capacité de relocaliser les RBP dans le noyau (Battaglia-Hsu et al. 2018) (Ghemrawi et al., 2019). L'importance de l'épissage alternatif a été soulignée par de récentes découvertes de dérégulation qui ont été documentées dans plusieurs pathologies humaines impliquant des désordres neurodégénératifs, cardiovasculaires, respiratoires et métaboliques aussi bien que dans certains cancers (Zolezzi et al. 1997).

B. Impact sur le protéome

Certaines études illustrées par l'analyse du protéome de fibroblastes de patients ayant des défauts génétiques du métabolisme intracellulaire de la cbl (cblD-MMA) ont montré une implication des voies du stress oxydatif, de l'apoptose et du métabolisme cellulaire (Richard et al. 2006). Deux autres études de fibroblastes de trois patients cblC et de lymphocytes de 6 patients cblC sous traitement (Caterino et al. 2015); (Hannibal et al. 2011). L'étude sur les fibroblastes a identifié 5 protéines surexprimées et 10 protéines sous-exprimées impliquées principalement dans l'organisation du cytosquelette, la signalisation du système nerveux et la désintoxication. L'étude réalisée avec les lymphocytes n'a révélé que 23 protéines régulées positivement et négativement et qui ont été impliquées dans le métabolisme du glutathion, le trafic intracellulaire, le repliement des protéines, le métabolisme énergétique et l'organisation du cytosquelette. Le modèle d'expression de 84 gènes liés à l'apoptose a été analysé par RT-qPCR dans des fibroblastes de patients présentant des anomalies génétiques du métabolisme de la cblB et cblC, montrant une surexpression relativement modérée d'un nombre similaire de gènes pro-apoptotiques et apoptotiques, principalement impliqués dans la voie extrinsèque (Jorge-Finnigan et al. 2010). Globalement, ces études suggèrent fortement que le défaut cblC est associé à un dysfonctionnement moléculaire et cellulaire étendu.

V.2. Régulations épigénomiques

L'importance de la voie de reméthylation pour le maintien du taux de SAM cellulaire a été largement documentée. Les études expérimentales montrent que la carence en cbl a un impact direct sur la concentration cellulaire en SAM et en SAH résultant en une diminution du rapport SAM/SAH (Blaise et al. 2007) ; (Battaglia-Hsu et al. 2009), ; (Guéant et al. 2013b) ; (Mentch and Locasale 2016a). La conséquence principale de cette diminution est une capacité réduite de la cellule à assurer les réactions de transméthylation (Guéant et al. 2013c) ; (Guéant et al. 2013a) et une diminution de l'activité de la méthionine synthase, résultant en l'altération des mécanismes épigénomiques. De nombreuses études ont montré des liens entre les différents signaux épigénétiques incluant la méthylation de l'ADN, de l'ARN, les modifications des histones et le développement de troubles neurologiques incluant la schizophrénie (Ovenden et al. 2018) ; (Shorter and Miller 2015) et la maladie de parkinson (Dashtipour et al. 2017). La plupart de ces études ont été réalisées sur des tissus de substitution, tels que le sang, ou sur un échantillon relativement petit, en raison des difficultés rencontrées pour obtenir suffisamment d'échantillons d'examen neuropathologiques (en particulier des tissus cérébraux).

A. Méthylation de l'ADN

Généralités

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN est le principal marqueur épigénomique (Bird 1986). Elle a lieu au niveau des résidus des dinucléotides palindromiques 5'-CG-3', appelés dinucléotides CpG (Lister et al. 2009). Les sites CpG sont moins abondants dans le génome et sont répartis de manière hétérogène. Ils sont plus enrichis dans les séquences répétées et courtes d'environ 1 Kb nommée « îlot CpG » (Antequera 2003). Ces îlots CpG recouvrent partiellement (1 à 60%) les régions promotrices des gènes et/ou l'exon 1 à 60% de l'ensemble du génome (Fernandez et al. 2012); (Illingworth and Bird 2009) . Leur localisation au niveau des promoteurs des gènes et à proximité du site d'initiation de la transcription, montre le rôle clé que joue la méthylation de l'ADN dans l'expression des gènes. La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur la position C5 des cytosines des dinucléotides CpG pour former le 5-méthylcytosine (5mC) (Rottach et al. 2009) ; (Stresemann and Lyko 2008). Cette réaction est catalysée par les DNA méthyltransférases (DNMT) qui utilisent le groupement méthyle de la SAM pour méthyler le C5 de la cytosine et former le 5-méthylcytosine, avec libération de SAH (Fig. 13) (Jurkowska et al. 2011) ; (Moore et al. 2013).

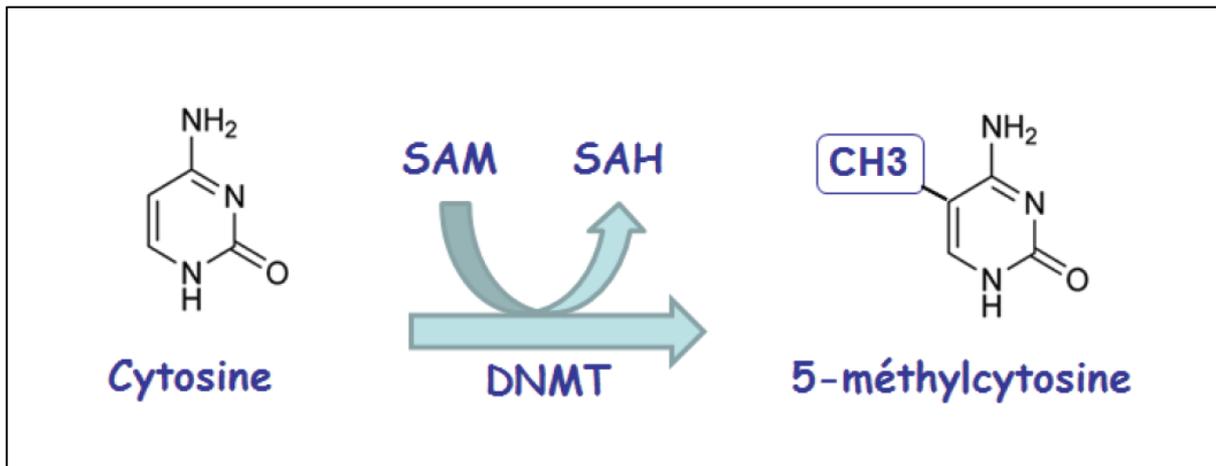
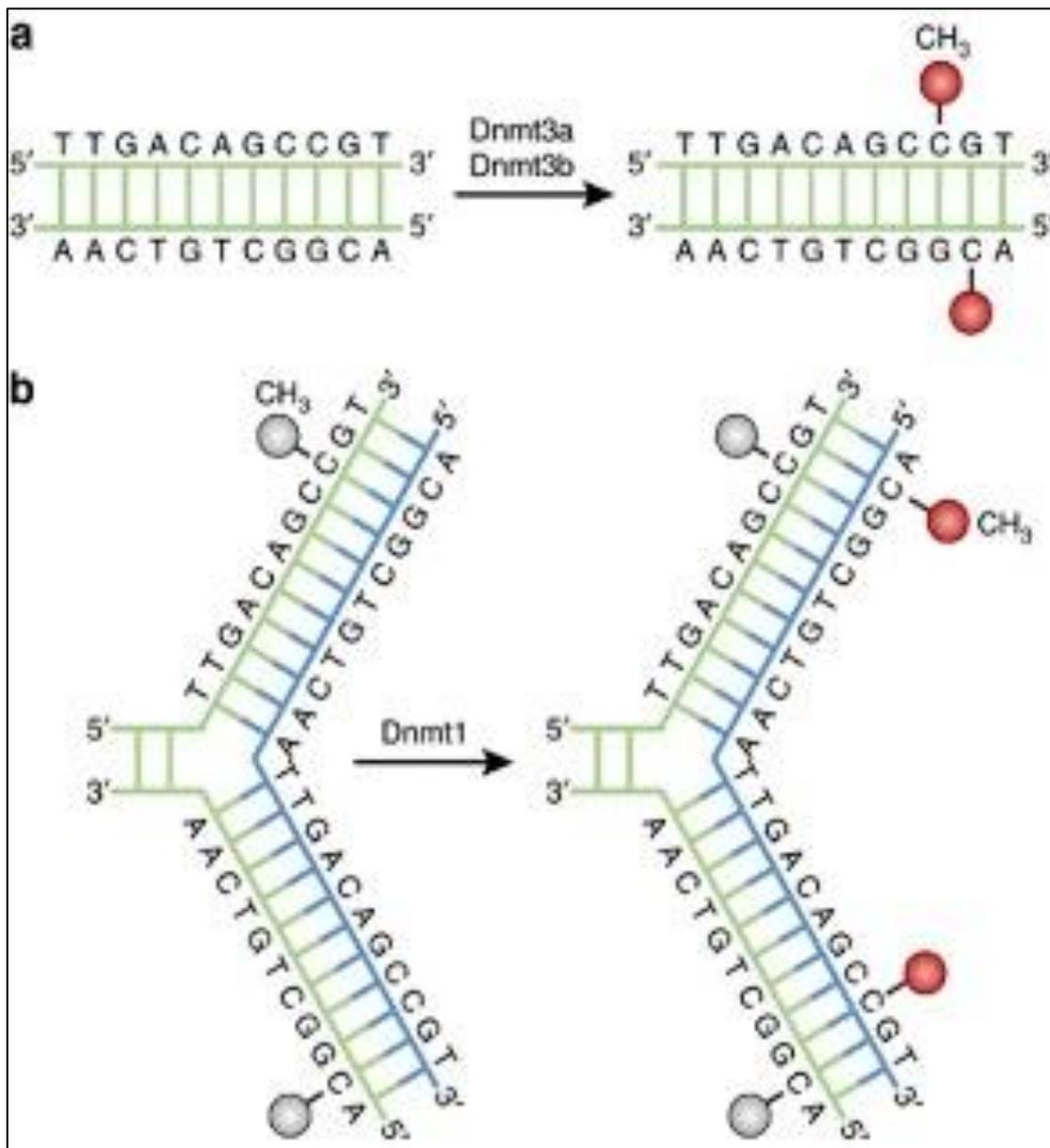


Figure 13 : Réaction de méthylation du 5-mC

Une famille de DNMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle de la SAM au C5 du résidu cytosine afin de former la 5-méthylcytosine (5mC) et la libération de la SAH.

Chez les mammifères, différents types de DNMT ont été identifiés : DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L ayant tous globalement une structure semblable : un domaine C-terminal ayant une activité catalytique et un domaine N-terminal à activité régulatrice et propre à chaque enzyme (Jurkowska et al. 2011). DNMT3A et DNMT3B ont la capacité d'établir un nouveau motif de méthylation dans l'ADN non modifié et sont donc connus sous le nom de DNMT de novo. Par contre, DNMT1 fonctionne pendant la réplication de l'ADN pour copier le motif de méthylation de l'ADN du brin d'ADN parental sur le brin de fille nouvellement synthétisé (Fig. 14).

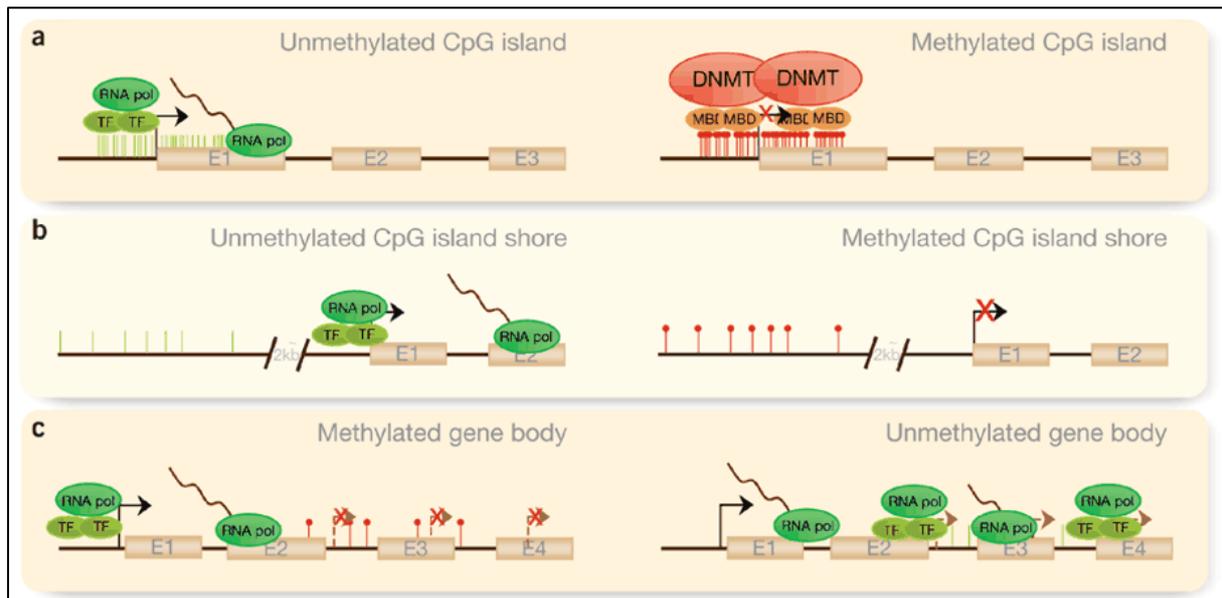


(Moore et al. 2013)

Figure 14: Mécanismes de méthylation de l'ADN par les DNMT

(a) DNMT3A ET DNMT3B sont des DNMT de novo et transfèrent des groupes méthyle (rouge) sur l'ADN nu. (b) DNMT1 est la DNMT de maintenance qui permet de garder le profil de méthylation de l'ADN d'origine (gris) pendant la réplication. Elle s'associe aux foyers de réplication et reproduit avec précision le schéma de méthylation de l'ADN d'origine (gris) en ajoutant des groupes méthyle (en rouge) au brin fille nouvellement formé (en bleu).

Dans la littérature, il a été mis en évidence qu'une hyperméthylation des îlots CpG chez l'humain, était généralement associée à une diminution de l'expression des gènes (Fernandez et al. 2012). Une méthylation dans les îlots CpG situés dans le corps des gènes « gene body », favorise la transcription des gènes tandis que celle située dans les régions promotrices et celle qui est distante de 2 kilobases par rapport au site d'initiation « CpG island shore », entraînent l'inhibition de la transcription des gènes (Fig. 15).



(Portela and Esteller 2010)

Figure 15 : Profil de méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN se produit dans différentes régions du génome. La colonne de gauche représente le profil de méthylation dans différentes régions du génome d'une cellule normale tandis que la colonne de droite représente une modification du profil de méthylation. (a) Dans les régions promotrices des gènes, les îlots CpG sont habituellement non méthylés, ce qui favorise la transcription des gènes. Une méthylation plus importante dans ces régions entraîne une inactivation de la transcription des gènes. (b) Le même cas de figure est observé lorsque les îlots CpG sont situés dans les « CpG island shore », une région localisée à environ 2Kb du site d'initiation de la transcription. (c) Par contre, lorsque la méthylation a lieu au niveau du corps du gène « gene body », elle favorise la transcription des gènes par inhibition de celle de gènes parasites.

Influence du métabolisme de la cbl sur la méthylation de l'ADN

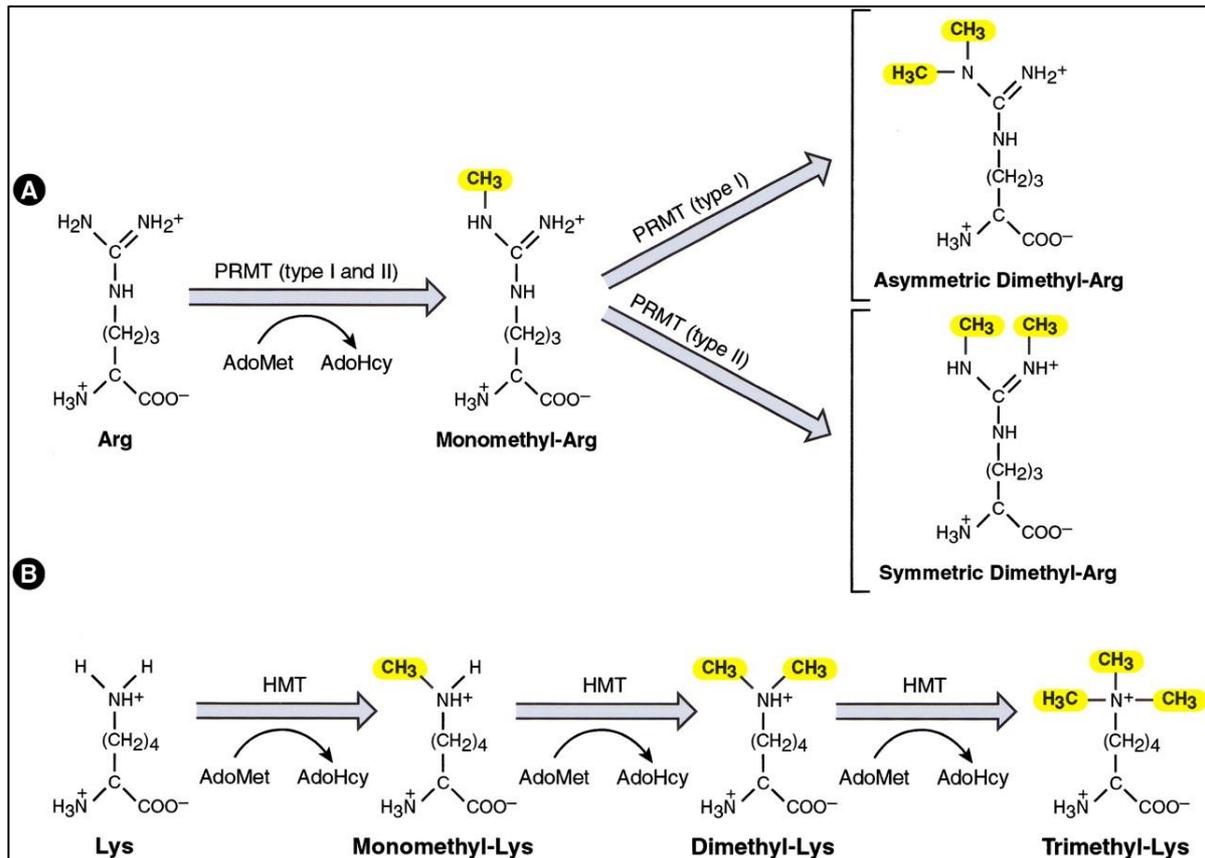
De nombreuses études ont montré un lien entre le groupement méthyle issu de l'alimentation et les anomalies de méthylations de l'ADN (Kadayifci et al. 2018). Dans la littérature, l'importance du groupe méthyle alimentaire sur l'hypométhylation de l'ADN via la SAM ainsi que la diminution de l'activité de la MS a été montré (Kulkarni et al. 2011); (Brunaud et al. 2003). Des expériences in vivo ont clairement établi un lien entre vitamine B12 et méthylation de l'ADN. Dans notre laboratoire, il a été reporté que la carence en B12 associée à une diminution de l'activité de la MS étaient deux facteurs importants d'hypométhylation de l'ADN (Brunaud et al. 2005). De plus, les changements anormaux de la méthylation de l'ADN ont été associés à plusieurs maladies telles que des maladies auto-immunes et des troubles métaboliques et physiologiques (Jin and Liu 2018). Les maladies neurologiques constituent d'autres types de maladies pour lesquelles la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le développement.

B. Modifications des histones

Généralités

Les histones sont soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles comme l'acétylation/méthylation des lysines (K) et des arginines (R), la phosphorylation des sérines (S) et des thréonines (T), l'ubiquitinylation et la sumoylation des lysines, ainsi que la ribosylation. La méthylation et l'acétylation des histones constituent les principales marques épigénomiques connues pour impacter les processus biologiques dans le contexte de développement et réponses cellulaires. Elles se produisent sur les domaines de queue d'histones amino-terminaux et carboxy-terminaux, plus précisément sur les résidus basiques (arginines et lysines) de l'histone H3 et l'H4 qui peuvent être mono, di ou tri-méthylés de manière symétrique (Borun et al., 1972) ou asymétrique (Gershey et al., 1969) (Fig.16). Au niveau des lysines, la méthylation a été observée sur les marques H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 et H4K20 et au niveau de l'arginine les marques H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 et H4R3. La découverte de déméthylases notamment sur la marque H3K4 ou la déméthylase spécifique à la lysine 1 (LDS1), a montré que la méthylation des histones était un phénomène réversible (Shi et al. 2004). Les enzymes responsables de la méthylation des histones sont différentes selon le résidu impliqué. La méthylation des résidus lysines fait intervenir des lysines méthyltransférases (HKMTs) alors que celle des résidus arginines est catalysée par des arginines méthyltransférases (PRMTs)

(Wolf 2009). Ces enzymes utilisent le groupement méthyle de la SAM pour ajouter un ou plusieurs groupements méthyles sur les queues d'histones (Fig. 16) (Rea et al. 2000) ; (Zhang and Reinberg 2001). La méthylation des histones joue un rôle très important dans l'état de condensation de la chromatine permettant ou non l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. Ces modifications ont été largement étudiées ces dernières années et ont un impact spécifique sur l'activité transcriptionnelle (Peterson and Laniel 2004).



(Zhang and Reinberg 2001)

Figure 16: Méthylation des histones sur les résidus lysines et arginines

Les enzymes intervenant dans la méthylation des queues d'histones utilisent le groupement méthyle de la SAM pour l'ajouter une, deux ou trois fois aux queues d'histones. (A) : La méthylation sur les résidus arginines par les PRMT génère une histone mono-méthylée ou diméthylée mais de manière symétrique ou asymétrique. (B) Les lysines méthyltransférases, grâce à la SAM, ajoutent un ou plusieurs groupements méthyles aux résidus lysines des queues d'histones.

Influence du métabolisme de la cbl sur les modifications des histones

Serefidou et son équipe a récemment montré l'impact du métabolisme des monocarbone sur la méthylation des histones (Serefidou et al. 2019) qui est directement lié au statut métabolique de la cellule (Sharma and Rando 2017). La méthylation de l'histone 3 (H3) sur la lysine 4 (K4), K36 ou K79 est généralement associée à la chromatine active, tandis que la méthylation sur K9, K27 et l'histone 4 (H4) K20 est fréquemment associée à la chromatine réprimée. Il a été rapporté que la méthylation de H3K9me3 diminuait l'expression de MATII α et cette diminution entraîne également une diminution globale de H3K4me3 pouvant entraîner une perte générale de l'activité transcriptionnelle (Kera et al. 2013).

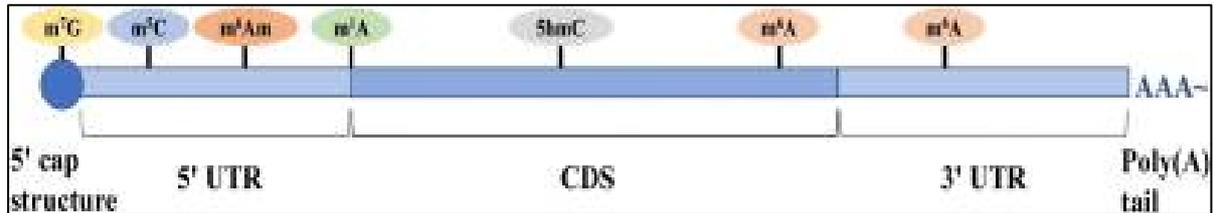
C. Méthylation de l'ARN

Généralités

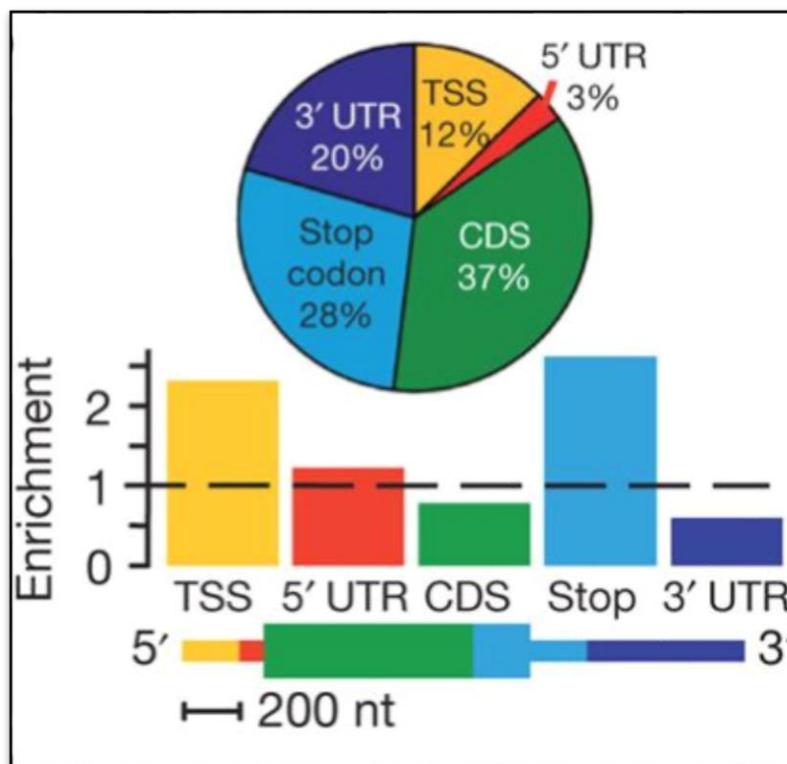
La méthylation de l'ARN est une modification post-transcriptionnelle de l'ARN chez les eucaryotes. Elle représente la modification épigénomique la plus étudiée après la méthylation de l'ADN et des histones. L'ensemble des méthylations des ARNm est appelé épitranscriptome. La grande majorité des études menées sur la méthylation de l'ARN a été limitée à trois classes d'ARN surexprimées et catalytiquement actives : les ARNr, les ARNt et les petits ARN (Greenberg and Penman 1966) ; (He 2010). Avec l'avancée des nouvelles technologies telle que la méthode de séquençage des ARN (RNA-Seq), il a été possible de cartographier certaines modifications de l'ARN. L'obtention de ces cartes a été cruciale puisqu'elle a permis notamment de mettre en évidence des régions génomiques spécifiques dans lesquelles l'ARNm a été enrichi en méthylation des adénosines en position 6 (m6A) (Dominissini et al. 2012) ; (Meyer et al. 2012) ; (Ke et al. 2015). La méthylation de l'ARNm représente environ 60% de toutes les modifications de l'ARN et la N6-méthyladénosine (m6A) est l'une des types de modification de la méthylation de l'ARNm la plus abondante chez les eucaryotes (Yue et al. 2015) ; (Shi et al. 2019). Elle est considérablement enrichie dans les régions de séquences codantes (CDS), les régions autour des codons stop (stop) et les régions non-transcrites (UTR) (Fig. 17A) (Dominissini et al. 2012). Les modifications de la méthylation de l'ARNm comprennent également la 5-méthylcytosine (m5C), la N1-méthyladénosine (m1A), la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), N6, la 2'-O-diméthyladénosine (m6Am), la 7-méthylguanine (m7G) (Fig. 17B). Ces modifications peuvent affecter la régulation de divers processus

biologiques tels que la stabilité et la traduction de l'ARNm. Une méthylation anormale de l'ARNm est liée à de nombreuses maladies (Patil et al. 2016).

A.



B.



(Dominissini et al. 2012) ; (Li et al. 2019)

TSS : site d'initiation de la transcription, UTR : région non transcrit, CDS : séquence d'ADN codant.

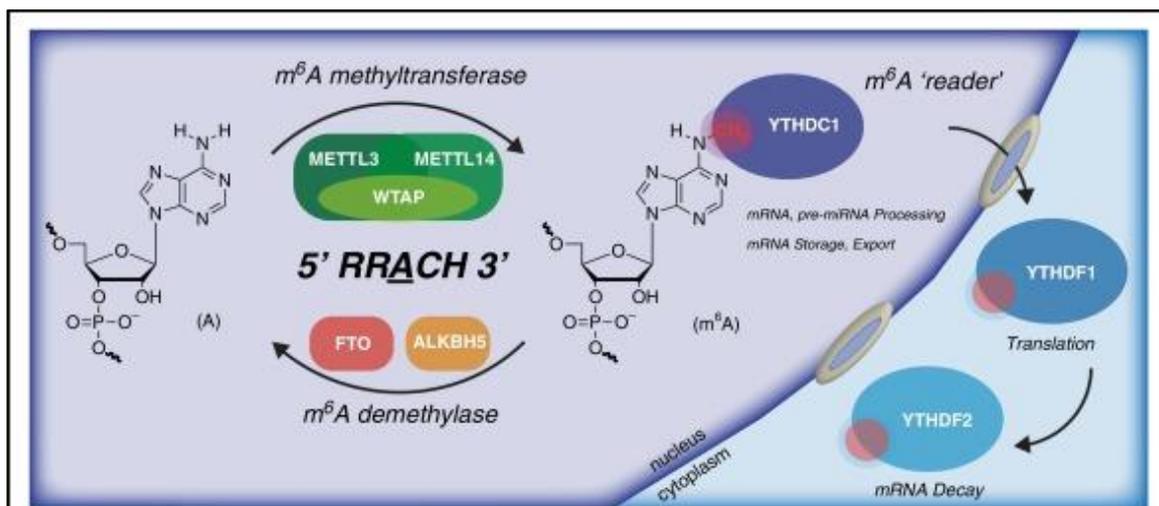
Figure 17: Schéma représentatif de la proportion de m6A dans les différentes sections du gène

A. Différents types de modification de la méthylation de l'ARNm **B.** La proportion de m6A dans l'ARNm est hétérogène. En haut, le diagramme représente la fraction en pourcentage de m6A dans les cinq régions du gène. Au milieu, l'enrichissement moyen des pics de m6A dans les cinq segments du gène et en bas, le schéma des cinq segments du gène.

La méthylation m⁶A fait intervenir plusieurs protéines dont des méthyltransférases (MTTLs) « m⁶A writers », des protéines de décodages dites « m⁶A readers » et des protéines déméthylases « m⁶A erasers » (Fig. 18). Au moins huit protéines sont impliquées dans la méthylation/déméthylation des adénosines de l'ARNm incluant :

- des méthylases : METTL3, METTL14 (Wu et al. 2016) , WTAP (Ping et al. 2014) ;(Schwartz et al. 2014) ; (Wang et al. 2014)
- des déméthylases : FTO et (Jia et al. 2011) ; (Zheng et al. 2013)
- une classe de lecteurs : YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3 (Dominissini et al. 2012).

L'addition du groupement méthyle de la SAM sur l'ARNm m⁶A peut avoir une influence sur la transcription de l'ARNm, l'épissage, l'exportation nucléaire, la localisation, la traduction et la stabilité (Fu et al. 2014) ; (Roundtree and He 2016).



(Roundtree and He 2016)

Figure 18 : Méthylation réversible de l'ARNm (m⁶A) par les méthyltransférases/déméthylase m⁶A

Le ribose de l'ARNm est méthylé (m⁶A) par un complexe de méthyltransférases impliquant METTL3 /METTL14 et le corégulateur WTAP. FTO et ALKBH5 sont des déméthylases qui enlèvent le groupement méthyle par une réaction d'oxydation de l'ARNm dans le noyau. Les modifications de l'ARN m⁶A sont reconnues par les protéines de la famille YTH via leur domaine YTH, à la fois dans le noyau (YTHDC1) et dans le cytoplasme (YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3).

Influence du métabolisme de la cbl sur la méthylation de l'ARNm ou « épitranscriptome »

Les ARN méthylases utilisent la SAM comme donneur de groupe méthyle. Il a récemment été signalé que le niveau de MAT2A est régulé par la modification de m6A au sein de structures en épingle à cheveux spécifiques dans la région 3'-UTR lors de l'épuisement de la méthionine dans le milieu de culture cellulaire, favorisant la rétention d'un intron lors de l'épissage (Zhou et al. 2015) ; (Pendleton et al. 2017). Plusieurs études ont également montré l'importance de l'alimentation (régime de restriction, régime riche en graisses ou en glucose) sur les niveaux de m6A via l'altération de la protéine FTO ou de METTL3 (Méthyle Transferase Like 3) qui contient le site catalytique responsable de la formation de m6A.

Dans une autre étude, il a également été rapporté que chez un modèle de rat supplémenté en bétaine, le niveau de SAM était restauré dans le foie, résultant en une augmentation du niveau de m6A. Cela suggère qu'un défaut de synthèse de la SAM pourrait induire une réduction du niveau de méthylation m6A et que la carence en B12 pourrait avoir un impact direct ou indirect sur la méthylation de l'ARN m6A (Mosca et al., 2019) .

V.3. Régulation du stress cellulaire

Outre les conséquences épigénomiques induites par la diminution de la concentration cellulaire de la SAM, du ratio SAM/SAH et de l'activité de la méthionine synthase, une carence en cbl a également des conséquences cellulaires et moléculaires liées au stress. Des résultats précédents du laboratoire ont montré qu'une carence en vitamine B12 induisait une diminution de la prolifération cellulaire par l'intermédiaire des mécanismes épigénomiques liés à l'homéostasie cellulaire de la méthionine et de la SAM (Pooya et al. 2012) ; (Garcia et al. 2011) ; (Joseph 2011). Les déficits en donneurs de méthyle responsable de l'altération de la voie de reméthylation sont responsables de la mise en place d'un stress cellulaire. Lorsque le stress persiste dans la cellule, cela peut aboutir à l'apparition de maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et des cancers dans lesquels le stress oxydatif et du réticulum endoplasmique sont des facteurs importants (Ames 2010) ; (Liguori et al. 2018) mais les mécanismes moléculaires sous-jacents de ces pathologies ne sont bien élucidés.

A. Stress oxydatif

Sources de production de ROS

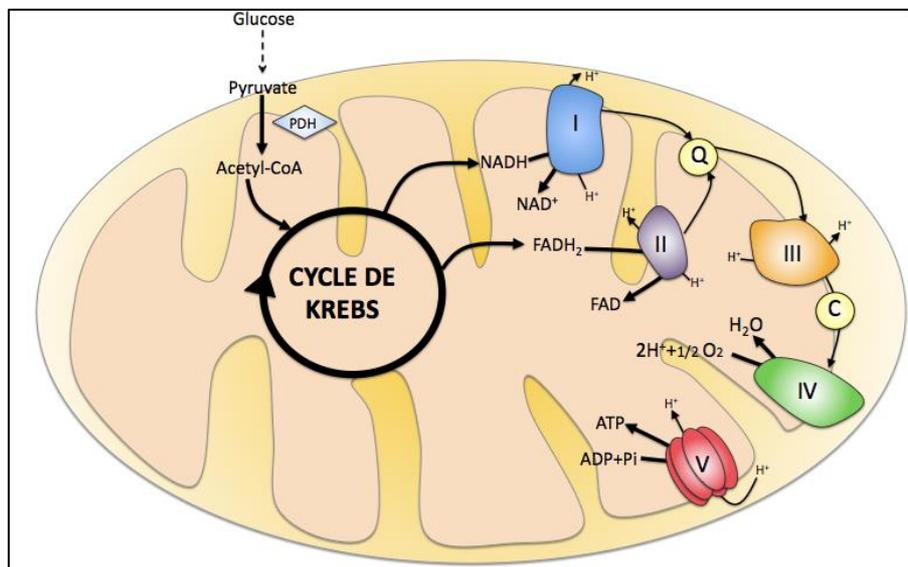
Le stress oxydant provient d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) et leur détoxification, ce qui entraîne une accumulation des ROS. En temps normal, les ROS peuvent être produites par diverses sources :

- Sources enzymatiques : les NADPH oxydase (NOXs), la xanthine oxydase, les cyclooxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) et les thymidines phosphorylases.
- Sources non-enzymatiques : la mitochondrie

La mitochondrie représente la principale source de ROS produite dans les cellules (Murphy 2009). Les ROS sont produits du fait de l'activité de la chaîne respiratoire lors de la fuite d'électrons au niveau du complexe I, du complexe II et du complexe III (Brand and Nicholls 2011) ; (Brand M., 2010) ; (Quinlan et al. 2012) . De plus, l'ATP-synthase (complexe V) a récemment été associée à la production de ROS (Martínez-Reyes and Chandel 2014). Les électrons qui se sont échappés vont réagir avec l'oxygène présent dans la mitochondrie et former l'anion superoxyde (O_2^-). Environ 0,2-2% de l'oxygène consommé par la cellule part vers la production de ROS (Murphy 2009).

Phosphorylation oxydative

La plupart des cellules différenciées transforment le glucose en pyruvate via la glycolyse. Ensuite, celui-ci rentre dans la mitochondrie où il est transformé en Acetyl- CoA par l'enzyme Pyruvate Deshydrogénase (PDH) (Fig. 19). Ce dernier permet d'alimenter le cycle de Krebs et d'obtenir du NADH et du FADH₂. Ces deux cofacteurs sont des donneurs d'électrons qui permettent de mettre en place une série de réactions d'oxydation au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Ceci est accompagné d'un mouvement des protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire favorisant la formation d'un gradient électrochimique qui sera utilisé par l'ATP synthase dans le but de produire de l'ATP, raison pour laquelle ce processus reçoit le nom de phosphorylation oxydative.



(Murphy 2009)

Figure 19 : La phosphorylation oxydative

Dans la mitochondrie, le pyruvate issu de l'hydrolyse du glucose est transformé en Acetyl-CoA par la Pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs et permet la production du NADH et du FADH₂ utilisés par le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) et le complexe II (Succinate-ubiquinone oxydoréductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale. La réoxydation de ces deux cofacteurs au travers d'un flux d'électrons au niveau du complexe III (ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase) et du complexe IV (cytochrome C oxydase) est accompagnée de la création d'un gradient de protons. Ce gradient servira ensuite pour la production d'ATP grâce à l'ATP synthase (Complexe V).

Métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 et stress oxydatif

Plusieurs d'études ont montré que le stress oxydatif est étroitement associé à la physiopathologie de plusieurs troubles métaboliques tels que l'acidémie méthylmalonique. La carence en cbl entraîne un défaut de synthèse des co-facteurs Mecbl et Adocbl nécessaires pour les activités enzymatiques de la MS et de la MCM. Il en résulte une accumulation de précurseurs incluant l'acide méthylmalonique (MMA) et l'homocystéine (Hcy), ce qui conduit éventuellement à l'hypométhylation de l'ADN (Chen et al. 2010) ; (Lee et al. 2009). La cbl peut posséder des propriétés antioxydantes (Manzanares and Hardy 2010) et une carence en cbl peut donc contribuer au stress oxydatif (Liguori et al. 2018). Les études menées par Richard et son équipe, ont identifié plusieurs protéines différentiellement exprimées impliquées dans le stress oxydatif dû à une surproduction de ROS intracellulaire responsable de l'apparition de l'apoptose (Richard et al. 2007) ; (Richard et al. 2009).

Dans une autre étude, la même équipe a mis en évidence les mêmes effets dans fibroblastes de patients avec des défauts génétiques de la voie de reméthylation incluant cblG, cblE et MTHF, ce qui indique pour la première fois qu'une altération de la voie de reméthylation induite par une réduction de l'activité de la methionine synthase pourrait être responsable de la diminution de la réponse au stress cellulaire (Richard et al. 2013).

B. Stress du réticulum endoplasmique

Lorsque le stress oxydatif persiste dans la cellule, un stress du réticulum endoplasmique (RE) apparaît. Il est caractérisé par un déséquilibre entre la quantité de protéines mal repliées et la quantité de chaperonnes dont l'expression peut être régulée par SIRT1 (sirtuine 1). SIRT1 fait partie de la famille des déacétylases, activée pour lutter contre un stress du réticulum endoplasmique. Le RE est un organelle permettant la synthèse, la modification, le repliement et la maturation des protéines qui vont par la suite être prises en charge par des protéines chaperonnes afin d'assurer le bon repliement des protéines. Un mauvais repliement de ces protéines entraîne leur dégradation par le protéasome, ce qui engendre un stress du RE (Xu et al. 2005).

Dans notre laboratoire, nous avons développé un modèle cellulaire de séquestration de la cbl dans les cellules de neuroblastome NIE115 par l'expression stable d'une protéine chimérique constituée de l'oléosine, une protéine d'origine végétale d'ancrage à la membrane du RE, et de

la transcobalamine, une protéine de liaison à la cbl. Ainsi, deux modèles de constructions ont été développés selon l'orientation de la protéine chimérique afin d'étudier les effets de l'indisponibilité cellulaire de la cbl (Battaglia-Hsu et al. 2009). Il s'agit de la construction :

- Transcobalamine-oléosine (TO) : l'oléosine est fixée à la membrane du RE, rendant ainsi indisponible la cbl pour les réactions cellulaires
- Oléosine-transcobalamine (OT) : la construction ne permet pas la séquestration intracellulaire de la cbl

Notre laboratoire a montré que l'indisponibilité intracellulaire de la cbl dans les cellules TO, comparé aux cellules OT, conduit à un stress du réticulum endoplasmique via la diminution de l'activité de la déacétylase SIRT1 qui conduit à une diminution de l'activation du facteur de transcription HSF1 par déacétylation, responsable de l'expression des protéines chaperonnes, (Ghemrawi et al. 2013).

Le lien entre SIRT1, stress cellulaire et délocalisation des protéines de liaison à l'ARN (RBP) dans les mécanismes pathologiques liés aux altérations du métabolisme de la vitamine B12 a également été montré dans nos travaux précédents (Ghemrawi et al. 2013).

Objectifs de la thèse

Plusieurs études ont montré l'importance des donneurs de groupement méthyle (B12, choline, folates) dans la régulation du métabolisme des monocarbone, en particulier dans la synthèse de SAM résultant en des modifications épigénomiques potentiellement responsables d'altérations du transcriptome. Les conséquences de ces modifications sont multiples et incluent des effets métaboliques, cellulaires et moléculaires.

Dans la littérature, il a été rapporté, qu'une carence ou un déficit fonctionnel en B12 dans des modèles cellulaire et/ou animaux, entraînait une diminution du ratio SAM/SAH. Cette diminution pourrait impacter directement la voie de transméthylation du métabolisme des monocarbone par hypométhylation de l'ADN, de l'ARNm m⁶A, et des histones activatrices de l'accessibilité de la chromatine (H3K4me₂ et H3K36me₃). Ces altérations seraient associées à des anomalies du système nerveux, hématopoïétique, cardiaque, hépatique, métabolique mais également à un défaut de prolifération cellulaire et à un stress cellulaire. Cependant, chez l'homme, aucun de ces mécanismes n'a été mis en évidence jusqu'à présent. Nos travaux se sont concentrés sur les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 dus à des mutations dans les gènes *MMACHC* et *MTR*, responsables des défauts génétiques cblC et cblG. Notre objectif global est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies développées par ces patients. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'activité de la méthionine synthase associée aux défauts génétiques cblC et cblG pourrait conduire à une diminution de la synthèse de SAM et du ratio SAM/SAH. Cette diminution de l'index de méthylation pourrait entraîner des altérations de la méthylation de l'ADN, des ARNm et de protéines telles que les histones et ainsi contribuer à des modifications du niveau d'expression ou de l'épissage alternatif de certains gènes impliqués dans les pathologies observées chez les patients

Afin d'étudier ces mécanismes, nous avons analysé le transcriptome dont l'épissage alternatif, le protéome et la méthylation de l'ADN, de l'ARN et des histones, de trois lignées de fibroblastes de patients cblC, quatre lignées de fibroblastes cblG et une lignée contrôle.

De plus, dans le but de valider nos résultats sur un modèle cellulaire plus adapté à l'étude des mécanismes impliqués dans les pathologies neurologiques, nous avons développé un modèle expérimental de neurones transdifférenciés à partir de fibroblastes. La méthode utilisée est

basée sur des travaux menées par Xue et son équipe (Xue et al. 2013) qui consiste à différencier différents types cellulaires en neurones sans passer par le stade de dédifférenciation en cellules souches. Ainsi, mon travail se décline en 3 axes majeurs :

Partie 1 : Analyse du transcriptome incluant les modifications de l'épissage alternatif et du protéome

Partie 2 : Analyse des mécanismes épigénomiques incluant la méthylation de l'ADN, de l'ARN et des histones

Partie 3 : Validation des hypothèses mécanistiques en lien avec les pathologies neuronales dans les modèles de neurones transdifférenciés

Résultats

I. Modèles d'étude de fibroblastes de patients cblC et cblG

Le tableau 6 montre le descriptif des phénotypes des patients cblC et cblG. Ces patients ont été référencés dans plusieurs études publiées ou non présentant les caractéristiques cliniques suivantes : les patients avec des défauts génétiques cblC (C1, C2, C3) et cblG (G1, G2, G*1, G°*) sont respectivement, dues à des mutations dans les gènes *MMACHC* et *MTR*. Les patients cblC2, C3 et G1, G*1 présentent des mutations homozygotes tandis que les patients cblC1, G2 et G*2 sont porteurs de deux mutations différentes à l'état hétérozygote. Toutes ces mutations engendrent des effets importants sur la protéine concernée incluant une modification de la séquence des acides aminés, un décalage du cadre de lecture, un codon stop prématuré ou un effet sur l'épissage.

Tableau 6 : Phénotypes des fibroblastes de patients cblC et cblG

Lignée cellulaire	Gène muté	ADNc muté	Effet prédit sur la protéine	Référence bibliographique
WT	-	-	-	Fofou-Caillierez et al, 2013
cblC1	<i>MMACHC</i>	c.271dupA	p.Arg91LysfsX14	Fofou-Caillierez et al, 2013
		c.616C>T	p.Arg206Trp	
cblC2	<i>MMACHC</i>	c.394C>T	p.Arg132*	MR Baumgartner (non publié)
		c.394C>T	p.Arg132*	
cblC3	<i>MMACHC</i>	c.271dupA	p.Arg91LysfsX14	MR Baumgartner (non publié)
		c.271dupA	p.Arg91LysfsX14	
cblG1	<i>MTR</i>	c.3518C>T	p.Pro1173Leu	Fofou-Caillierez et al, 2013
		c.3518C>T	p.Pro1173Leu	
cblG2	<i>MTR</i>	c.3008-4A>G	Splicing	JL Guéant (non publié)
		c.3518C>T	p.Pro1173Leu	
cblG*1	<i>MTR</i>	c.609+1088G>A	p.Ala203GlufsX13	Fofou-Caillierez et al, 2013
		c.609+1088G>A	p. Ala203GlufsX13	
cblG*2	<i>MTR</i>	c.381delA	p.Leu128AlafsX5	Watkins et al, 2002
		c.2876G>A	p.Val892Val	

II. Altération des métabolites impliqués dans le cycle de la méthionine

Afin d'évaluer le dysfonctionnement du cycle de la méthionine dans les modèles de fibroblastes de patients cblC et cblG utilisés dans cette étude, nous avons mesuré les concentrations des différents métabolites à la fois dans le milieu de culture des cellules (Hcy, MMA) et dans le culot cellulaire (Hcy, MMA, Met, SAM, SAH).

Les résultats ne montrent aucune différence significative du taux d'Hcy dans les cellules cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 20). La concentration en Hcy semble être néanmoins plus importante dans le surnageant que dans le culot cellulaire. Le niveau de méthionine intracellulaire diminue dans les deux lignées cellulaires mais de manière significative dans la lignée cblC, comparé au contrôle. Comme prévu, aucune différence n'a été notée sur le niveau de MMA intracellulaire pour la lignée cblG alors que celui de la lignée cblC augmente significativement par rapport au contrôle. Comparés au contrôle, le niveau de SAM et du ratio SAM/SAH est considérablement diminué de manière significative chez les deux groupes de patients.

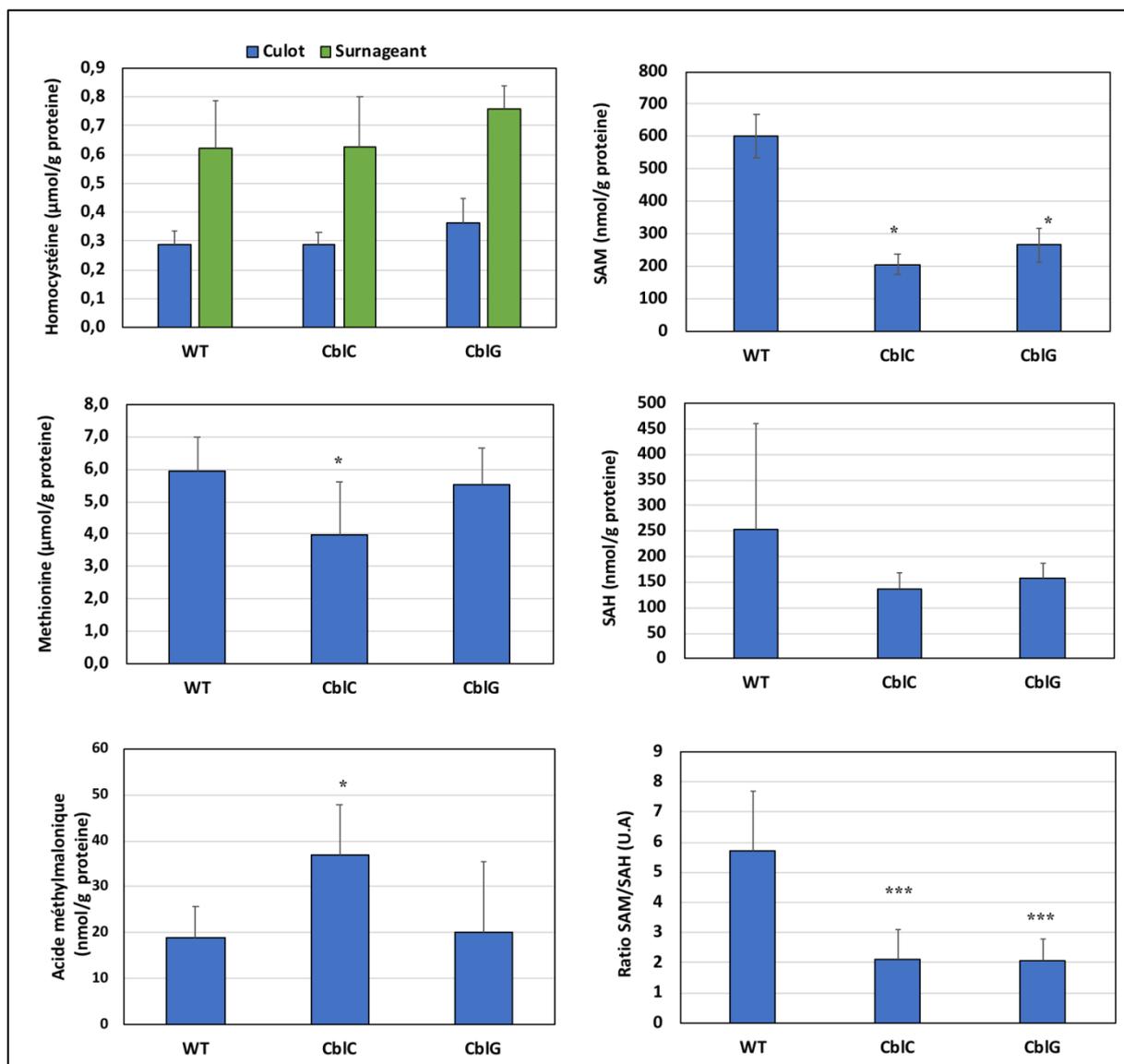


Figure 20 : Dosages des métabolites intracellulaires dans les fibroblastes de patients cblC et cblG

Les cellules ont été cultivées pendant 4 jours dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% sérum de veau, 1% de pyruvate et 1% de pénicilline-streptomycine. Le surnageant a été récupéré pour le dosage de l'homocystéine (Hcy) et de l'acide méthylmalonique (MMA). Le culot cellulaire a été lavé puis les protéines totales ont été extraites et quantifiées. Les dosages des métabolites Hcy, MMA, Met, SAM et SAH ont ensuite été réalisés. Les valeurs représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. *($p < 0.05$). **($p < 0.01$) et ***($p < 0.001$).

III. Dysfonctionnement de l'activité de la méthionine synthase

Nous avons mesuré le niveau d'activité de la MS dans les lignées cblC et cblG et les résultats montrent une diminution significative dans fibroblastes cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 21).

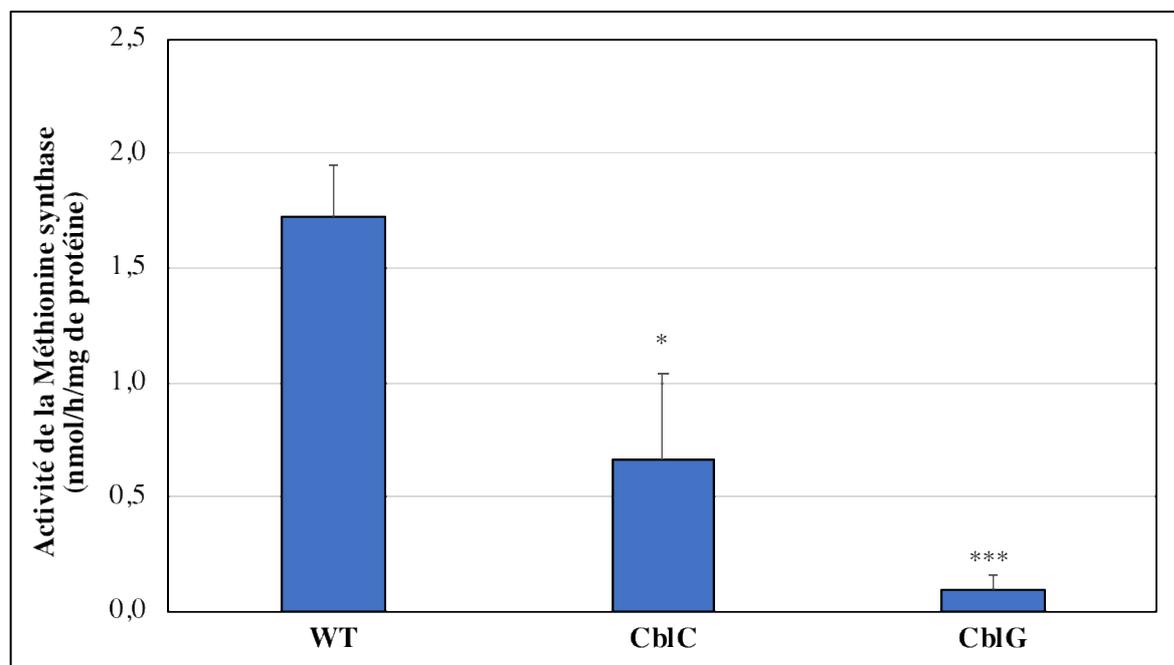


Figure 21 : Mesure de l'activité de la méthionine synthase

*Les cellules ont été cultivées pendant 4 jours dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% sérum de veau, 1% de pyruvate et 1% de pénicilline-streptomycine. Le culot cellulaire a été lavé et les protéines totales ont été extraites et quantifiées. L'activité de la méthionine synthase a été évaluée en quantifiant la méthionine et le méthyltétrahydrofolate radio-marqués au carbone 14 durant 20, 30 et 60 min. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la quantité de protéines totales. Les valeurs représentent la moyenne +/- écart-type de trois expériences indépendantes. *($p < 0.05$). **($p < 0.01$) et ***($p < 0.001$).*

Partie 1 : Analyse du transcriptome, des modifications de l'épissage alternatif et du protéome des fibroblastes de patients cblC et cblG

« Cette partie a fait l'objet d'un article scientifique soumis au journal Human

Molecular Genetics et référencé dans l'annexe 6 du manuscrit »

I. Altération du transcriptome des fibroblastes cblC et cblG

I.1. Séquençage de l'ARN et statistiques d'alignement des « read »

Le séquençage de l'ARNm a été réalisé par (RNA-Seq) sur 24 échantillons comprenant 8 lignées (3 cblC, 4 cblG et 1 WT réalisés en triplicats biologiques) par la plateforme de séquençage IBSLor (collaboration Pr. Iouri Motorine). La lecture a été réalisée sur les 100 premières paires de bases (pb) des séquences d'ADNc ou « read » et en appariées « paired end ». Le séquençage a généré une moyenne de 110,2 millions de séquence d'ADNc par échantillon. Après le retrait des adaptateurs, les read dont l'expression était mesurable ont été alignés sur le génome humain de référence hg38. Le taux global d'alignement était de 90,55%, avec une qualité moyenne de 99,97% et une taille moyenne d'insert de 362,5 pb. Environ 10,94% de ces read ont été mappés aux régions introniques (Tableau 7).

Le RNA-Seq a permis d'identifier 50818 transcrits uniques et 16808 gènes. Parmi ces transcrits, 14,65% ne correspondaient pas aux annotations connues et 71,1% représentaient des ARNm codants, 3,7% de pseudogènes, 3,7% d'ARN antisens et 2,75% de long intergénique ARN non codant (lincRNA). L'expression différentielle au niveau du gène et du transcrit entre les contrôles et les groupes cblC et cblG.

Tableau 7 : Composition et contrôle qualité des read séquencés par la technique RNA-Seq

Nom du fichier	Moyenne	Ecart-type
Nombre de read identifiés en millions (n)	110,2	+/- 27,2
Taux d'alignement des read (%)	90,55	+/- 1,86
Taille de l'insert (pb)	362,5	621,4

I.2. Analyse de l'expression génique

L'analyse des gènes exprimés de manière différentielle (DEG) a identifié respectivement 174 gènes altérés de manière significative (taux de découverte fictive FDR <0,05) dans les cellules cb1C par rapport aux témoins, avec 84 gènes surexprimés et 90 gènes sous-exprimés. Dans les cellules cb1G, un total de 184 gènes ont été significativement altérés dont 110 gènes surexprimés et 73 gènes sous-exprimés par rapport au contrôle (Fig. 22). Parmi ces gènes, l'analyse du RNA-Seq a permis de mettre en évidence 87 gènes en commun entre les cellules cb1C et cb1G dont 51 ont été régulés positivement tandis que 36 gènes ont été régulés à la baisse.

Le niveau de changement d'expression (facteur de variation ou « fold change » (FC)) converti en base logarithmique 2 (log2) est compris entre - 11,95 et 5,05 chez les cb1C et -11,48 et 6,89 chez les cb1G. Environ 80% de ces DEG affichent un FC supérieur à 1,2 par rapport aux contrôles. Le tableau 8 montre les 20 principaux DEG significatifs (FDR <0,05 et FC >1,5) exprimés à la fois dans les cellules cb1C et cb1G. La liste complète des DEG dans les deux groupes est présentée dans l'annexe 1.

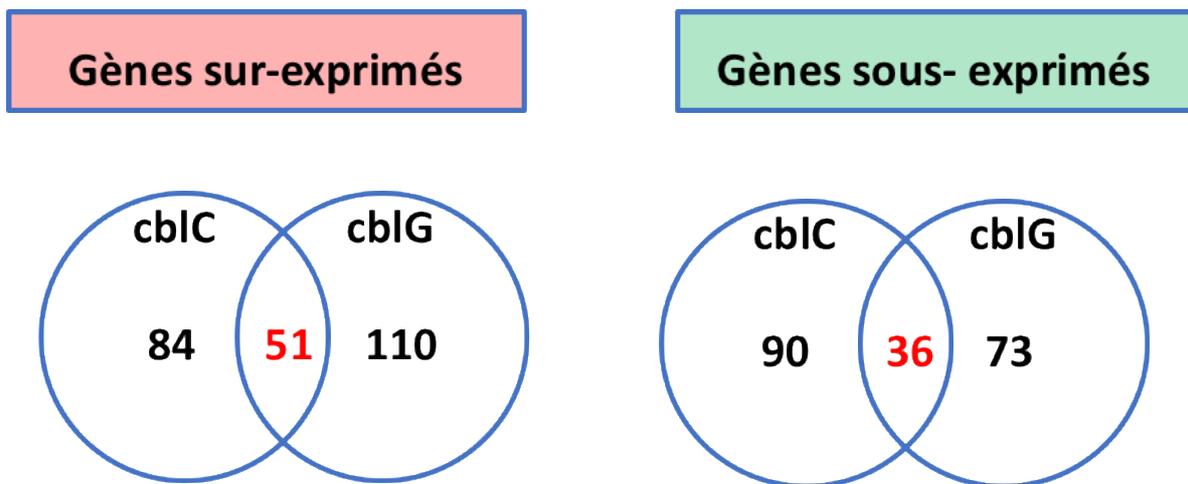


Figure 22 : Identification des gènes différentiellement exprimés (DEG) et identifiés par RNA-Seq

Le nombre de DEG significatifs (FDR<0,05 et -Fold change (FC)>1,5) dans les cellules cb1C et cb1G par rapport aux témoins, est représenté dans un diagramme de Venn. Le nombre de gènes communs entre les deux groupes a été représenté en rouge dans la figure.

Les 10 DEG avec le facteur de variation positif le plus élevé et les 10 gènes avec le FC négatif le plus élevé sont présentés dans le tableau 8 avec la valeur p associée, le FDR et un résumé de leurs fonctions et des pathologies associées connues. Il est intéressant de noter que ces gènes sont soit sous-exprimés, soit surexprimés dans les deux types de cellules avec des valeurs de FC très importantes. Plusieurs gènes sont associés à un dysfonctionnement cardiaque (*TLL1*, *TRPV2*, *DUSP4*, *PPARG*) et au développement ou à la fonction du système nerveux (*EPHA5*, *ISL2*, *SAMD5*, *CDON*).

Tableau 8 : Top20 des gènes sous-surexprimés et surexprimés communs aux groupes cblC et cblG, classés par facteur de variation (FC)

Gene	Log2 FC		p-value		FDR		Fonctions
	<i>cblC</i>	<i>cblG</i>	<i>cblC</i>	<i>cblG</i>	<i>cblC</i>	<i>cblG</i>	
<i>ADGRG7</i>	-11,95	-11,48	5,45E-17	2,63E-17	9,17E-13	4,42E-13	Récepteur couplé aux protéines G
<i>EPHA5</i>	-7,72	-3,71	9,46E-06	4,86E-04	3,38E-03	4,23E-02	Protéine-tyrosine kinase (développement du système nerveux)
<i>TLL1</i>	-7,1	-4,52	2,61E-05	1,96E-04	7,41E-03	2,46E-02	Métalloprotéase, dépendant du zinc (développement du coeur des mammifères)
<i>FOXE1</i>	-7,00	-7,18	1,14E-07	3,55E-08	1,60E-04	3,73E-05	Facteur de transcription (fente palatine, morphogenèse thyroïdienne)
<i>FAM9C</i>	-6,43	-4,02	2,63E-06	2,81E-06	1,44E-03	1,21E-03	Protéine nucléaire anti-apoptotique
<i>ISL2</i>	-5,87	-4,9	1,48E-08	1,99E-08	2,49E-05	2,56E-05	Facteur de transcription (système nerveux)
<i>HTRA4</i>	-5,67	-4,06	5,29E-07	1,50E-06	4,88E-04	7,21E-04	Sérine protéase (dégradation des protéines mal repliées)
<i>AP001999.1</i>	-5,5	-3,84	7,37E-06	1,56E-05	3,03E-03	4,85E-03	ARN non codant
<i>CCDC144NL</i>	-5,37	-5,2	8,09E-09	3,98E-09	1,51E-05	7,43E-06	Protéine contenant un domaine en spirale enroulée

							(rétinopathie diabétique)
<i>SRGN</i>	-4,88	-6,17	2,25E-05	3,42E-06	6,52E-03	1,44E-03	Protéoglycanes (réponse inflammatoire)
<i>SAMD5</i>	3,54	4,82	5,57E-06	1,59E-08	2,55E-03	2,22E-05	Protéine de liaison au récepteur Eph (développement du système nerveux)
<i>RCAN2</i>	3,56	2,98	3,26E-04	2,67E-04	3,37E-02	2,95E-02	Régulateur de calcineurine 2
<i>CDON</i>	3,62	3,49	1,57E-04	3,91E-05	2,16E-02	9,25E-03	Co-récepteur multifonctionnel (myogenèse, neurogenèse)
<i>TRPV2</i>	3,7	3,82	7,18E-05	2,91E-04	1,37E-02	3,13E-02	Canal perméable au Ca ²⁺ + sensible à l'étirement (cardiomyopathie et dystrophie musculaire)
<i>COL6A6</i>	3,85	3,35	1,53E-04	1,23E-04	2,16E-02	1,93E-02	Collagène Type VI Alpha 6
<i>MLPH</i>	3,86	3,79	2,01E-04	9,30E-05	2,59E-02	1,59E-02	Mélanophiline
<i>DCN</i>	4,01	3,74	1,04E-06	5,99E-07	7,93E-04	3,59E-04	Petit protéoglycane riche en leucine (dystrophie cornéenne, myogenèse)
<i>DUSP4</i>	4,08	5,05	8,54E-06	2,03E-07	3,26E-03	1,55E-04	Phosphatase à double spécificité (cardiomyopathie)
<i>PPARG</i>	4,10	4,47	1,90E-07	6,53E-09	2,28E-04	9,98E-06	Récepteur nucléaire, régulateur de la différenciation des adipocytes (dysfonctionnement cardiaque)
<i>PRXL2A</i>	4,49	4,61	2,95E-04	1,09E-05	3,23E-02	3,73E-03	Peroxi-redoxin Like (protéine régulatrice rédox)

I.3. Analyse de l'enrichissement ontologique (GO) des DEG et voies métaboliques associées

Pour comprendre les implications biologiques et moléculaires de ces DEG dans la physiopathologie des défauts génétiques cblC et cblG, nous avons utilisé la base de données Panther pour déterminer les processus biologiques et les fonctions moléculaires qui pourraient être affectées par l'expression différentielle des gènes identifiés. L'analyse de l'enrichissement des termes GO a révélé respectivement 10 et 5 termes significativement enrichis (FDR <0,05) dans les cellules cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 23).

Dans les cellules cblC (Fig. 23A), l'analyse a montré une régulation négative significative des gènes impliqués dans les voies suivantes : développement musculaire (GO : 0014706) et différenciation (GO : 0051146), développement du système squelettique (GO : 0001501), mais aussi des processus neurologiques tels que l'orientation de l'axone des cellules ganglionnaires de la rétine (GO : 0031290) et le développement du cerveau antérieur (GO : 0030900).

Dans les cellules cblG (Fig. 23B), les annotations significatives font principalement références à une diminution de l'expression de gènes associée au développement de la structure anatomique (GO : 0048856), au développement d'organes (GO : 0048513) et à l'organisation du cytosquelette d'actine (GO : 0030036).

Les gènes surexprimés significativement dans les deux lignées cellulaires sont associés à la régulation de la localisation (GO : 0032879). Les gènes différentiellement exprimés à la fois dans les cellules cblC et cblG sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le développement embryonnaire (*ISL2*, *FOXE1*, *SALL1*), dans des processus apoptotiques (*HTRA4*, *FAM9C*, *DAPK1*) et pour des protéoglycanes extracellulaires (*LUM*, *DCN*).

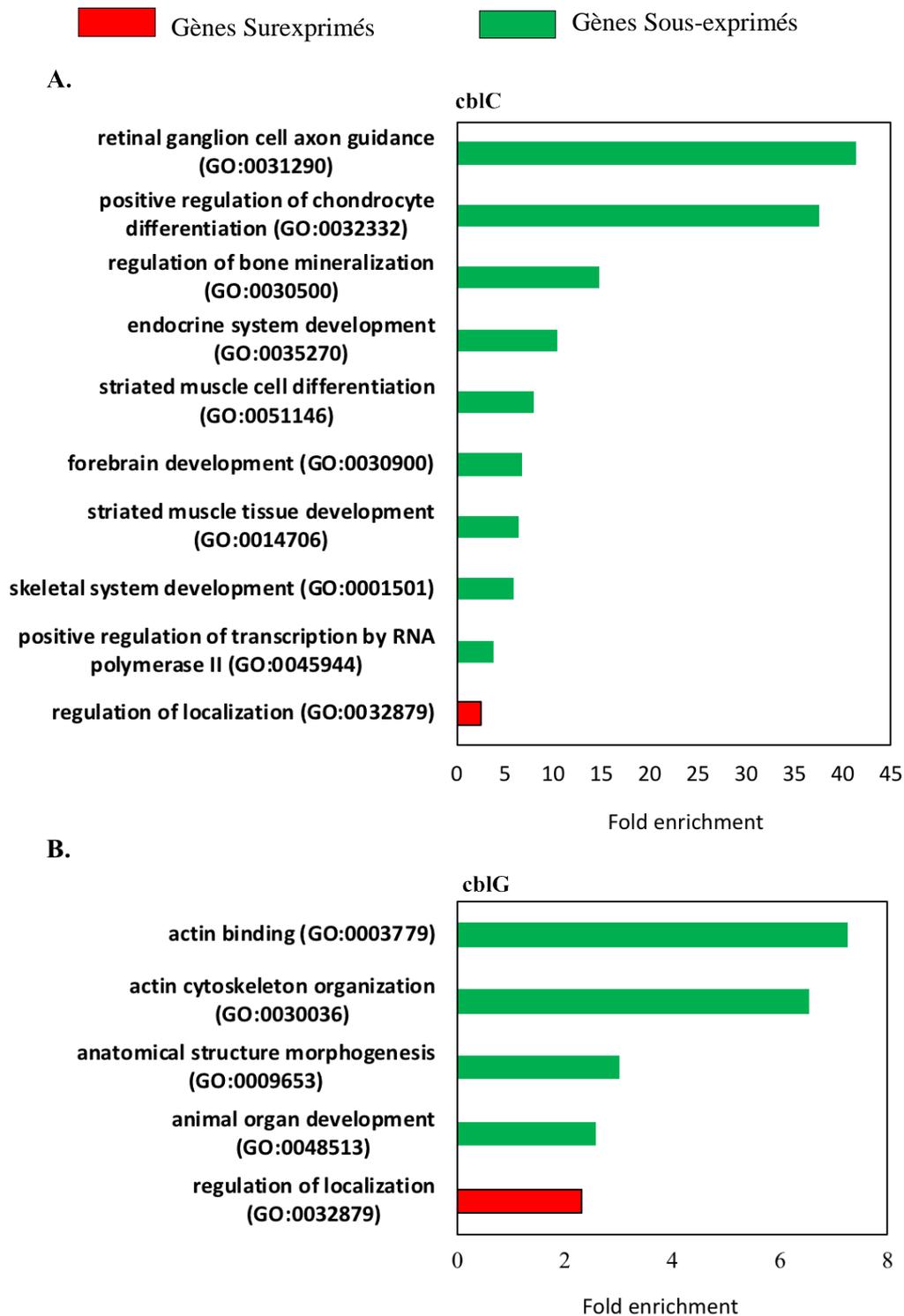


Figure 23 : Classification ontologique des gènes différentiellement exprimés (DEG)

Les DEG ont été analysés en utilisant la base de données Panther ; les groupes fonctionnels significativement enrichis ont été classés par enrichissement décroissant. Les résultats incluent les processus biologiques et les fonctions moléculaires. **A.** Annotations fonctionnelles dans le groupe cbIC par rapport au contrôle. **B.** Annotations fonctionnelles dans le groupe cbIG par rapport au contrôle. Les termes GO (vert) contiennent des gènes régulés négativement et les termes gris GO (rouge) ont des gènes régulés positivement.

Les tableaux 9 et 10 présentent les gènes différentiellement altérés et associés à certaines annotations fonctionnelles d'intérêt évoquées précédemment. Les termes GO en rouge indiquent une régulation positive des gènes impliqués tandis que les termes GO en vert font référence à des gènes régulés négativement.

Tableau 9 : Termes GO des DEG identifiés dans les groupes cbIC et gènes associés

Processus biologique (Terme GO)	P-value	FDR	Gènes
retinal ganglion cell axon guidance (GO:0031290)	8,28E-05	2,79E-02	<i>ISL2, ALCAM, BMPR1B</i>
forebrain development (GO:0030900)	3,43E-06	2,71E-03	<i>MYH10, ERBB4, LHX8, PITX1, AL512408, AL110504, ID4, CRHR1, DMD, EPHA5</i>
striated muscle tissue development (GO:0014706)	1,52E-04	4,14E-02	<i>FLNB, MYH10, RCAN1, PITX1, AL512408, MYH11, DMD</i>
skeletal system development (GO:0001501)	4,12E-06	2,96E-03	<i>AC103702, AC103702, AC103702, BMPR1B, FLI1, MATN3, PITX1, PKDCC, SHOX, SOX9, TLL1</i>
positive regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0045944)	3,43E-06	2,59E-03	<i>TLL1, SOX9, SHOX, PKDCC, PITX1, MATN3, FLI1, BMPR1B, AC103702, AC103702, AC103702</i>
regulation of localization (GO:0032879)	3,09E-06	4,88E-02	<i>CD40, TNFRSF21, DAPK1, HK2, EHD3, PPARG, RHO U, PARD6G, DCN, SRPX2, PLXNB3, KCNJ2, TRPV2, CAMK1D, RALA, BMPER, IL16, ADRA2A, APOC1, B9D1, ECM1, LAMC2, CYGB, CCDC125, TMEM30A, HK2, PLA2R1</i>

Tableau 10 : Termes GO des DEG identifiés dans le groupe cbIG et gènes associés

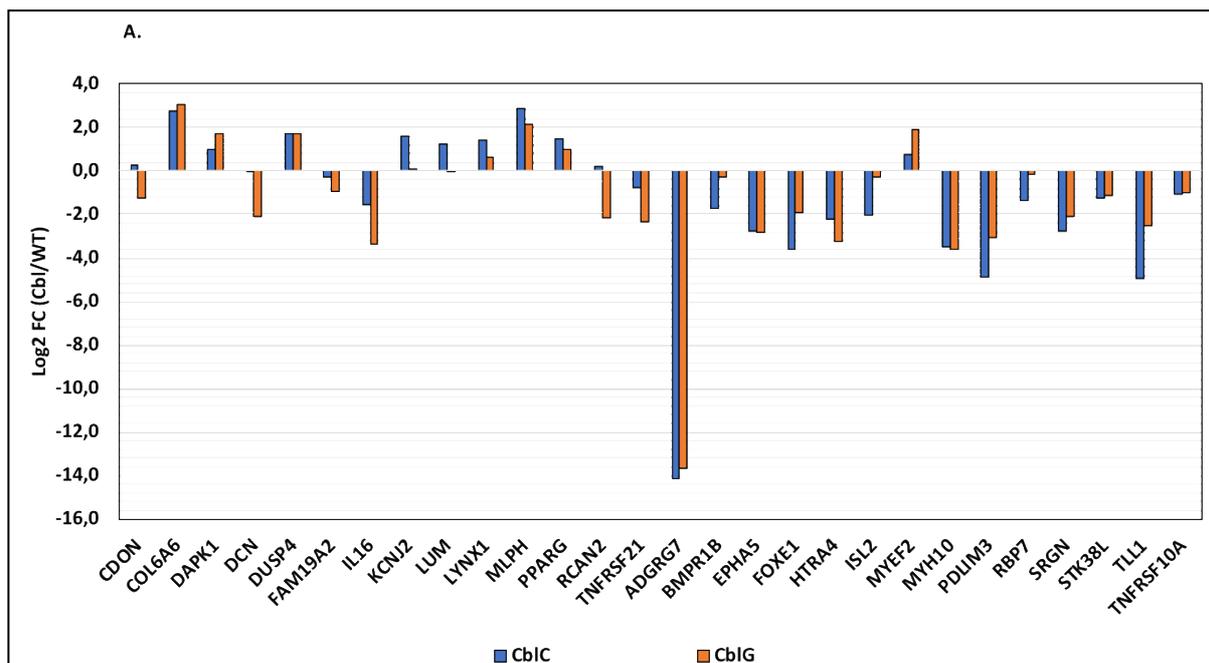
Processus biologique (Terme GO)	P-value	FDR	Gènes
retinal ganglion cell axon guidance (GO:0031290)	8,28E-05	2,79E-02	<i>ISL2, ALCAM, BMPR1B</i>
forebrain development (GO:0030900)	3,43E-06	2,71E-03	<i>MYH10, ERBB4, LHX8, PITX1, AL512408, AL110504, ID4, CRHR1, DMD, EPHA5</i>
striated muscle tissue development (GO:0014706)	1,52E-04	4,14E-02	<i>FLNB, MYH10, RCAN1, PITX1, AL512408, MYH11, DMD</i>
skeletal system development (GO:0001501)	4,12E-06	2,96E-03	<i>AC103702, AC103702, AC103702, BMPR1B, FLI1, MATN3, PITX1, PKDCC, SHOX, SOX9, TLL1</i>
positive regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0045944)	3,43E-06	2,59E-03	<i>TLL1, SOX9, SHOX, PKDCC, PITX1, MATN3, FLI1, BMPR1B, AC103702, AC103702, AC103702</i>
regulation of localization (GO:0032879)	3,09E-06	4,88E-02	<i>CD40, TNFRSF21, DAPK1, HK2, EHD3, PPARG, RHO U, PARD6G, DCN, SRPX2, PLXNB3, KCNJ2, TRPV2, CAMK1D, RALA, BMPER, IL16, ADRA2A, APOC1, B9D1, ECM1, LAMC2, CYGB, CCDC125, TMEM30A, HK2, PLA2R1</i>

I.4. Validation des DEG par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

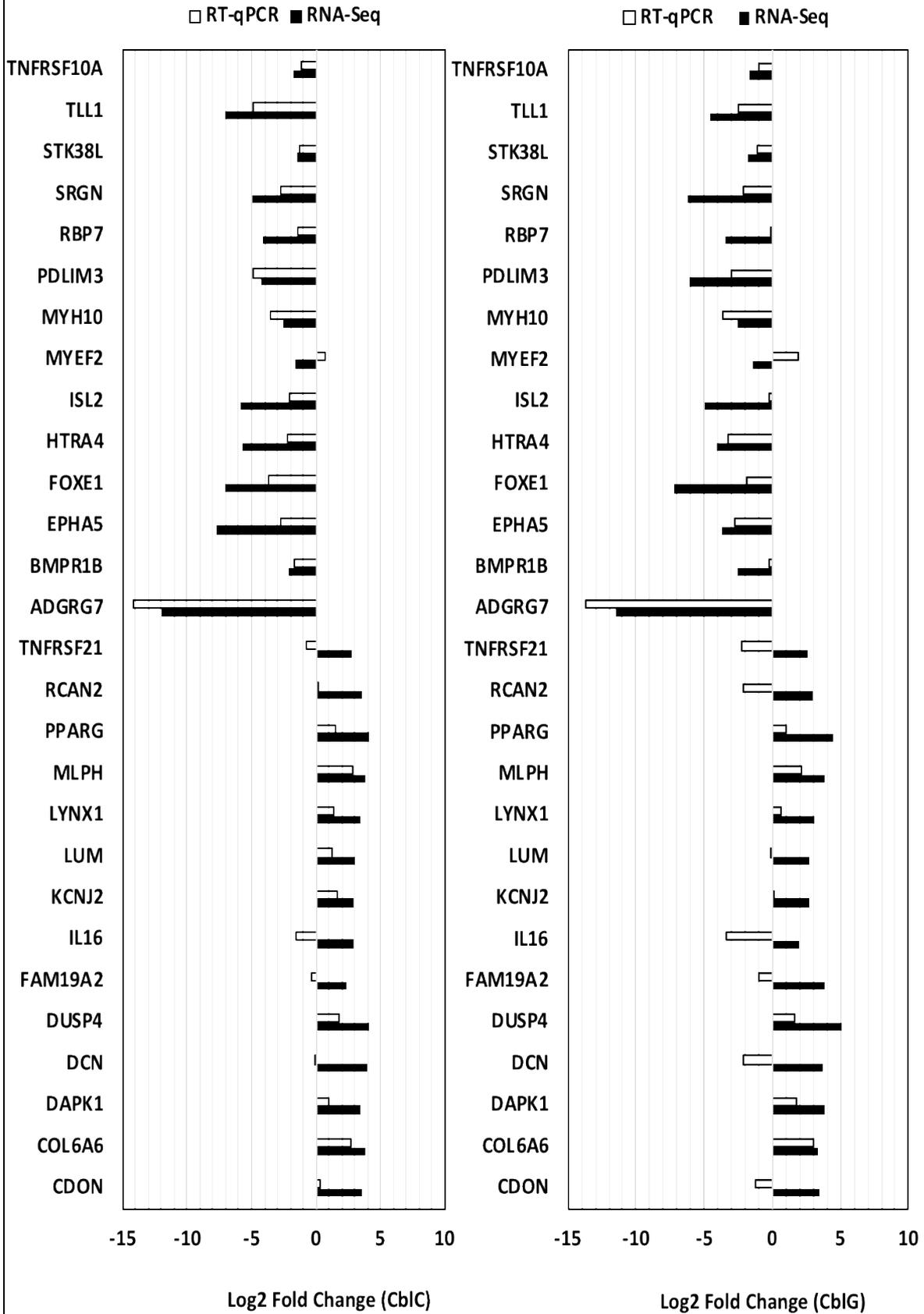
Afin de valider les données transcriptomiques obtenues par RNA-Seq, 28 DEG ont été sélectionnés sur la base de leur fold change, de leur expression différentielle et de leur implication potentielle dans la physiopathologie de la maladie. Une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) de cet ensemble de gènes a été réalisée avec l'ARNm des mêmes lignées cellulaires que celles utilisées dans l'étude RNA-Seq.

Les résultats de RT-qPCR montrent des différences dans le niveau d'expression des gènes sélectionnés dans les cellules cb1C et cb1G par rapport aux témoins (Fig. 24A). Le niveau d'expression de la majorité des gènes est régulé positivement ou négativement à la fois dans les cellules cb1C et cb1G. Parmi eux, 7 gènes ont été régulés positivement, 18 gènes ont été régulés négativement et 4 gènes sont exprimés de manière inverse entre les cellules cb1C et cb1G.

Ces résultats confirment les données identifiées par RNA-Seq avec 25 gènes sur 28 gènes validés dans les cellules cb1C (89%) et 21 gènes sur 28 dans les cellules cb1G (75%) (Fig. 24B). La relation entre les résultats du RNA-Seq et ceux de la RT-qPCR a été caractérisée par le calcul du coefficient de corrélation rho de Spearman (ρ) (Fig. 24C). Les résultats indiquent une corrélation significative entre les niveaux d'expression des gènes mesurés par RNA-Seq par rapport à ceux à la RT-qPCR. (cb1C : Rho de Spearman, $\rho = 0,8878$; P-valeur = $8,57E-7$ cb1G ; Rho de Spearman, $\rho = 0,5978$, P-value = $7,81E-4$).



B.



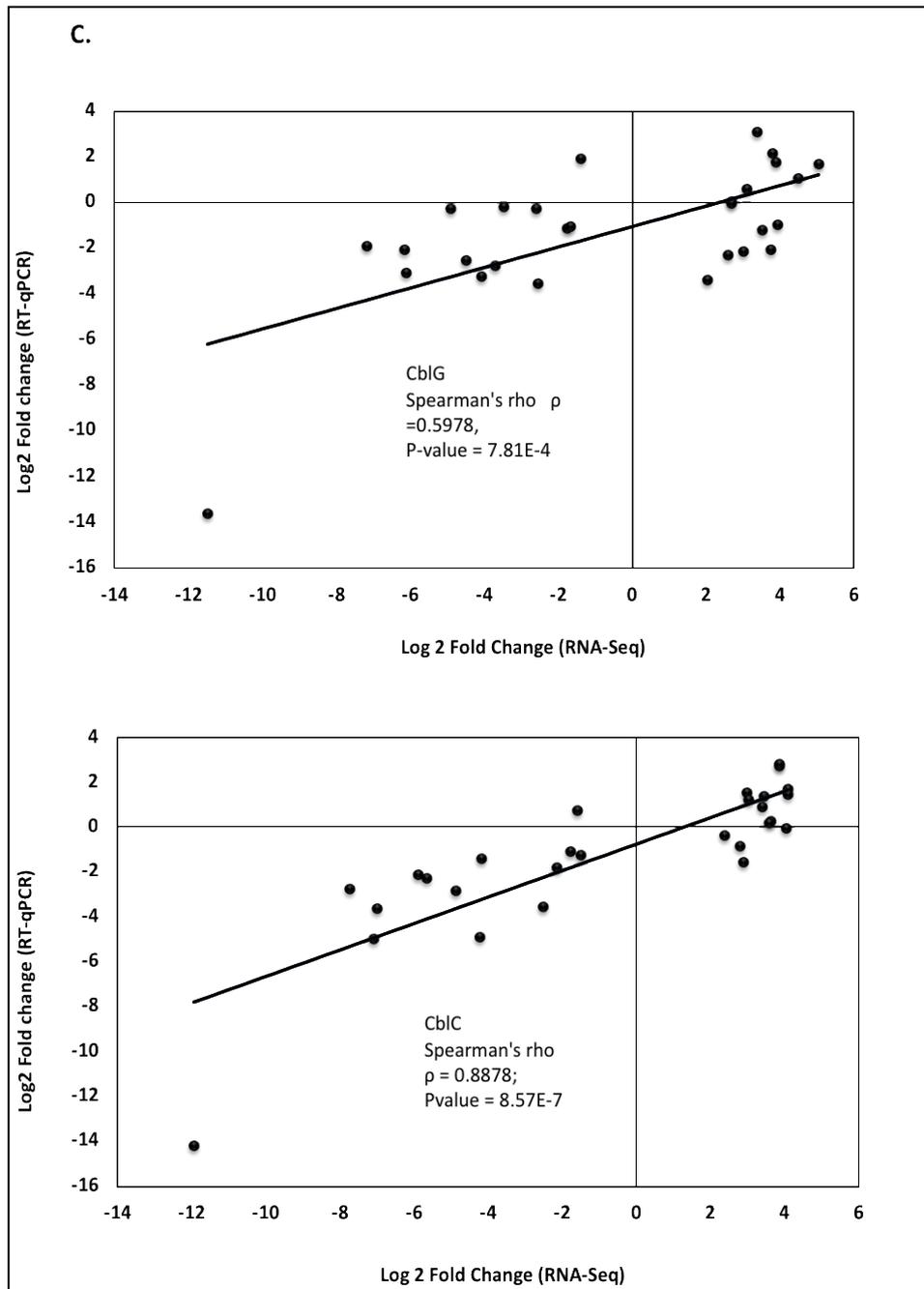


Figure 24 : Validation des gènes différentiellement exprimés par RT-qPCR

Le niveau d'expression de 28 gènes identifiés par RNA-Seq a été mesuré sur 3 lignées contrôles, 3 lignées *cblC* et 4 lignées *cblG* par RT-qPCR. **A.** Profil d'expression génique par RT-qPCR **B.** Niveau d'expression des DEG détectés par RNA-Seq et celui analysé par RT-qPCR **C.** Corrélation de spearman rho entre RNA-Seq et RT-qPCR. Les statistiques ont été effectuées à l'aide du test t de Student (bilatéral). Les données issues de la RT-qPCR sont significativement corrélées positivement avec celles identifiées par RNA-Seq (ρ de Spearman = 0,5978, $p = 7,81^E-4$ pour les échantillons *cblC* et ρ de Spearman = 0,8878, $p = 8,57^E-7$ pour le groupe *cblG*).

I.5. Validation de l'altération du niveau d'expression de DMD et de MYH1 par western blot (WB) et immunofluorescence (IF)

Dans le but de valider les données d'expression des DEG identifiés par RNA-Seq, nous avons également analysé le niveau d'expression de deux protéines musculaires : la dystrophine (*DMD*) qui intervient dans le maintien de l'architecture cellulaire et la chaîne lourde de myosine (Clarac et al. 2009) et *MYH1*, impliqué dans la contraction musculaire. Le niveau d'expression de ces deux protéines a été mesuré par western blot et par immunofluorescence dans une lignée contrôle, une lignée cblC et une lignée cblG.

Les résultats obtenus par western blot et par immunofluorescence avec les cellules cblC confirment les données transcriptomiques en montrant une forte diminution de l'expression de ces deux protéines. (Fig. 25). Et pour les cellules cblG, les deux techniques ne semblent pas montrer une diminution de l'expression de ces deux protéines par rapport au contrôle, comme le montrent les résultats du RNA-Seq.

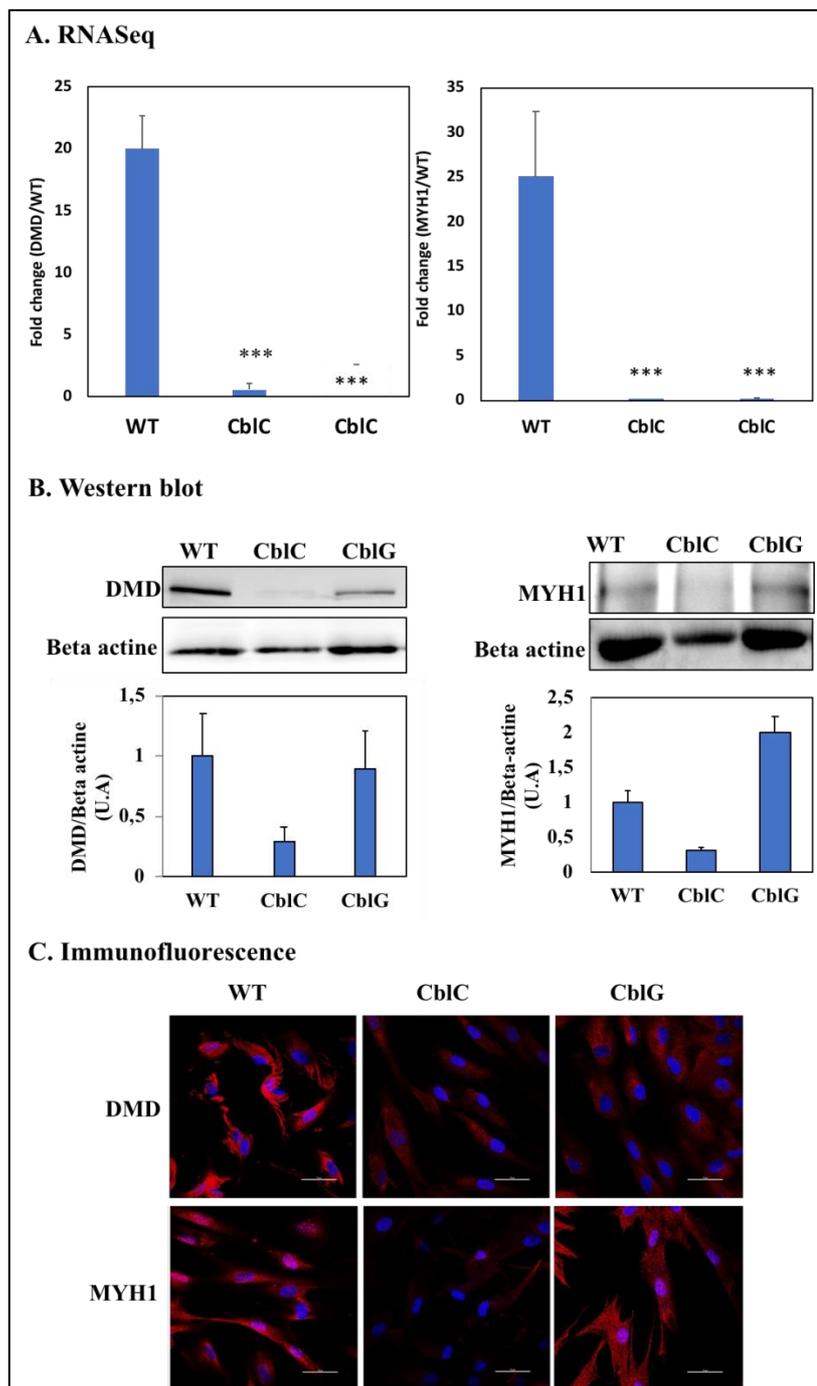


Figure 25 : Validation de l'expression de DMD et MYH1 par western blot et immunofluorescence

Mesure du niveau d'expression de DMD et MYH1 **A.** Résultats RNA-Seq **B.** Expression protéique par western blot (WB). Les valeurs densitométriques ont été normalisées par rapport à l'expression de la beta-actine **C.** Immunofluorescence après marquage par anti-MYH1 (rouge) ou anti-DMD et DAPI (bleu).

Afin de valider les résultats concernant la DMD dans les lignées de fibroblastes cblC et cblG, nous avons mesuré son expression protéique dans d'autres lignées cellulaires. Nos résultats confirment une diminution de l'expression protéique de la DMD dans 6 lignées sur 7, la lignée C3 présentant une expression légèrement augmentée par rapport au contrôle. (Fig. 26A).

Veeranki et son équipe a montré dans un modèle de souris CBS $-/+$ présentant une hyperhomocystéinémie, que le niveau d'expression de la DMD était significativement affecté (Veeranki et al. 2015). Les patients cblC et cblG présentent une accumulation d'Hcy dans le sang et les urines. Dans le but de tester l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'expression de la DMD serait due à l'hyperhomocystéinémie dans les fibroblastes de patients cblC et cblG utilisés dans cette étude, nous avons mesuré l'expression protéique de la DMD dans des fibroblastes de patients porteurs de mutations dans les gènes *MTHFR* et *CBS* et qui présentent une accumulation d'Hcy beaucoup plus importante que dans les fibroblastes cblC et cblG. Les résultats montrent que la protéine DMD est tout autant exprimée dans les fibroblastes de patients MTHFR que dans la lignée contrôle mais montrent une diminution importante dans les lignée CBS (Fig. 26B).

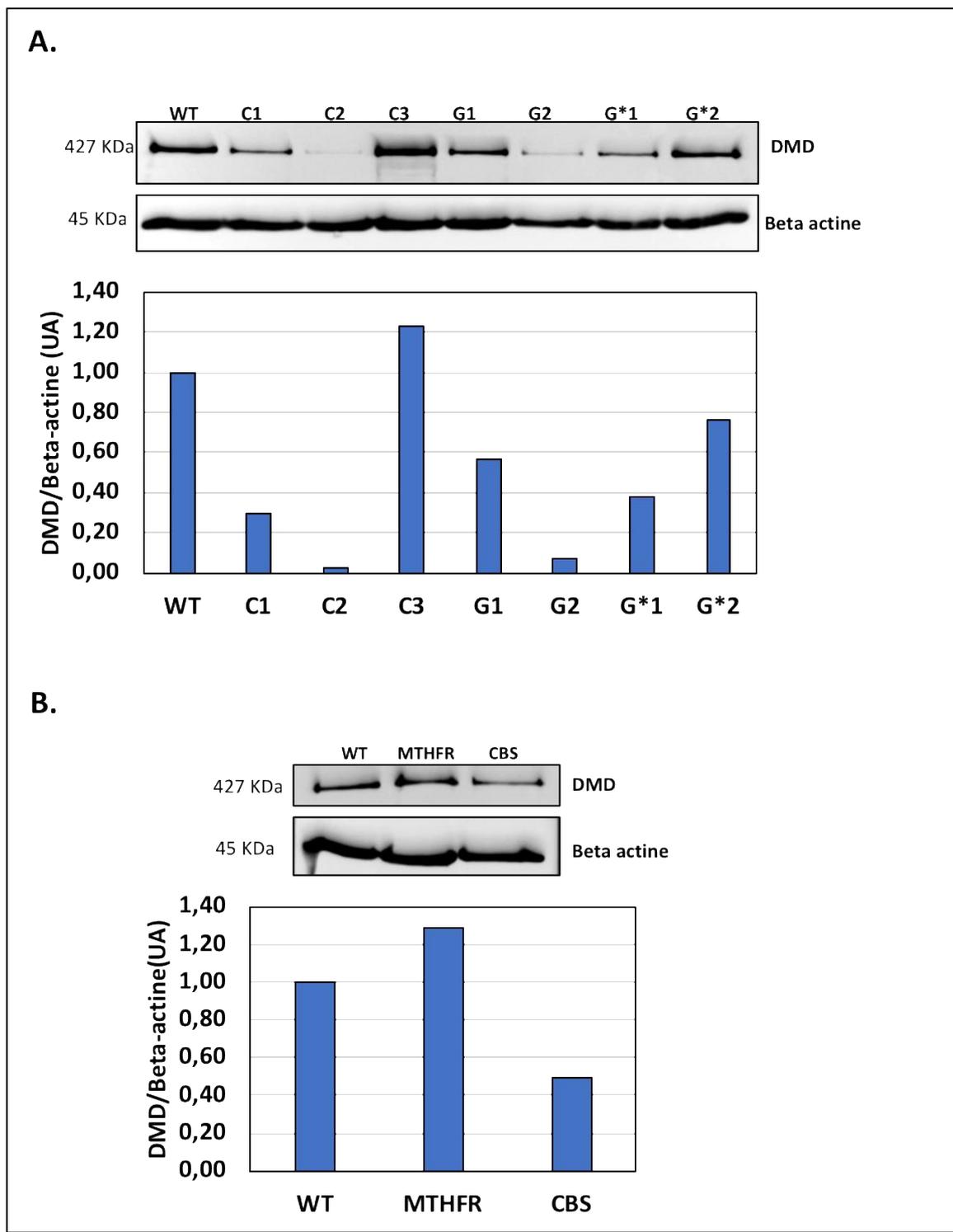


Figure 26 : Validation de l'expression de DMD dans d'autres lignées

Expression protéique par western blot (WB) : **A.** dans les lignées *cb1C* et *cb1G*, **B.** dans les lignées *MTHFR* et *CBS*. Les valeurs densitométriques ont été normalisées par rapport à l'expression de la beta-actine.

I.6. Analyse de l'épissage alternatif

Les données obtenues par RNA-Seq ont été analysées avec le logiciel rMATS (Analyse multivariée de l'épissage de transcrits) (Shen et al. 2014) afin d'identifier d'éventuelles modifications de l'épissage alternatif (AS) entre les cellules de patient et les contrôles. Ce logiciel permet la quantification des 5 types d'événements suivants : le saut d'exon (SE), le site d'épissage alternatif 5' (A5SS), le site d'épissage alternatif 3' (A3SS), l'exon mutuellement exclusif (MXE) et la rétention d'intron (RI). Pour chaque type d'événement, le pourcentage d'épissage différentiel ou « Delta-PSI » est calculé en effectuant la différence entre le pourcentage d'épissage des contrôles (PSI-WT) et celui des patients (PSI-cblC/G). La valeur peut être positive ou négative, et représente respectivement un pourcentage d'épissage différentiel plus ou moins important dans les lignées cblC et cblG par rapport aux contrôles.

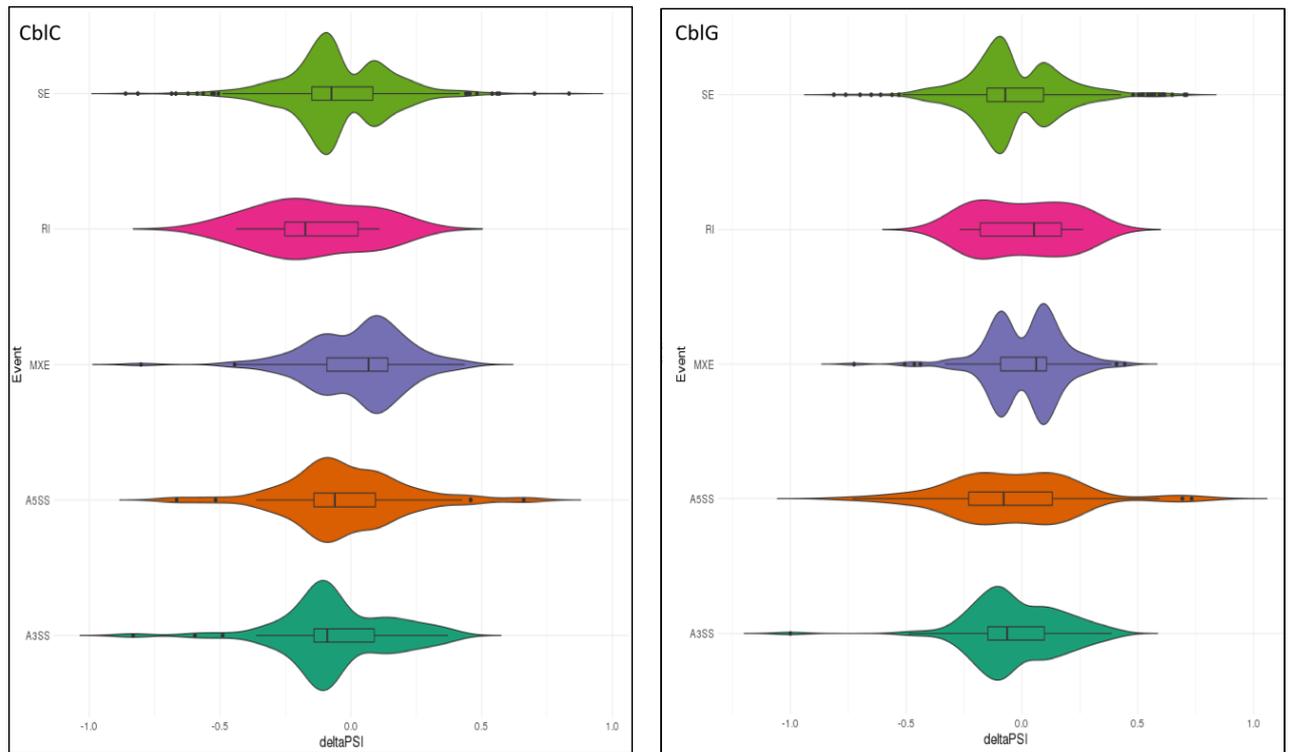
L'analyse rMATS montre que la distribution de la densité des gènes significativement affectés diffère selon le type d'évènement et la lignée cellulaire (Fig. 27A).

Dans la lignée cblC, la majorité des gènes affectés par les évènements SE, RI, A3SS et A5SS présentent un delta PSI négatif par rapport aux contrôles tandis que ceux affectés par un MXE ont un delta PSI positif.

Dans la lignée cblG, le profil de distribution des gènes est sensiblement le même que dans la lignée cblC, sauf pour les gènes affectés par un évènement A5SS où on observe la même proportion de gènes ayant un delta PSI positif ou négatif. Cependant, la densité des gènes affectés par MXE est distribuée de manière plus hétérogène dans les cellules cblG par rapport aux cellules cblC.

Plus de 70% de ces évènements représentent des sauts exons et affectent un peu plus de la moitié des gènes différenciellement épissés de manière significative (Fig. 27B).

A.



B.

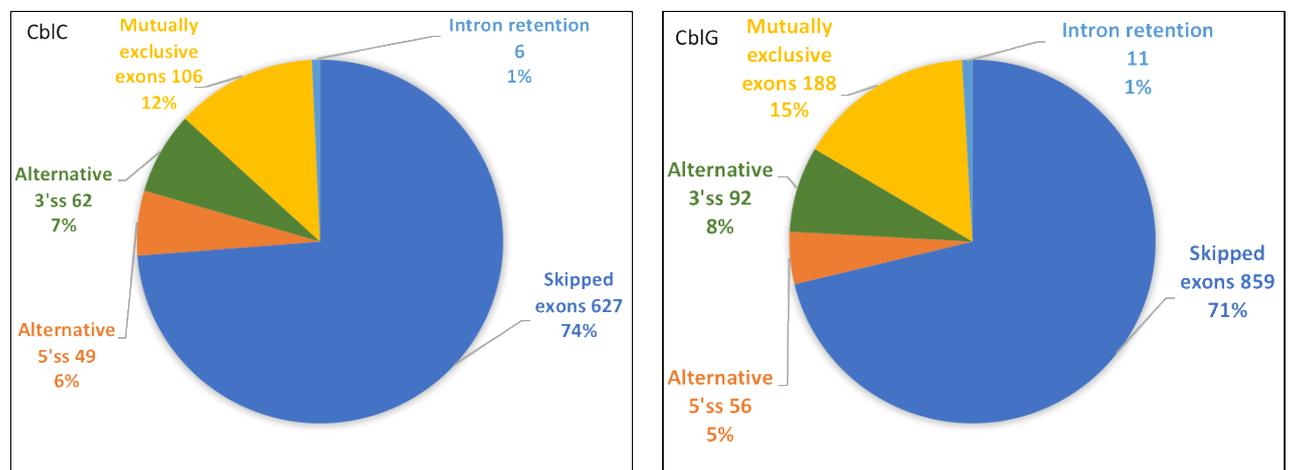


Figure 27 : Analyse de l'épissage alternatif (AS)

A. Diagramme en violon (violin plot) représentant la densité des gènes par événements d'épissage alternatif (AS) entre les échantillons témoins et les groupes *cblC* ou *cblG*. L'analyse a été effectuée en utilisant le logiciel rMATS (FDR <1% et delta-PSI > 5 %) **B.** Nombre et proportions relatives des événements AS significativement différents du contrôle (PSI delta > 5%, FDR <0,01) et identifiés par l'analyse rMATS.

Par rapport au contrôle, nous avons identifié dans les cellules cblC, 850 événements d'épissage différentiel dans 719 gènes et dans les cellules cblG, nous avons trouvé 1206 événements d'épissage différentiel dans 1007 gènes (Tableau 11). Un sous-ensemble de 314 gènes est affecté dans les deux groupes. Nous avons constaté que dans les cellules cblC et cblG, respectivement 719 et 1007 gènes montrent un épissage différentiel comparé aux témoins (FDR <0,01 et différence de pourcentage d'indice épissé (Delta PSI) >5 %). Le tableau 11 montre le nombre total de chaque type d'évènement et le nombre d'évènements significativement épissés de manière différenciée entre les patients et les témoins ainsi que le nombre de gènes qui y sont associés. La dernière ligne correspond à la somme de tous les types d'évènements et gènes associés.

Tableau 11 : Nombres d'évènements d'épissage alternatif différentiel et gènes affectés
(Analyse rMATS)

Evènements	Total par évènement		Delta PSI >5%, FDR<0,01		Nombre de gènes affectés		
	cblC	cblG	cblC	cblG	cblC	cblG	Commun cblC-cblG
SE	43072	49416	627	859	517	686	244
A5SS	3334	3618	49	56	48	55	16
A3SS	5173	5642	62	92	61	87	26
MXE	5605	7050	106	188	87	168	27
RI	2037	2214	6	11	6	11	1
Evènements totaux	59222	67940	850	1206	719	1007	314

Le tableau 12 représente les 20 gènes les plus significativement épissés de manière différentiel (delta PSI>5% et FDR<0,01). La liste complète des gènes épissés différentiellement (DSG) de manière significative dans les deux groupes est présentée dans l'annexe 2. La différence d'épissage entre ces gènes et le témoin varie entre -0,100 (- 100% épissés chez les patients par rapport au contrôle) et 0,100 (+ 100% épissés chez le contrôle par rapport aux lignées cblC ou cblG). Comme le montre le tableau 12, par exemple, le gène *TVP23C-CDRT4* est affecté par un saut d'exon avec une delta PSI de 0,834 dans la lignée cblC (83,4% du gène subit un saut d'exon plus important chez le témoin par rapport au cblC) et 0,711 dans la lignée cblG (71,1% du gène subit un saut d'exon plus important chez le témoin par rapport au cblC).

Il est important de noter que certains gènes affectés par un évènement particulier peuvent résulter en plusieurs deltaPSI positif ou négatif probablement dus au type d'exon affecté. Ce phénomène est observé par exemple pour le gène *TVP23C-CDRT4* qui subit soit un saut d'exon, soit un MXE et dans les deux cas, cela aboutit à différentes valeurs DeltaPSI positives ou négatives.

Tableau 12 : Top20 des gènes affectés significativement par des événements d'épissage alternatif

Evènement CbIC	Gène	p-value	FDR	Delta PSI (WT-CbIC)	Evènement CbIG	Gène	p-value	FDR	Delta PSI (WT-CbIG)
SE	TVP23C-CDRT4	0,00E+00	0,00E+00	0,834	A5SS	ULK3	0,00E+00	0,00E+00	0,733
A3SS	XRCC4	0,00E+00	0,00E+00	0,832	A5SS	FAAP20	3,51E-07	5,08E-05	0,731
MXE	TVP23C-CDRT4	0,00E+00	0,00E+00	0,802	MXE	TVP23C-CDRT4	0,00E+00	0,00E+00	0,725
SE	DRAM2	0,00E+00	0,00E+00	0,702	SE	TVP23C-CDRT4	0,00E+00	0,00E+00	0,711
A5SS	C8orf59	0,00E+00	0,00E+00	0,666	SE	DRAM2	0,00E+00	0,00E+00	0,702
A5SS	ULK3	0,00E+00	0,00E+00	0,661	A5SS	TLL3	2,20E-11	9,95E-09	0,693
A3SS	ZNF655	1,06E-10	1,37E-07	0,596	SE	NDUFB2	0,00E+00	0,00E+00	0,649
SE	USP53	0,00E+00	0,00E+00	0,568	SE	GUSBP11	2,48E-08	5,07E-06	0,615
SE	DRAM2	0,00E+00	0,00E+00	0,559	SE	USP28	1,52E-05	1,17E-03	0,611
SE	ALDH3A2	9,66E-06	8,27E-04	0,54	SE	AP00034 7.1	2,70E-08	5,46E-06	0,61
SE	TVP23C	0,00E+00	0,00E+00	-0,861	A3SS	XRCC4	0,00E+00	0,00E+00	-1
SE	TVP23C-CDRT4	0,00E+00	0,00E+00	-0,814	SE	GHR	0,00E+00	0,00E+00	-0,812
SE	ZNF561	4,26E-10	1,82E-07	-0,685	SE	TVP23C	0,00E+00	0,00E+00	-0,761
SE	DMKN	4,29E-14	3,77E-11	-0,669	SE	TVP23C-CDRT4	0,00E+00	0,00E+00	-0,699
SE	ECHDC2	3,53E-09	1,12E-06	-0,622	SE	LIMS2	0,00E+00	0,00E+00	-0,651
SE	CROCCP2	8,40E-10	3,17E-07	-0,587	SE	AP00034 7.2	4,74E-06	4,57E-04	-0,61
SE	DMKN	4,83E-11	2,66E-08	-0,564	SE	CCDC74B	6,12E-05	3,45E-03	-0,561
SE	ZNF45	6,32E-07	8,57E-05	-0,53	SE	CCDC74B	6,81E-05	3,74E-03	-0,531
SE	SNX11	1,11E-05	9,22E-04	-0,524	SE	CROCCP2	6,17E-06	5,71E-04	-0,515
SE	CROCCP2	8,52E-10	3,19E-07	-0,523	SE	SENP7	9,35E-12	5,08E-09	-0,505

Afin de déterminer si l'épissage alternatif différentiel des gènes a un lien avec les DEG, nous avons croisé la liste des gènes différentiellement épissés de manière significative et celles des DEG (Tableau 13). Les résultats ont montré que respectivement 8 et 12 gènes sont différentiellement épissés et exprimés de manière significative chez les cblC et cblG par rapport au contrôle.

La perte d'expression du gène *ANP32E* ($FC = -0,8$) a été observée et associée à un saut d'exon entraînant une différence d'épissage de $-0,107$ chez le groupe cblC comparé au contrôle. Chez la souris, ce gène serait impliqué dans le développement cérébral et la synaptogénèse (Costanzo et al. 2006). Dans les lignées cblG, un total de 5 gènes (*FHOD3*, *MYEF2*, *PMS2P1*, *GDNF*, *SVIP*) sur 12 présentent des niveaux d'expression diminués associés à un saut d'exon (SE) entraînant un delta PSI négatif pour tous les gènes. Parmi ces gènes, certains sont associés à des maladies cardiaques (*FHOD3*, *MYEF2*), à des maladies neurologiques (*PMS2P1*, *GDNF*) et à la dégradation du protéasome (*SVIP*). Seul un gène (*SNHG5*) est en commun entre les deux groupes et joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes en inhibant les micro-ARNs.

Tableau 13 : Liste des gènes différentiellement épissés et exprimés de manière significative dans les groupes de patients

	Gènes	Expression génique Log2 (FC)	Epissage alternatif		Fonctions
			Evènement AS	delta PSI	
cblC	<i>ADCY4</i>	2,4	SE	0,207	Enzymes qui catalysent la formation d'AMPc (peuvent être couplés à des récepteurs olfactifs)
	<i>RNMT</i>	0,8	SE	0,174	Méthyltransférase (méthyle la position N7 de la guanosine ajoutée à la structure 5'-cap des ARNm)
	<i>NTAN1</i>	0,9	MXE	0,159	Enzyme de dégradation des protéines
	<i>SNHG5</i>	2,8	A5SS	0,097	ARN non codant (régule l'expression des gènes par dégradation de la RBP)
	<i>HEBP2</i>	1,1	SE	-0,063	Mort cellulaire nécrotique

	<i>DCN</i>	4	SE	-0,091	Assemblage de fibrilles de collagène (dystrophie cornéenne)
	<i>ANP32E</i>	-0,8	SE	-0,107	Rôle dans le développement cérébelleux et la synaptogenèse
	<i>RASSF8</i>	2,1	SE	-0,125	Rôle dans la migration des cellules épithéliales (Synpolydactylie)
cblG	<i>ABCB4</i>	3,9	SE	0,248	Transport de phospholipides dans les hépatocytes
	<i>SNHG5</i>	2,5	SE	0,221	Régulation de l'expression des gènes
	<i>CCDC102B</i>	3,4	SE	0,32	Liaison protéique
	<i>COL6A3</i>	1,5	SE	0,12	Protéine de liaison aux cellules (Myopathie de Bethlem 1)
	<i>FHOD3</i>	-1,5	SE	-0,052	Rôle dans la polymérisation des filaments d'actine dans les cardiomyocytes (cardiomyopathie dilatée)
	<i>MYEF2</i>	-1,4	SE	-0,057	Répresseur transcriptionnel du gène de la myéline (Hypertrophie physiologique et pathologique du Cœur)
	<i>PMS2P1</i>	-0,8	SE	-0,099	Activité kinase (maladie d'alzheimer)
	<i>GDNF</i>	-1,7	SE	-0,251	Syndrome d'hypoventilation centrale congénitale
	<i>SVIP</i>	-1,3	SE	-0,359	Traitement des protéines dans le réticulum endoplasmique ; dégradation par le protéasome
	<i>ARMC4</i>	1,8	SE	-0,387	Protéine ciliaire impliquée dans l'assemblage de la dynéine externe axone, mouvement ciliaire et flagellaire
	<i>OSBPL1A</i>	1,1	SE	-0,426	Lie le 25-hydroxycholesterol et le cholestérol
	<i>DHRS4-ASI</i>	0,7	SE	-0,432	ARN non codant

I.7. Analyse fonctionnelle des gènes affectés significativement par des événements d'épissage alternatifs

Afin de mieux comprendre les fonctions potentielles des gènes affectés par des événements AS différentiels dans la physiopathologie des défauts cblC et cblG, nous avons utilisé la base de données Panther pour analyser l'enrichissement de ces gènes dans les termes GO. L'analyse a permis d'identifier, respectivement 8 et 13 fonctions incluant des processus biologiques et moléculaires chez les groupes cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 28).

Dans les cellules cblC, l'analyse GO a montré que les principaux processus biologiques affectés sont liés aux processus métaboliques, à la réparation de l'ADN, à la réponse aux dommages de l'ADN et au stress cellulaire, à l'organisation du cytosquelette, mais également à la modification des macromolécules et notamment la méthylation et la modification de l'histone. Plus important encore, les principales fonctions moléculaires affectées par les modifications de l'épissage alternatif sont des fonctions liées à la contribution du métabolisme des monocarbones à la régulation de l'expression des gènes, telles que la protéine-lysine N-méthyltransférase, la méthyltransférase SAM-dépendante et les activités de liaison à l'ARN.

Dans les cellules cblG, l'analyse GO a également montré une implication de gènes exprimés de manière différentielle dans des processus de modification de protéines tels que les histones H3-K9, la réparation des dommages à l'ADN, l'organisation du cytosquelette, l'expression des gènes et la liaison à l'ARN.

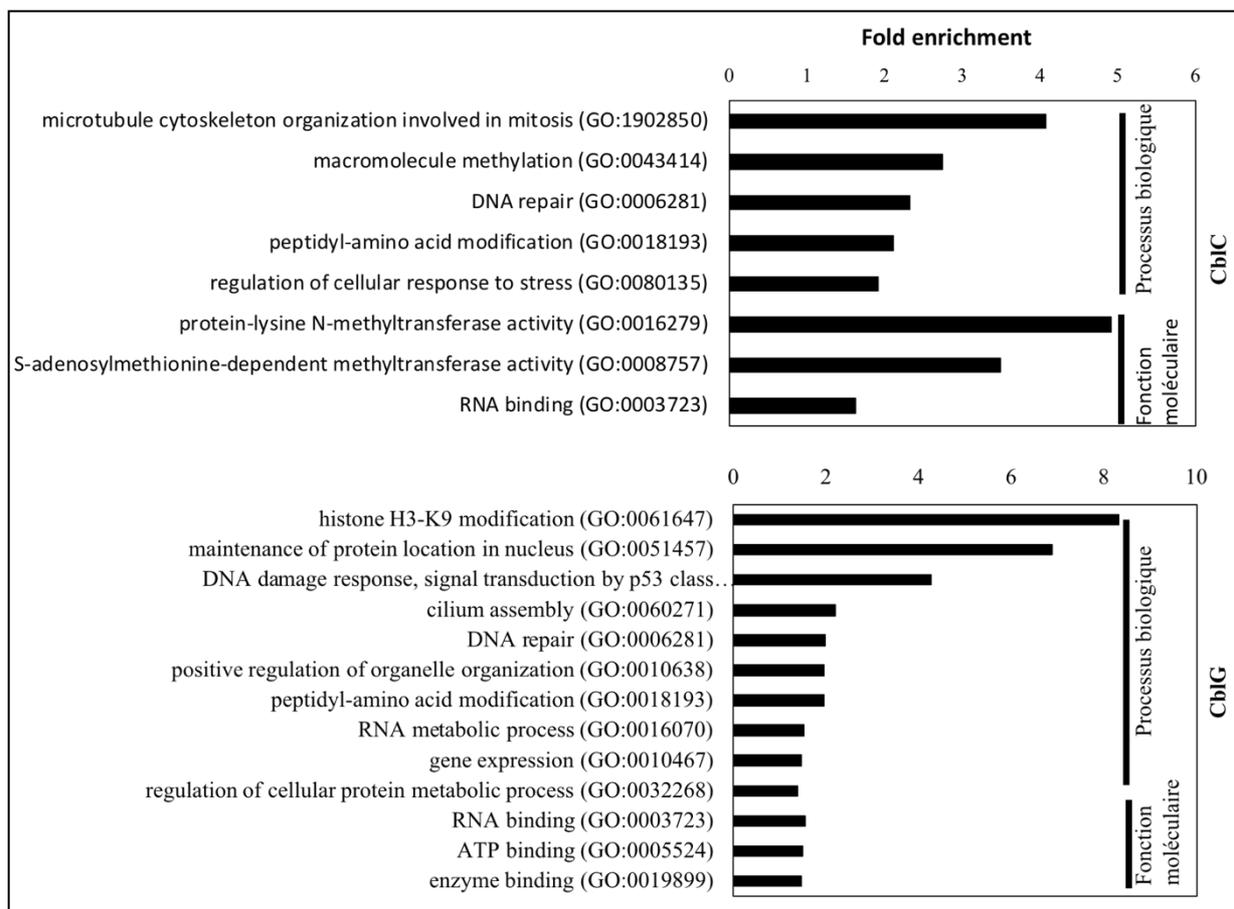


Figure 28 : Annotations fonctionnelles des gènes différentiellement épissés de manière significative

Les gènes épissés significativement avec un delta PSI > 5% et FDR < 1% ont été analysés en utilisant la base de données Panther. Les termes GO significatifs (FDR < 0,05) incluant les processus biologiques et les fonctions moléculaires ont été classés par décroissant.

I.8. Validation expérimentale d'épissage alternatif par RT-PCR

Afin de corroborer l'analyse rMATS, nous avons sélectionné 5 gènes affectés par un saut d'exon (SE) pour *XIAP*, *BMF*, *EEF1AKMT1* et *PRMT2* et par A5SS pour *MBD5* afin de valider expérimentalement les résultats d'événements AS par RT-PCR. Les amorces ont été conçues dans des exons en amont et en aval de l'exon concerné par l'événement d'épissage alternatif puis testées sur une lignée de cellules cblC et cblG.

Nos résultats confirment une différence dans l'épissage alternatif des gènes *XIAP*, *MBD5*, *EEF1AKMT1* et *PRMT2* dans les lignées de patients cblC et cblG par rapport au contrôle mais aucune variation pour le gène *BMF* (Fig. 29).

Dans la lignée cblC, les résultats de RT-PCR ont montré un delta PSI inférieur à 5% pour les gènes *BMF* et *EEF1AKMT1*. Ce résultat confirme les données de l'analyse rMATS dans lesquelles aucune différence significative n'a été détectée pour ces gènes, à l'exception de *PRMT2* (DeltaPSI = -0,154). En revanche, dans la lignée cblG, seuls les gènes *XIAP* (-0,268), *BMF* (0,028) et *EEF1AKMT1* (-0,100) ont été validés par RT-PCR, comme l'indiquent les données rMATS : *XIAP* (- 0,174), *BMF* (0,285) et *EEF1AKMT1* (-0,248) ont été validés par RT-PCR.

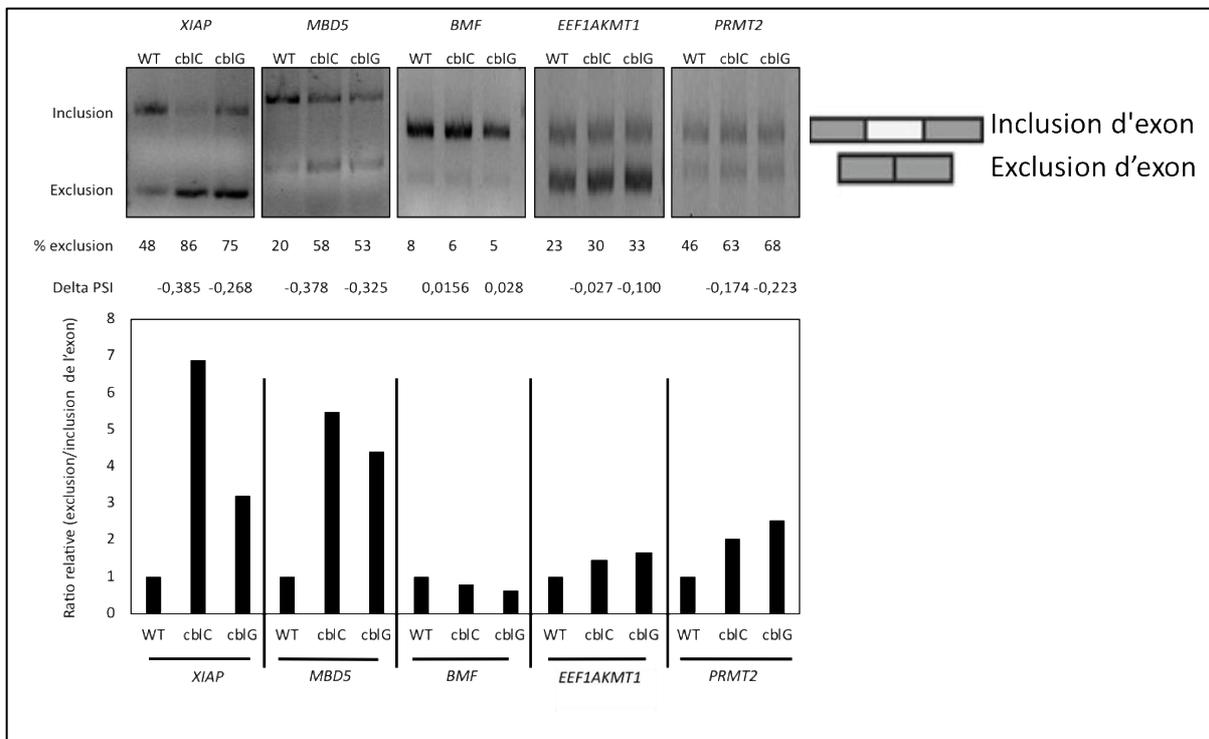


Figure 29 : Validation expérimentale par RT-PCR des différences d'épissage alternatif entre les groupes de patients et les contrôles

*La PCR a été réalisée en utilisant la méthode touchdown et les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose afin d'identifier les différents isoformes des transcrits alternatifs. Une analyse densitométrique a été réalisée sur les bandes. Le pourcentage d'exclusion pour chaque lignée a été calculé comme suit : $\text{exclusion}/(\text{exclusion}+\text{inclusion}) * 100$ et le delta PSI a été calculé en effectuant la différence des pourcentages entre le contrôle et le groupe cblC ou cblG. L'histogramme représente les valeurs relatives du ratio (exclusion/inclusion).*

I.9. Identification des protéines de liaison à l'ARN (RBP) impliquées dans l'AS

L'épissage alternatif est un mécanisme régulé par la liaison de facteurs régulateurs, dont les protéines de liaison à l'ARN (RBP) afin de favoriser ou inhiber l'inclusion ou l'exclusion des exons dans les transcrits concernés.

Dans le but de déterminer si certaines RBP seraient responsables des événements d'épissage différentiels précédemment identifiés dans les cellules cblC et cblG, nous avons examiné les régions entourant les exons différentiellement épissés afin d'identifier les motifs ou les sites de liaison de RBP qui pourraient être surreprésentés. Ainsi, nous avons soumis les données issues de l'analyse rMATS, au logiciel rMAPS (RNA map analysis) (<http://rmaps.cecsresearch.org>) en utilisant les paramètres par défaut, afin de générer des cartes d'ARN.

Au total, nous avons identifié 66 motifs autour d'exons épissés alternativement dans les cellules cblC et 49 motifs dans les cellules cblG (Tableau 14). Le nombre de RBP reconnaissant ces modèles est de 43 pour le groupe cblC et de 44 pour le groupe cblG. Parmi les 25 RBP partagés par les cellules cblC et cblG, 14 sont supposées contribuer aux événements SE.

Tableau 14 : Nombre de motifs de reconnaissance de RBP significatifs (Nombre de RBP)

Évènements	cbIC	cbIG	Common cbIC-cbIG
SE	35 (32)	23 (23)	(14)
A5SS	4 (3)	7 (7)	(0)
A3SS	9 (7)	8 (8)	(2)
MXE	17 (9)	10 (5)	(0)
RI	0 (0)	1 (1)	(0)
Total	66 (43)	49 (44)	(25)

Le tableau 15 présente les 20 principaux motifs des RBP triés par enrichissement du motif > 2 et du $\log(p) > 2,8$. La liste complète des motifs et des RBP associés est présentée dans l'annexe 3. Certaines RBP reconnaissent un ou plusieurs types de motifs pouvant induire un épissage alternatif d'une ou plusieurs catégories d'évènements (SE, A3SS, A5SS, MXE, RI).

Nous avons récemment démontré en utilisant des fibroblastes de patients cbIC et cbIG que ces défauts génétiques sont associés à une mauvaise localisation globale de l'ARNm et à une localisation subcellulaire anormale des protéines de liaison à l'ARN HuR, HnRNPA1 et SRSF1 (Battaglia-Hsu et al, 2018) ; (Ghemrawi et al. 2019). Notre analyse des motifs d'ARN suggère que d'autres RBP jouent également un rôle important dans l'épissage aberrant détecté dans les fibroblastes cbIC et cbIG : PCBP2 et SRSF7 dans les cellules cbIC, ; HNRNPL, KHDRBS1, MSI1, RBM5, SRSF10 et SRSF3 dans les cellules cbIG et ELAV1/HuR, FMR1, HNRNPC, HNRNPK, IGF2BP2, IGF2BP3, LIN28A, PTBP1, RBM37, SRSF1, SRSF9, TARDBP et TIA1 dans les deux types de cellulaire.

Tableau 15 : Top 20 des motifs de reconnaissance des RBP identifiés par l'analyse

rMAPs

Evenement CbIC	Motif de reconnaissance	RBP	Enrichisse ment	log p val	Evenement CbIG	Motif de reconnaissance	RBP	Enrichisse ment	log p val
MXE	[ACG][AC]A[AC T][AT]CA	IGF2BP2	35,71	3,10	RI	GGA[GC]G[AG] [ACG]	SRSF1	67,30	3,91
A3SS	TT[GT][AG]TTT	HuR	19,65	4,98	MXE	[AT]TTTT[CG T]	TIA1	28,00	3,94
MXE	AAAAAA[AG]	PABPC4	19,60	4,65	MXE	[AT]TTTT[CG T]	TIA1	20,00	2,95
SE	[AG]GAAGAAC	SF2-ASF	15,00	3,30	A5SS	[GT]GACA[AG] G	FMR1	16,40	4,20
A5SS	AGAGA[AG][AG]	SRSF10	11,90	3,45	A5SS	[AG][AT]TCAA G	SNRNP70	16,20	3,68
A3SS	TT[AT]GTTT	HuR	11,20	3,34	A3SS	AGGAT[AGT][A G]	G3BP2	7,65	3,10
A3SS	GGAGGA	SRSF1	9,37	3,44	A3SS	TGGTGG	ESRP1	7,65	3,05
A5SS	[AT]TAATT[AG]	A1CF	9,20	3,20	SE	[CT]GGAGG[A G]	LIN28A	6,60	6,63
MXE	AAAAAA[AG]	PABPC4	7,50	3,50	A3SS	GATGA[AT]	RBM47	6,20	3,16
SE	GATGA[AT]	RBM47	5,42	4,44	SE	[GC][GC]GCGC [GC]	PPRC1	5,00	4,54
MXE	AGGAT[AGT][A G]	G3BP2	5,25	3,36	A5SS	A[AG]AAAA[AC]	PABPC1	4,32	3,67
MXE	AGGAT[AGT][A G]	G3BP2	4,67	3,30	A5SS	A[AG]AAAA[AC]	SART3	4,32	3,67
A5SS	A[AG]AG[AG][A G][AG]	SRSF10	4,24	5,80	SE	[GC]AAGG[AG] G	RBM5	4,14	4,55
MXE	A[AG]AAAA[AC]	PABPC1	4,07	3,78	A5SS	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	4,01	3,12
MXE	A[AC]A[CT]A[A C]A	HNRNPL	4,02	3,44	A5SS	[AGT]GAC[AG] [AG][AG]	FXR2	4,01	3,08
MXE	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	4,01	4,09	A3SS	CC[AT][AT][AC T]CC	PCBP1	3,96	2,90
MXE	GGAG[AT][AGT]	SRSF2	4,01	4,17	A5SS	[CT][CT][AT]C AT][GC]G	SRp55	3,96	2,93
A3SS	[GT]G[AG][AT] G[GC][AC]	SRSF9	4,01	6,55	SE	[GT]ATATA[GC]	RBMS1	3,82	4,11
SE	[AG][AT]TCAAG	SNRNP70	4,00	3,51	A3SS	[AG]AT[GC]A[A T][AGT]	RBM46	3,78	3,23
A5SS	[GT]T[AG][AG]T [GT][GT]	SFPQ	3,9	4,382	SE	CC[AT][AT][ACT]CC	PCBP1	3,74	4,01

Dans les deux lignées cellulaires par exemple, SRSF1 est une RBP ayant la capacité de reconnaître deux types de motifs : GGAGGA dans la lignée cbIC et GGA[GC]G[AG][ACG] dans la lignée cbIG résultant en une différence d'épissage impliquant respectivement les événements A3SS et RI/MXE par rapport au contrôle. La figure 30 représente les cartes d'ARN reconnues par SRSF1 (Fig. 30).

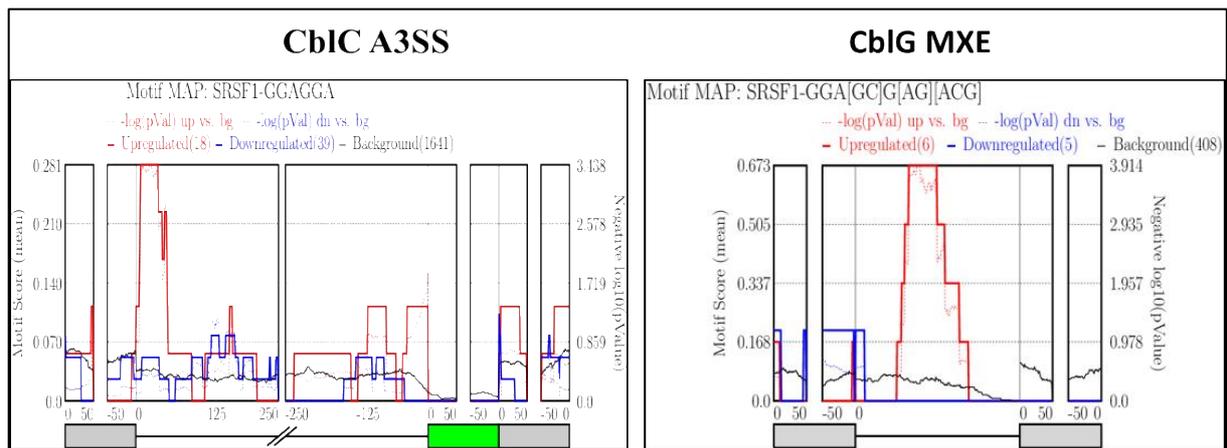


Figure 30 : Carte d'ARN de SRSF1

L'analyse rMAPS fournit les différents motifs reconnus par les RBP en fonction du type d'évènement. La significativité des cartes d'ARN dépend de deux paramètres importants : le motif score et le $\log_{10}(p)$. L'histogramme en rouge représente le score du motif de la RBP qui induit des Delta PSI positives tandis que le bleu représente les delta PSI négatives par rapport au « background ». L'histogramme en tiret plein représente le score du motif et celui en pointillés représente le $\log_{10}(p)$.

I.10. Analyse de l'enrichissement en cibles des RBP

L'analyse de l'enrichissement en cibles des RBP identifiées précédemment a été calculée en utilisant la base de données « Starbase.V3 » comme base de données de référence. Les résultats ont montré 21 RBP surreprésentées au niveau des cibles associées (enrichissement >1) (Fig. 31).

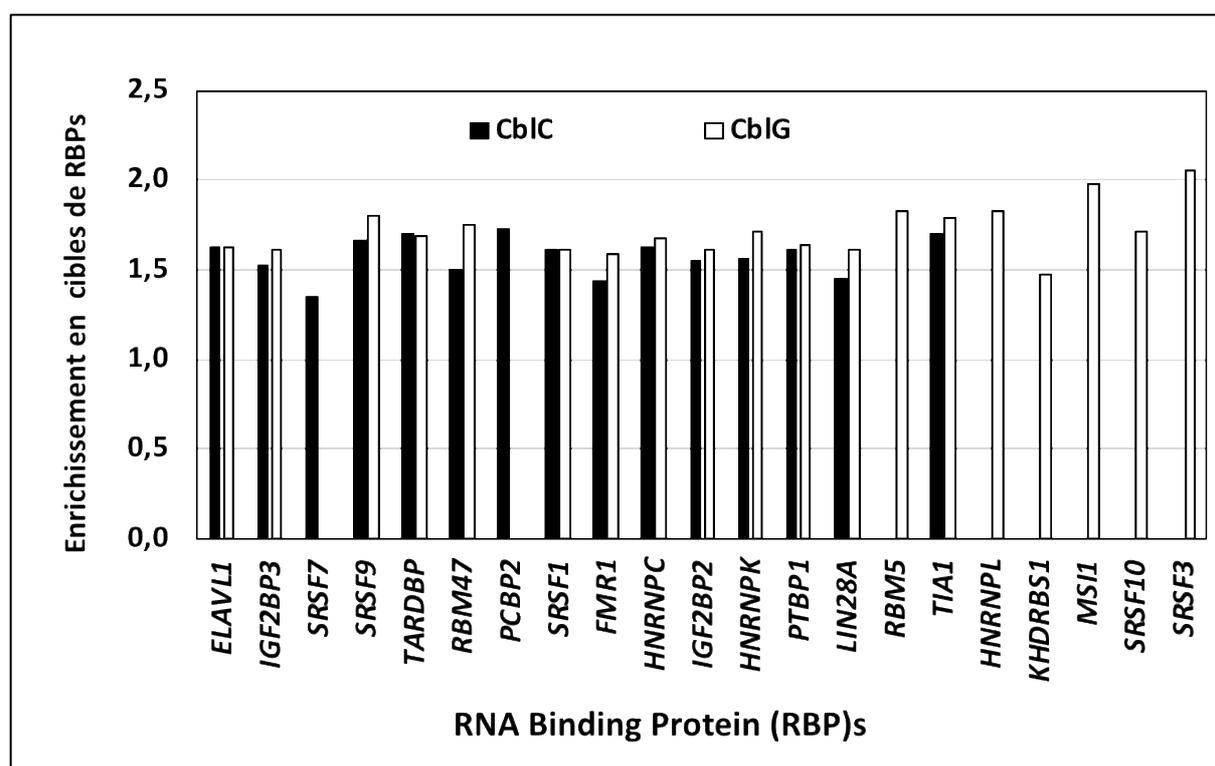


Figure 31 : Enrichissement des cibles en RBP

L'enrichissement des cibles des RBP identifiés par l'analyse rMAPs a été calculé en utilisant la base de données « Starbase.V3 » comme base de données de référence.

I.11. Étude des modifications des RBP

A. Étude de la localisation subcellulaire

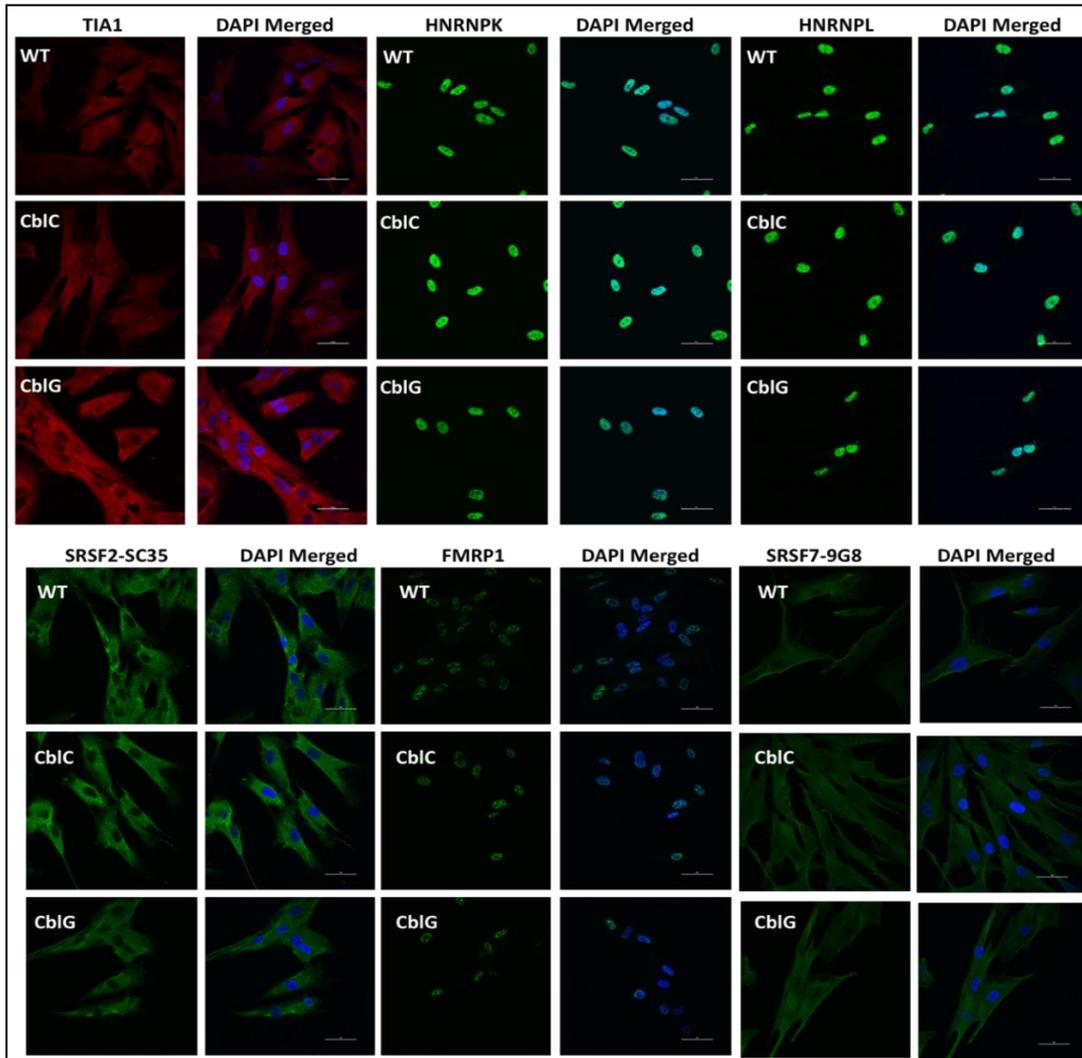
Les RBP sont connues pour être des facteurs régulateurs de l'épissage de nombreux gènes impliqués dans plusieurs processus physiologiques (développement) et pathologiques (maladies neurodégénératives). Notre laboratoire a montré qu'un dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine B12 induit un stress cellulaire dans les modèles cellulaires de neuroblastome NIE115 et dans les fibroblastes de patients cblC et cblG. Ce stress cellulaire est associé à la délocalisation de certains RBP (HuR, HNRNPA1, SRSF1, Y14) suggérant le rôle clé des RBP sensibles au stress, dans les mécanismes moléculaires responsables des pathologies neurodégénératives (Battaglia-Hsu et al. 2018); (Ghemrawi et al., 2019). Nous avons identifié des altérations de l'épissage alternatif de gènes dont les transcrits sont reconnus par des RBP. La liste de ces gènes montre un enrichissement significatif des cibles de ces RBP. Afin de tester l'hypothèse d'une altération de l'épissage alternatif due à une mauvaise localisation cellulaire des RBP, nous avons étudié la localisation cellulaire des RBP dont les cibles sont particulièrement affectées par l'épissage différentiel, par immunofluorescence. Nos résultats n'ont montré aucune délocalisation des RBP testées dans les lignées cellulaires cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 32A).

B. Étude des modifications post-traductionnelles

La délocalisation des RBP est a été associée à des altérations de leurs modifications post-traductionnelles incluant la méthylation et la phosphorylation (Battaglia-Hsu et al. 2018). Nous avons montré précédemment que les RBP impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif des gènes identifiés par l'analyse du RNA-Seq ne sont pas délocalisées dans les lignées cblC et cblG.

L'étude de la méthylation et de la phosphorylation de la RBP TIA1 par co-immunoprécipitation (co-IP) des anticorps diméthyl-arginine et phospho-sérine suivi de l'analyse de l'expression protéique de TIA1 par western blot, semble montrer une hyperméthylation et une hyperphosphorylation de cette protéine par rapport au contrôle (Fig. 32B).

A.



B.

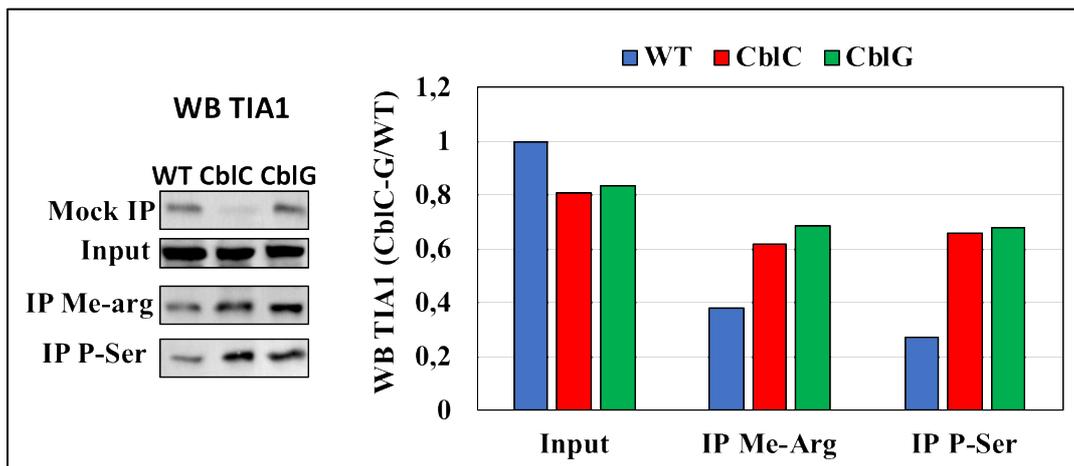


Figure 32 : Marquage cellulaire et modifications post-traductionnelles des RBP

A. La localisation des RBP identifiées par l'analyse rMAPs et significativement enrichies ont été étudiées par immunofluorescence (TIA1, HNRNPK, HNRNPL, SRSF2-SC35, FMRP1 et SRSF7-9G8). Les cellules ont été ensemencées sur des plaques à 12 puits à raison de 50 000

cellules par puits et incubées à 37°C, 5% de CO₂ pendant une nuit. Après fixation, perméabilisation et blocage, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire (dilution 1/250) et 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (dilution 1/1000). Les cellules ont été colorées avec du DAPI (dilution 1/3000) et les images ont été prises par microscopie confocale à l'objectif 60X.

B. Les protéines totales méthylées et phosphorylées ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-méthyle arginine et anti-phosphosérine puis les complexes protéiques ont été analysées par western blot en utilisant l'anticorps anti-TIA1

II. Altération du protéome des fibroblastes cblC et cblG

II.1. Identification des protéines différentiellement exprimées

L'analyse transcriptomique ont permis d'avoir une vue globale des processus biologiques impliqués dans les pathologies cblC et cblG. Nous avons analysé le protéome des fibroblastes de 3 patients cblC, 4 cblG comparés à 3 témoins en utilisant la technologie nano-LC/MSMS Proxeon 1200, Orbitrap Fusion ETD (Institut Jean Monod, collaboration JM Camadro, UMR 7592, Paris Diderot). Nous avons identifié 4870 protéines différentiellement exprimées (DEP) par rapport aux contrôles dont 184 (4%) dans le groupe cblC et 148 (3%) dans le groupe cblG. L'ensemble des protéines significativement exprimées ($p < 0,05$, Fold change de $FC > 1,25$) a été classé par regroupement ou « clusterisation » hiérarchique. L'axe vertical représente les lignées étudiées et l'axe horizontal représente les protéines. La signature d'expression de ces protéines est présentée dans la Figure 33A. Les résultats ont mis en évidence deux clusters ou groupes de DEP dont un cluster rouge caractérisant des protéines surexprimées et 1 cluster vert contenant des protéines sous exprimées dans les groupes cblC et cblG par rapport aux contrôles.

Parmi les DEP, nous comptons respectivement 118 et 96 protéines régulées à la hausse contre 67 et 52 protéines régulées à la baisse dans les groupes cblC et cblG. Le protéome des deux défauts génétiques partagent 35 protéines sur-régulées et 19 protéines sous-régulées (Fig. 33B).

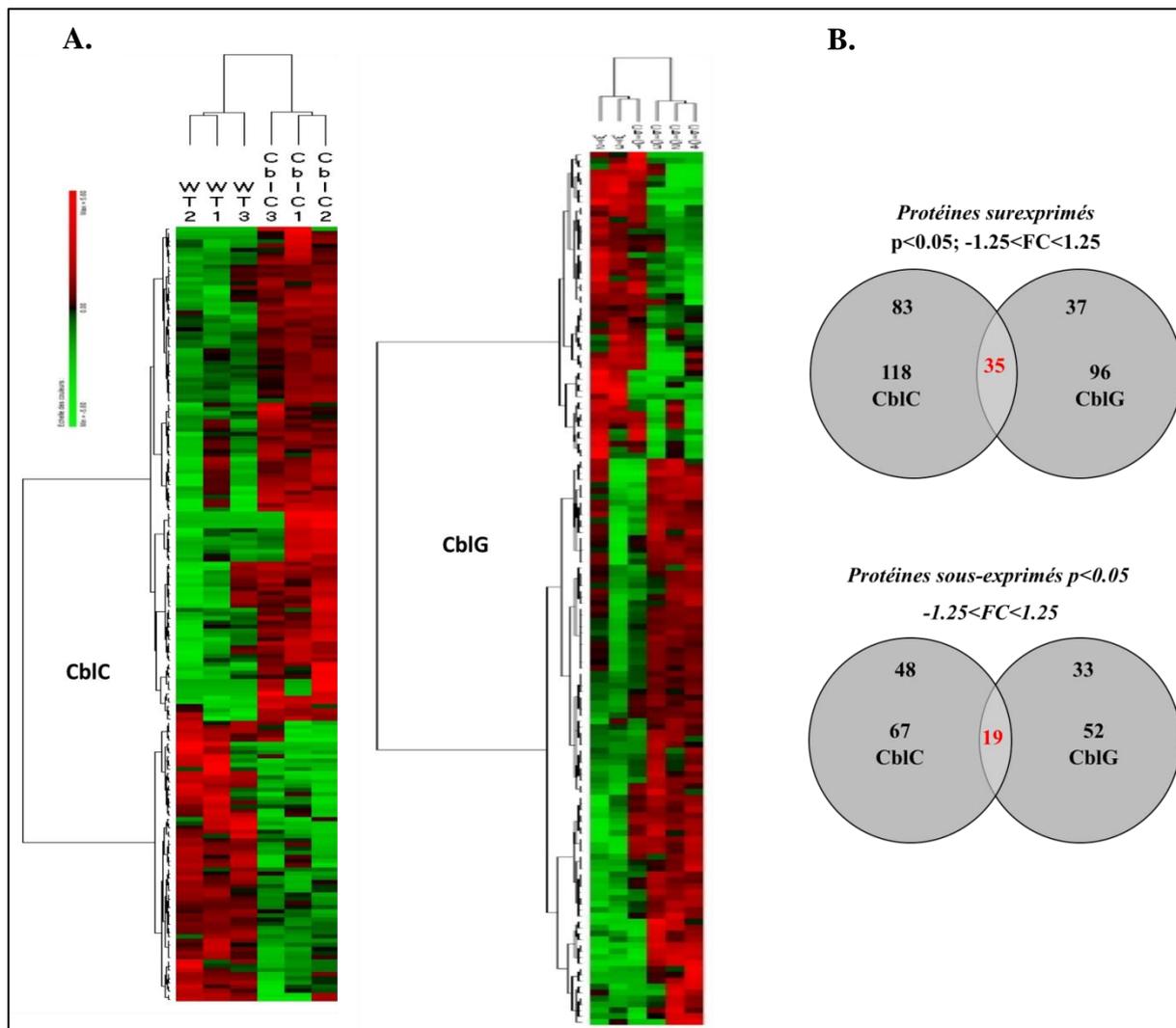


Figure 33 : Identification de protéines exprimées différemment dans les fibroblastes de patients cbIC et cbIG

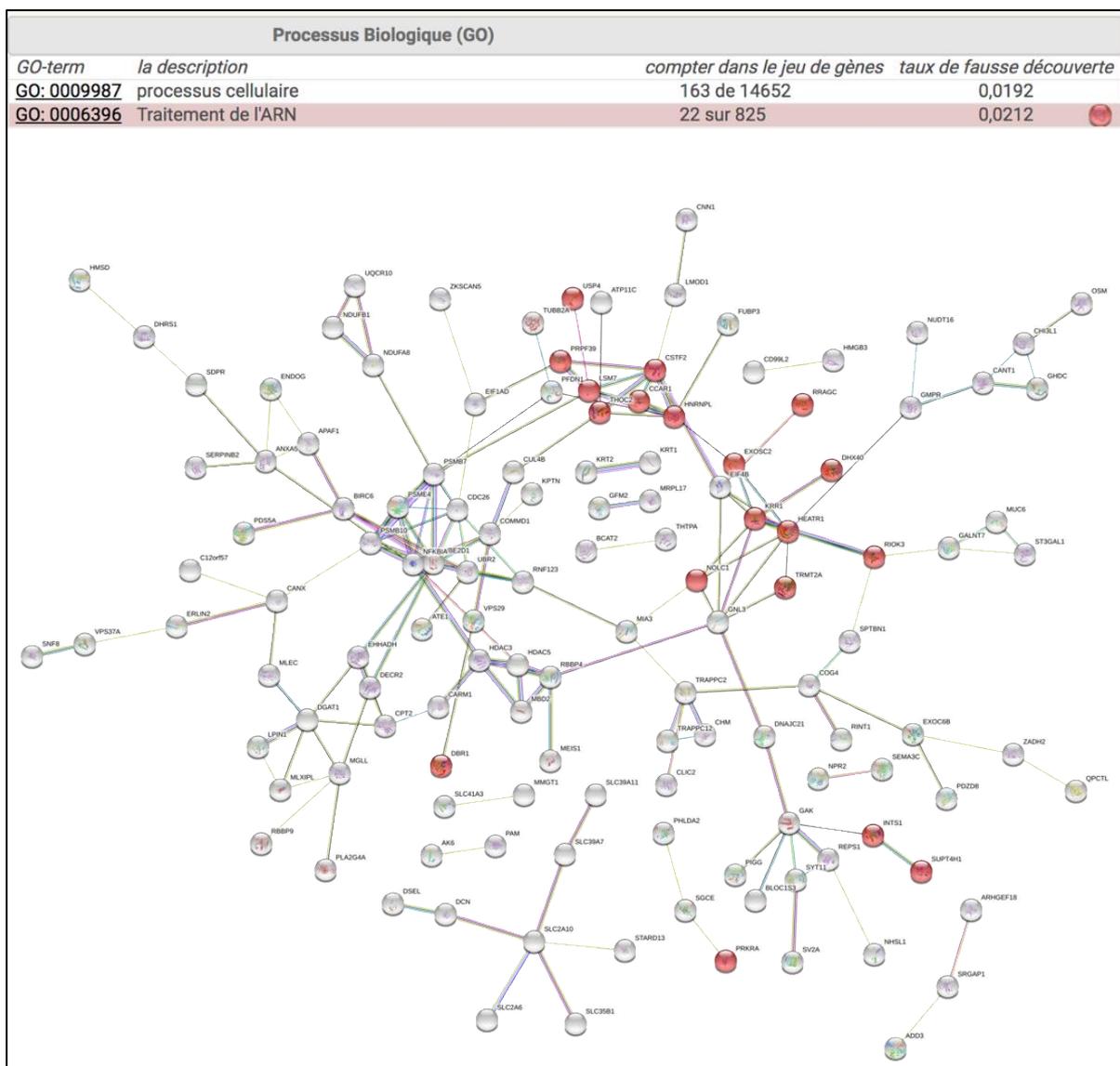
A. Clusterisation hiérarchique des protéines significativement différemment exprimées.

B. Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines différemment exprimées de manière significative ($p < 0,05 ; FC > 1,25$)

II.2. Classification fonctionnelle des DEP et identification des réseaux d'interaction protéine-protéine

L'analyse fonctionnelle des DEP dans la lignée cblC par rapport au contrôle, a montré une implication des DEP dans des processus liés au métabolisme de l'ARN (Fig. 34A) tandis que dans la lignée cblG, les protéines jouent un rôle dans la phosphorylation oxydative et la biogenèse du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Fig. 34B).

A.



B.

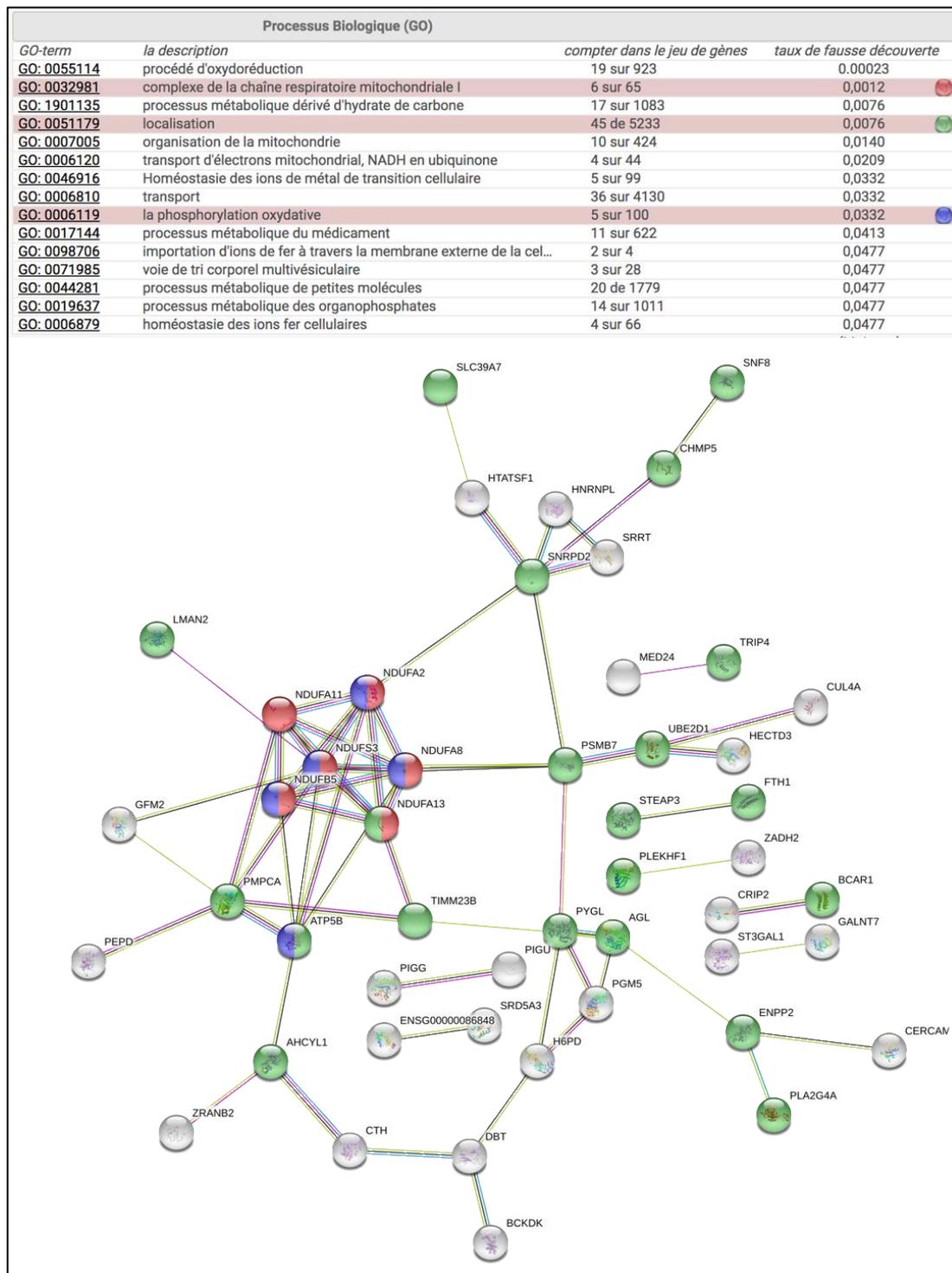


Figure 34 : Processus biologiques impliquant les protéines différemment exprimées et réseaux d'interactions protéine-protéine

Les protéines différemment exprimées de manière significative ($p < 0,05$; $FC > 1,25$). Les paramètres par défauts ont été utilisés et l'analyse a généré les processus biologiques des DEP impliquées dans la lignée *cbIC* (A.) et dans la lignée *cbIG* (B.).

L'analyse des voies KEGG de ces DEP ne montre aucune implication pathologique dans la lignée cblC, mais dans la lignée cblG, les protéines surexprimées et impliquées dans la phosphorylation oxydative et de la biogénèse mitochondriale ont été associées à des maladies métaboliques et neurologiques (Alzheimer, Parkinson, Huntington) (Fig. 35)

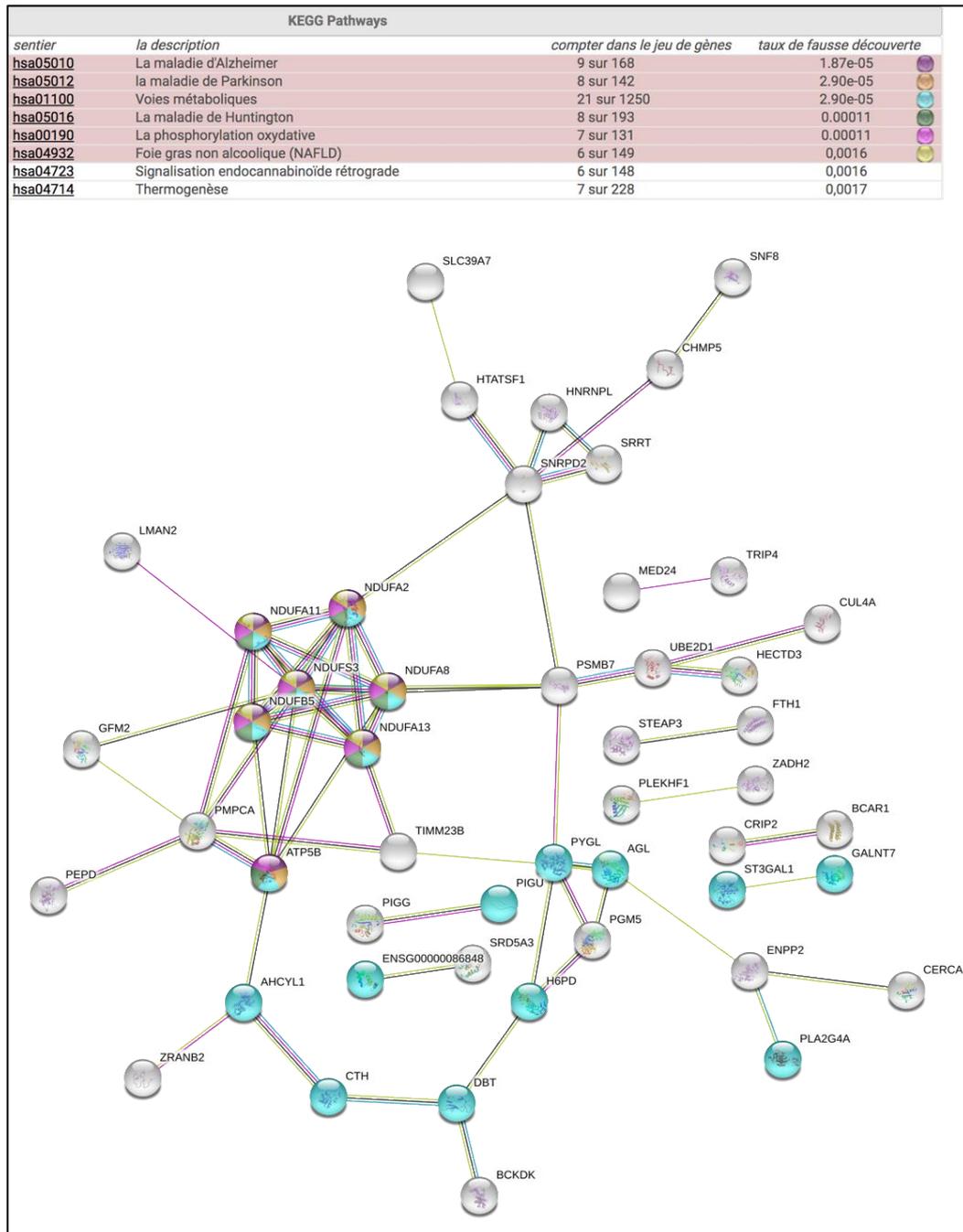


Figure 35 : Analyse des voies KEGG des protéines différentiellement exprimées

Les protéines différentiellement exprimées de manière significative ($p < 0,05$; $FC > 1,25$) ont été analysées en utilisant la base de données STRING qui fournit les associations de ces DEP dans des voies de KEGG

Même si la plupart des RBP identifiées précédemment ne se sont pas révélées délocalisées dans les deux lignées cellulaires. Notre analyse sur le protéome a révélé une altération de l'expression de la RBP HNRNPL dont le niveau d'expression est significativement surexprimé dans les deux lignées cellulaires de patients par rapport au contrôle (Fig. 36A). L'analyse de l'expression protéique de HNRNPL par western blot (Fig. 36B) et immunofluorescence (Fig. 36C) confirment les résultats de l'expression de HNRNPL identifié par l'analyse du protéome.

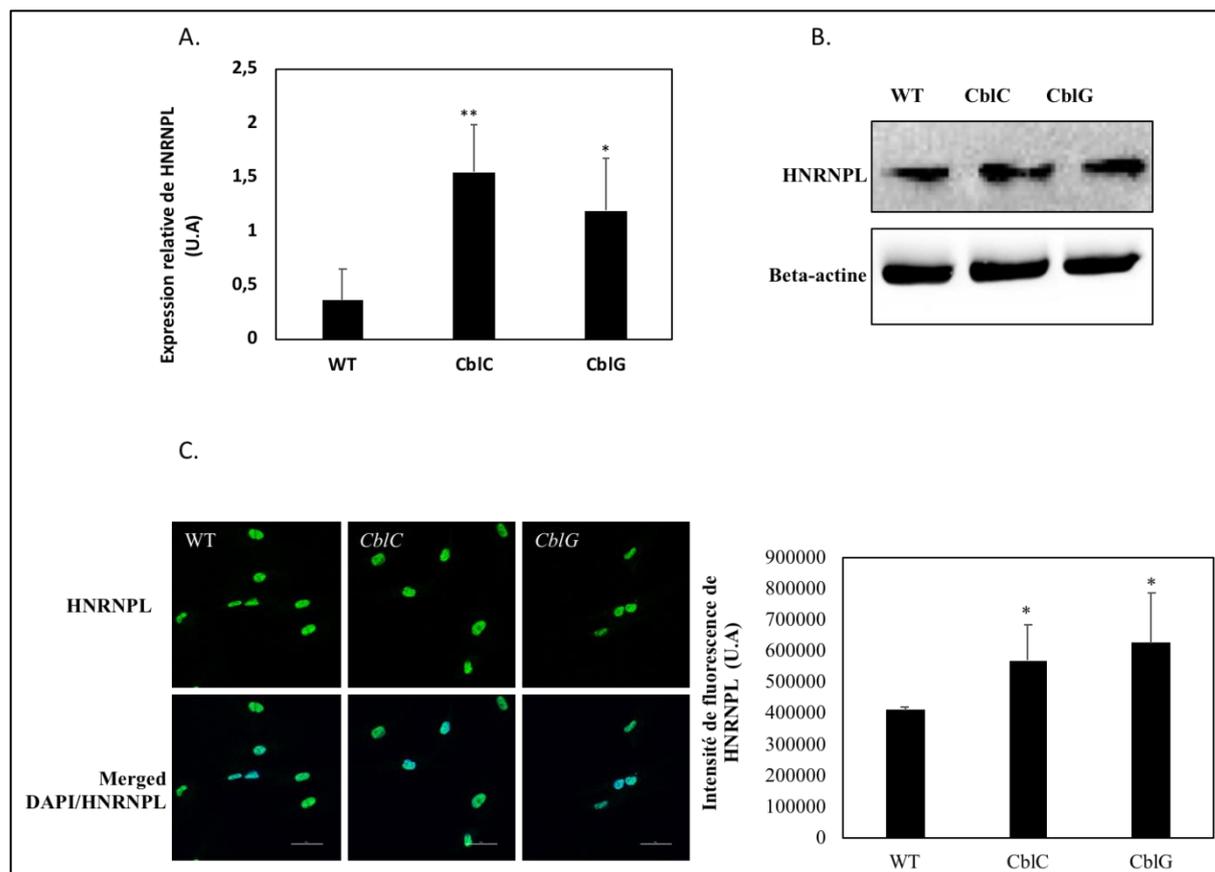


Figure 36 : Expression protéique de HNRNPL

A. Expression relative de HNRNPL dans les lignées de patients par rapport au contrôle ; **B.** Analyse de l'expression par western blot ; **C.** Quantification de l'intensité de fluorescence après immunomarquage et visualisation par microscopie confocale.

II.3. Analyse de l'enrichissement en cibles de HNRNPL et HuR

Nos données précédentes ont mis en évidence le rôle majeur de la RBP HuR dans les modifications transcriptomiques associées à une altération du métabolisme de la cbl (Battaglia-Hsu et al. 2018). De plus, nous avons également montré en utilisant les cellules cblC et cblG que cet effet résultait de sa localisation erronée et non d'un niveau d'expression modifié (Battaglia-Hsu et al. 2018) ; (Ghemrawi et al. 2019). Cependant, nos données soulignent également la contribution de HNRNPL dans les modifications de l'épissage alternatif, alors que sa localisation sous-cellulaire reste inchangée contrairement à une augmentation de son expression. Ainsi, afin d'étudier les contributions de ces deux RBP dans les modifications transcriptomiques et protéomiques associées aux défauts cblC et cblG, nous avons calculé les enrichissements de leurs cibles respectives dans les gènes que nous avons trouvés transcrits différemment et alternativement épissés et exprimés (Tableau 16).

Pour cela, la liste des gènes différentiellement exprimés (DEG) et différentiellement épissés (DSG) ainsi que celle des protéines différentiellement exprimées (DEP) significativement ont été croisées avec la liste des gènes cibles des RBP HNRNPL et HuR d'après la base de données de référence StarBase V3 qui fournit des données CLIP Seq pour l'identification des cibles de RBP. Le croisement des deux listes a permis d'identifier les gènes cibles de HNRNPL et HuR parmi les DEG, DEP et DSG. Par exemple pour la liste des DEG, l'enrichissement des cibles RBP a été calculé comme suit : % observé de cibles (nombre de cibles dans le DEG/total DEG) /% attendu de cibles (nombre total de cibles des RBP/ARNm totaux codant). La p-value a été calculé par un test de khi deux en utilisant le logiciel statistique en ligne BiostaTGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr>).

Des valeurs significatives pour HuR ont été trouvées pour les événements d'épissage alternatif différentiel (cblC : 1,62 (p-value 3,85 10E-11) ; cblG : 1,63 (6,86 10E-23)) et pour l'expression de la protéine (cblC : 1,51 (5,51 10E-4) ; cblG : 1,55 (1,02 10E-3)) pour les deux défauts génétiques. Des valeurs similaires ont été trouvées pour HNRNPL pour l'épissage alternatif (cblC : 1,74 (7,96 10E-2) ; cblG : 1,83 (1 10E-20)) mais pas pour l'expression de la protéine (cblC : 1,22 (0,51) ; cblG : 1,53 (0,17)). Aucun enrichissement significatif pour les deux RBP n'a été trouvé dans les listes des gènes transcrits de manière différentielle dans les deux types de cellules.

Nous avons également remarqué que l'ARNm de *HNRNPL*, ainsi que beaucoup d'autres gènes pertinents et différentiellement exprimés de manière différentielle dans notre étude, sont des

cibles connues de HuR (*DMD, MYH10, PPARG, DUSP4, DAPK1*). La liste des cibles d'ARNm de HuR et de HNRNPL parmi les DEG et DEP se trouve dans l'annexe 5 du manuscrit.

Tableau 16 : Enrichissement en cibles de HNRNPL et HuR dans les gènes transcrits, épissés et exprimés différemment par rapport aux témoins

		Pourcentage des gènes cibles de HuR (%)	Enrichissement	p-value
cblC	DEG	42,53	1,08	5,70E-01
	DEP	59,46	1,51	5,55E-04
	DSG	60,40	1,55	3,85E-11
cblG	DEG	37,16	0,95	7,00E-01
	DEP	60,81	1,55	1,02E-03
	DSG	62,89	1,62	6,94E-18

		Pourcentage des gènes cibles de HNRNPL (%)	Enrichissement	p-value
cblC	DEG	5,17	1,06	8,60E-01
	DEP	5,95	1,22	5,10E-01
	DSG	6,47	1,35	7,96E-02
cblG	DEG	3,83	0,79	5,30E-01
	DEP	7,43	1,53	1,70E-01
	DSG	8,38	1,74	2,30E-05

II.4. Mise en évidence d'un stress cellulaire endogène

Les résultats de l'analyse du protéome de la lignée cblG par rapport au contrôle suggèrent un dysfonctionnement mitochondrial lié à une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative et l'assemblage du complexe I de la chaîne de transport d'électron mitochondrial. Un dysfonctionnement mitochondrial peut refléter un stress cellulaire. Nos travaux précédents ont déjà mis en évidence l'existence d'un stress du RE dépendant des sirtuines dans les fibroblastes de patients cblC et cblG (Ghemrawi et al., 2019). Ce stress induit une modification de la localisation globale et de l'épissage de l'ARNm par l'intermédiaire de la délocalisation subcellulaire de RBP sensibles au stress (ELAVL1 / HuR, HnRNPA1 et RBM10). Afin de mettre en évidence un stress cellulaire impliquant un dysfonctionnement mitochondrial, dans les fibroblastes de patients cblC et cblG, nous avons analysé la fonction mitochondriale en mesurant les paramètres de la respiration mitochondriale

(taux de consommation d'oxygène) au cours du temps. La quantification du taux de consommation d'oxygène a été mesurée en condition basale et en conditions de stress par l'analyseur « Seahorse XFp ». En condition de stress, la fonction de chaque complexe mitochondrial a été évaluée grâce à l'utilisation du kit d'évaluation de stress cellulaire (Seahorse XF Cell Mito stress Kit, Agilent) contenant trois inhibiteurs (Fig. 37) :

- l'oligomycine bloque le complexe V permettant la production d'ATP
- la FCCP est un protonophore permettant une diffusion passive des protons à travers la bicouche lipidique résultant en une diminution du potentiel membranaire de la membrane interne de la mitochondrie. Cette diminution du potentiel membranaire stimule la respiration mitochondriale et permet de mesurer la capacité maximale de respiration
- la roténone et l'antimycine A bloquent respectivement les complexes I et III permettant une fuite importante des protons entraînant une diminution de la respiration mitochondriale.

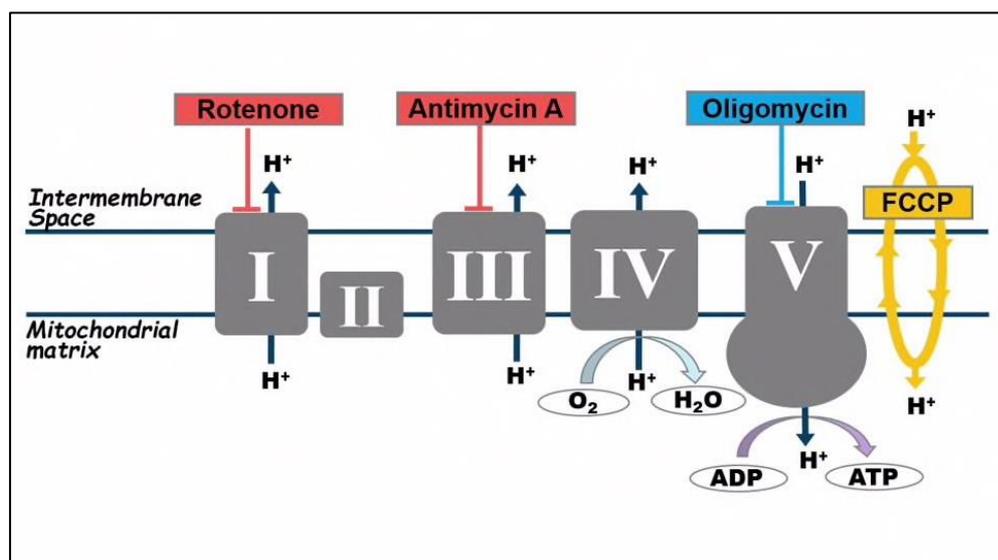


Figure 37 : Mécanismes d'action des molécules agissant sur la chaîne respiratoire mitochondriale

La roténone et l'antimycine sont des inhibiteurs des complexes I et III empêchant la fuite des protons par diminution de la respiration de la mitochondrie ; l'oligomycine est un inhibiteur du complexe V qui bloque la production d'ATP et enfin la FCCP a été utilisée comme protonophore pour faire entrer des protons dans la mitochondrie et accélérer la respiration mitochondriale.

La figure 38A montre le profil d'un test d'évaluation de la respiration mitochondriale au niveau basal et en conditions de stress mitochondrial. Le test présente plusieurs paramètres clés, dont la respiration basale, la respiration liée à la production d'ATP (complexe V) et la capacité de réserve respiratoire (CRR). La mesure de la CRR est souvent utilisée pour évaluer la capacité des cellules à fournir de l'énergie en cas de besoin accru ; elle est calculée en faisant la différence entre la respiration maximale et celle liée à la production d'ATP. Grâce aux inducteurs de stress (inhibiteurs des complexes de la mitochondrie), d'autres paramètres de la fonction mitochondriale peuvent également être calculés, à savoir la fuite de protons et la respiration non mitochondriale.

Par rapport au contrôle, nos résultats montrent une diminution significative du taux de consommation d'oxygène dans les fibroblastes de patients cblC et cblG au cours du temps en condition basale et en condition de stress (Fig. 38B).

En condition de respiration basale, les lignées cblC et cblG semblent consommer moins d'oxygène par rapport aux témoins. Cette diminution semble être associée à une diminution de la production d'ATP ainsi qu'à une diminution significative de la respiration maximale et de la capacité de réserve en oxygène. Ces deux derniers paramètres sont évalués par injection des inducteurs de stress FCCP et Roténone/AntimycineA qui permettent d'évaluer les complexes I et III de la mitochondrie. Ces résultats confirment les données du protéome dans lequel on observe un dysfonctionnement mitochondrial dû à la biogénèse du complexe I et des protéines impliquées dans la chaîne de transport d'électrons.

Nous avons également noté de manière surprenante une diminution de la consommation d'oxygène non mitochondriale (Fig. 38C).

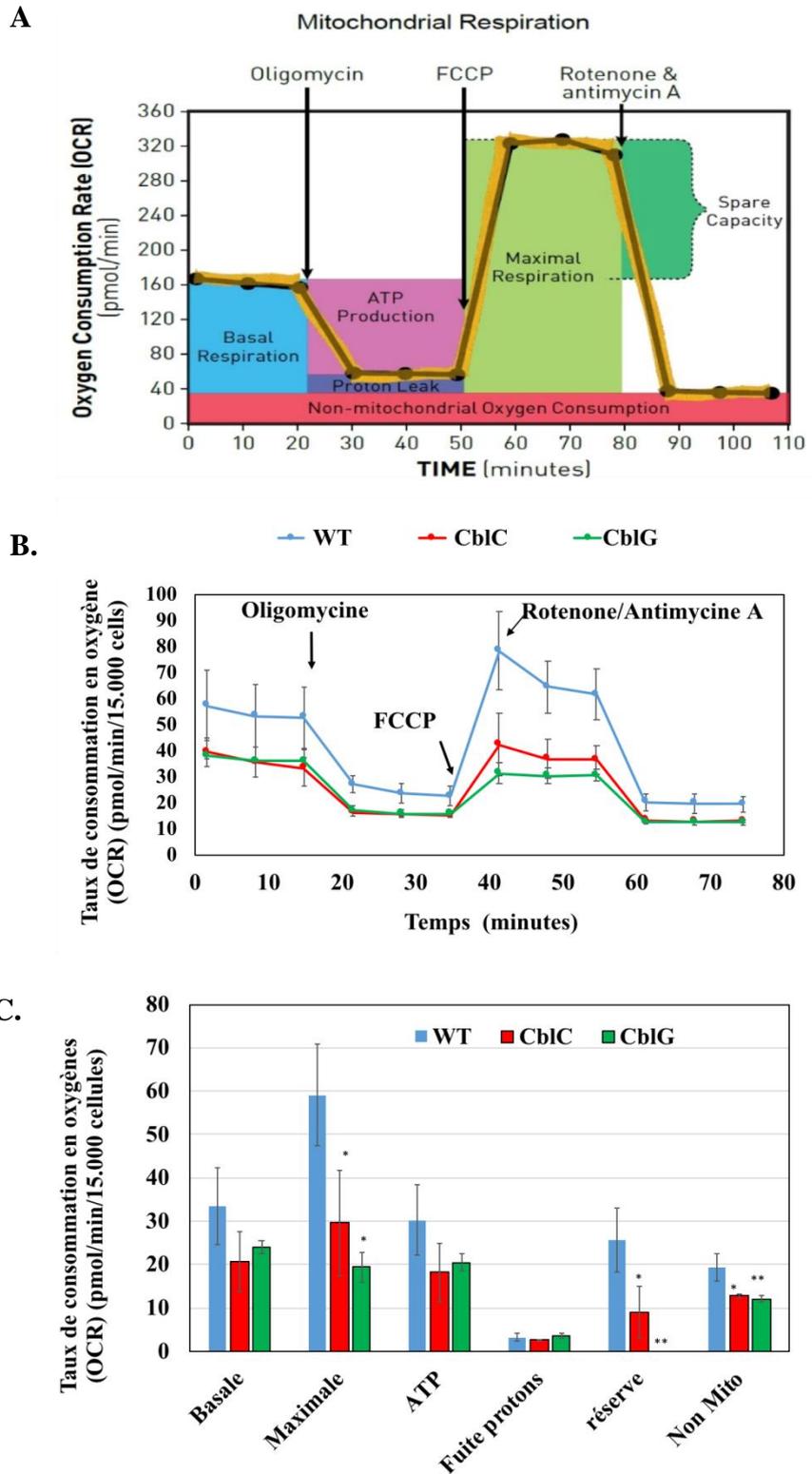


Figure 38 : Respiration mitochondriale des fibroblastes cblC et cblG

A. Profil test de la respiration mitochondriale par utilisation du kit Cell mito stress B. Évaluation de la respiration mitochondriale par mesure du taux de consommation d'oxygène. C. Paramètres clés calculables de la respiration mitochondriale

II.5. Stress oxydatif et mesure des espèces réactives à l'oxygène

Nous avons montré précédemment l'existence d'un stress cellulaire via l'évaluation de la respiration mitochondriale en condition basale et en condition de stress dans les fibroblastes de patients cblC et cblG. Le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est un mécanisme qui peut découler d'une surproduction d'espèces réactives à l'oxygène (ROS). Afin de mettre en évidence un stress cellulaire dû à une surproduction de ROS, nous avons analysé le niveau global de production de ROS cellulaire grâce au dihydroéthidium (DHE). C'est un colorant fluorescent bleu qui traverse la membrane et s'accumule dans la cellule. En présence de ROS, le colorant DHE passe de l'état réduit à l'état oxydé par émission de fluorescence rouge dans le noyau de la cellule représentative du niveau de ROS cellulaire. L'analyse par coloration au DHE semble montrer une augmentation de la production de ROS dans les lignées de patients cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 39).

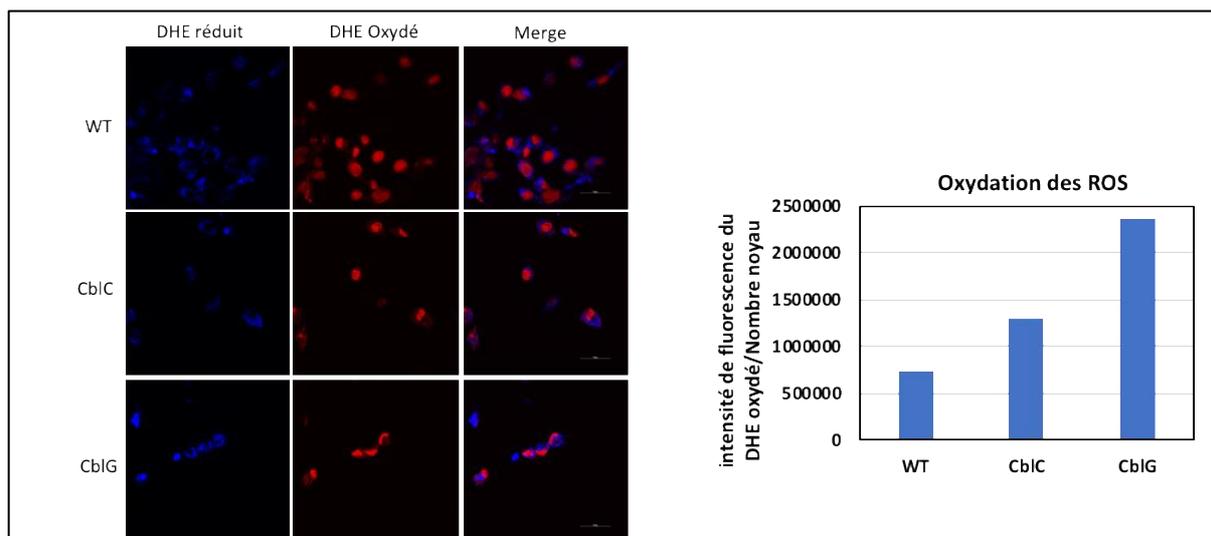


Figure 39 : Mise en évidence des ROS par coloration au DHE

Les cellules ont étéensemencées à raison de 50000 cellules/puits dans une plaque de 12 puits et incubées 24h à 37°C, 5% CO2 pendant 24h. Le milieu de culture a été retiré et une solution de DHE à 5 μ M a été ajoutée et les cellules ont été incubées 30 min à 37°C. L'acquisition des images de fluorescence a été effectuée en utilisant un microscope confocal et des lasers de longueurs d'onde de 402 nm (bleu) et 535 nm (rouge). La quantification de l'intensité de fluorescence a été évaluée par le logiciel Image J

II.6. Stress du réticulum endoplasmique

Dans notre laboratoire, nous avons montré que l'indisponibilité cellulaire de la cbl dans des cellules de neuroblastomes humains, induit un stress du réticulum endoplasmique dû à une diminution de l'expression de la déacétylase SIRT1 (Ghemrawi et al. 2013). Afin de tester cette hypothèse dans nos modèles de fibroblastes cblC et cblG, nous avons étudié l'expression protéique de SIRT1 par western blot. Nos résultats montrent une diminution significative de l'expression protéique de SIRT1 dans certaines lignées cblC et cblG comparées au contrôle (Fig. 48). Nous avons également montré que l'activation pharmacologique de SIRT1 dans ces fibroblastes de patients cblC et cblG pouvait corriger le développement du stress du RE et la délocalisation des RBP associées (Ghemrawi et al. 2019).

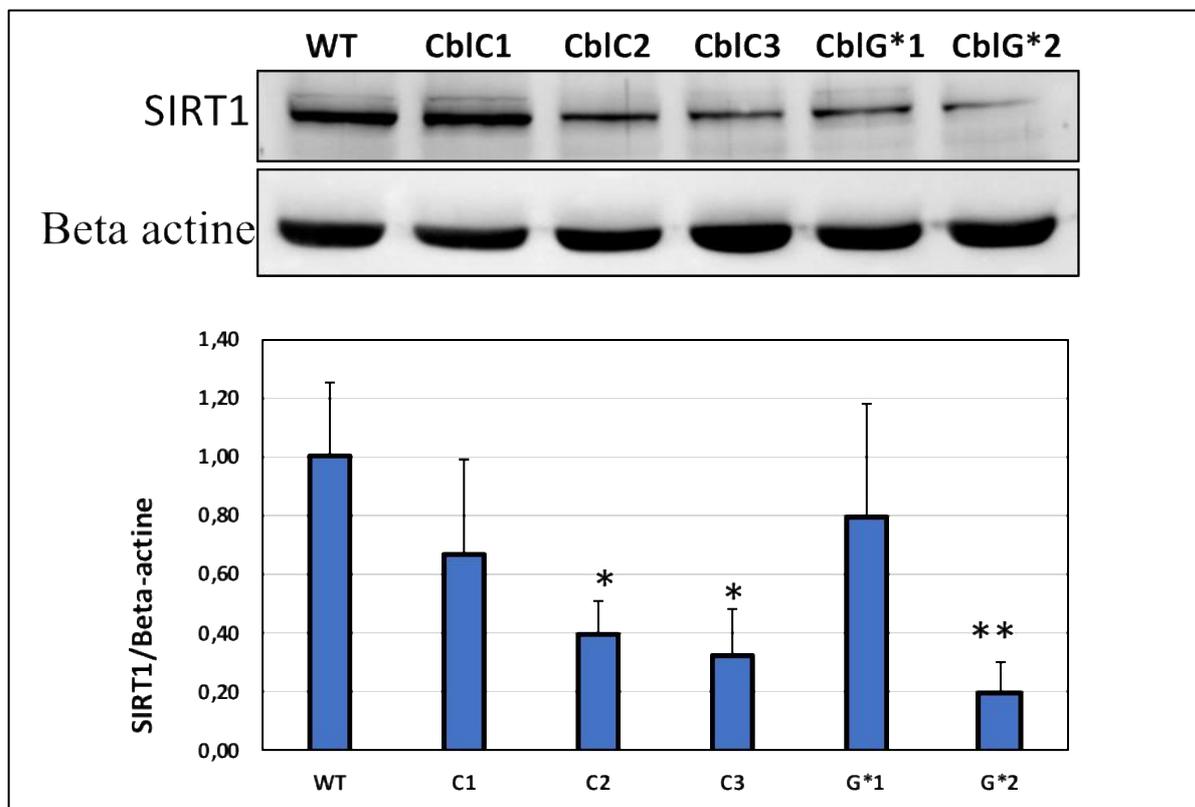


Figure 40 : Expression protéique de SIRT1

L'analyse protéique de l'expression de SIRT1 a été réalisée par western blot et les valeurs représentent la moyenne \pm écartype de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

**Partie 2 : Analyse des mécanismes
épigénomiques incluant la méthylation
de l'ADN, de l'ARN et des histones dans
les fibroblastes de patients cblC et cblG**

I. Altérations de la voie de transméthylation

1.1. Analyse du méthylome

Méthylation globale de l'ADN

Nous avons analysé le méthylome de 3 fibroblastes de patients cblC, 4 cblG et 4 contrôles en utilisant la puce Infinium Human Methylation450k (MiSeq-Illumina). Le méthylome a été réalisé par la plateforme génomique de l'unité U1256 et l'analyse des données brutes par l'équipe de bio-informatique. Les régions différentiellement exprimées (DMR) contenant des sondes CpG méthylées différentiellement ont été analysées avec une valeur seuil (cut-off) sur la FDR à 0,05 et la valeur beta ou « beta-value » inférieure à -0,2 et supérieure à 0,2. Les résultats montrent que les sites CpG des gènes différentiellement méthylés (DMG) de manière significative se trouvent principalement dans le corps des gènes ou « body gene » (58–64%) (Fig. 41A) et dans des régions éloignées des îlots CpG (43–45%) ou « open sea » au niveau du génome entier (Fig. et 41B). Cette différence a été observée dans les deux lignées comparées aux contrôles. Ainsi, il semblerait que la méthylation des sites CpG dans les « body gene » et « open sea » soit altérée significativement.

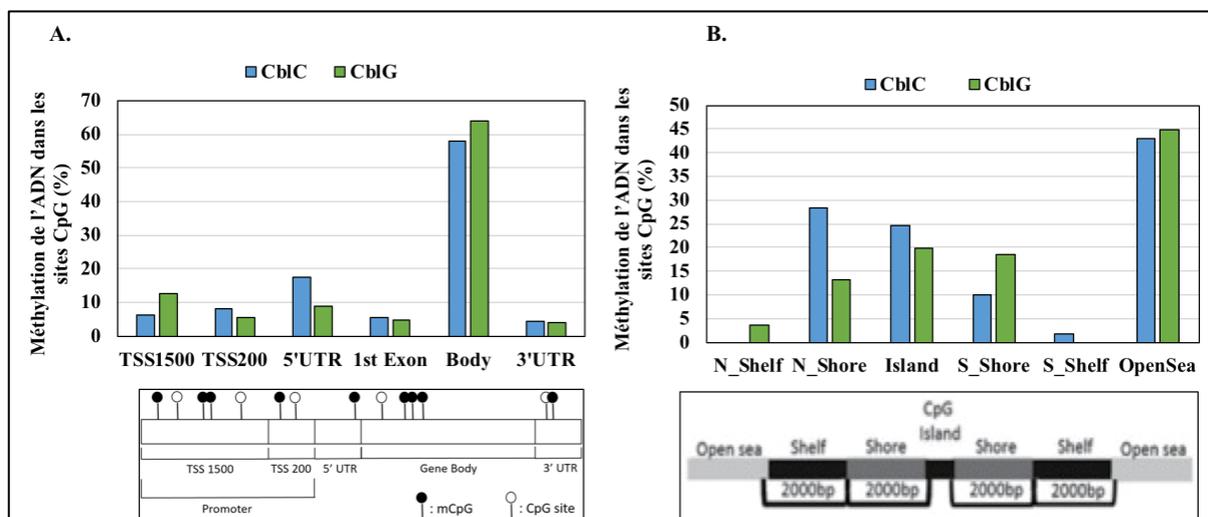


Figure 41 : Méthylation altérée dans les corps des gènes « Body » et les régions isolées des îlots CpG « Island »

La densité des sites CpG méthylés différentiellement a été mesurée dans plusieurs régions des gènes (A) et du génome (B). TSS1500 et TSS200 indique une position des sites CpG à 1500 ou 200 paires de base du site d'initiation de la transcription, (TSS) UTR : région non transcrite en 5' (5'UTR) ou en 3' (3'UTR), 1st exon : premier exon du gène, Body : corps du gène. Au

niveau du génome : « open sea » correspond à des CpG isolés dans le génome, Shore (jusqu'à 2Kb des îlots CpG), shelf (2-4 kb des îlots CpG) et Island correspond aux îlots CpG.

L'analyse du profil de méthylation dans les régions autour des promoteurs des gènes a montré une augmentation de l'hypométhylation globale dans les lignées de patients par rapport aux contrôles (Fig. 42A). L'analyse de la méthylation par région différentiellement exprimée (DMR) a montré que respectivement 52% des DMRS étaient hypométhylés dans les deux lignées cellulaires contre 48% de DMRS hyperméthylés (Fig. 42B). Certaines DMR contiennent des gènes différentiellement méthylés mais non identifiés par la base de données Ensembl. Le nombre de DMG identifiées et significatives (FDR<0,05 ; beta value <-0,2 et > 0,2) est représenté dans le diagramme de Venn ci-dessous (Fig. 42C). L'analyse a montré respectivement 3 et 8 gènes hyperméthylés ainsi que 8 et 2 gènes hypométhylés dans les lignées cblC et cblG par rapport aux contrôles. Les deux lignées partagent en commun un gène hyperméthylé (*TBX3*) comparés au contrôle. La liste de ces DMG a été représentée dans les tableaux 17 pour la lignée cblC et 18 pour la lignée cblG et sont classées en fonction de la valeur beta.

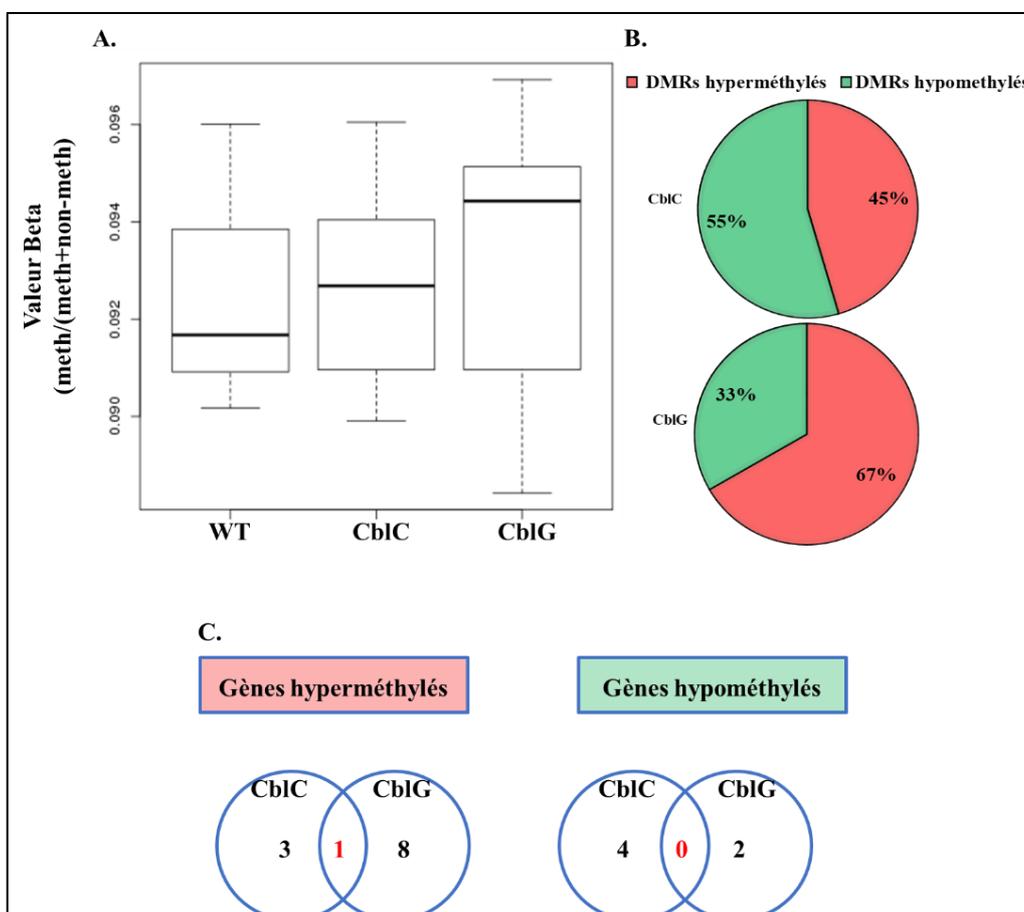


Figure 42 : Méthylation de l'ADN dans les régions promotrices des gènes

A. Profil de méthylation global de l'ADN **B.** Proportion des régions différenciellement méthylées (DMR) autour des régions promotrices du génome dans les lignées *cblC* et *cblG* comparés aux contrôles **C.** Identification des gènes différenciellement méthylés.

Dans la lignée *cblC*, la majorité des gènes hypométhylés (3 gènes sur 7) de manière significative sont des facteurs de transcription régulateurs de l'expression des gènes (Tableau 17) impliqués dans le neurodéveloppement et le fonctionnement du cerveau (*PITX1*, *FGF20*, *LHX8*) tandis que les gènes hyperméthylés (2 gènes sur 3) sont impliqués dans des fonctions liées au développement d'organe (*HOXA2*, *TBX3*).

Tableau 17 : Liste des gènes différenciellement méthylés dans la lignée *cblC*

Gène	DMR	Moyenne beta-Fold change	FDR	Fonctions
<i>HOXA2</i>	DMR5	0,34	8,12E-24	répresseur transcriptionnel (développement, formation de la structure des membres)
<i>TBX3</i>	DMR8	0,26	2,72E-128	répresseur transcriptionnel (développement de l'axe antérieur / postérieur du membre antérieur)
<i>VTRNA2-1</i>	DMR10	0,24	6,08E-70	micro-ARN (régulation de la croissance cellulaire)
<i>PITX1</i>	DMR1	-0,45	6,69E-18	facteur de transcription (développement du cerveau et du faciès)
<i>PAX8-AS1</i>	DMR7	-0,32	2,25E-23	ARN non codant
<i>FGF20</i>	DMR9	-0,26	1,43E-17	facteur de croissance (développement et fonctionnement du système nerveux central; maladie de parkinson)
<i>LHX8</i>	DMR11	-0,21	4,32E-17	facteur de transcription (morphogenèse dentaire, différenciation de certains neurones et cellules mésenchymateuses)

Le gène *TBX3* est également retrouvé hyperméthylé significativement dans la lignée cblG comparé au contrôle (Tableau 18) ainsi que d'autres gènes ayant des fonctions dans le développement (*HOXB4*, *HOXA13*, *SATB2*, *NR2F2*) et le neurodéveloppement (*SATB*, *PAX6*, *NAV1*); les gènes hypométhylés significativement dans la lignée cblG sont associées à des pathologies du développement des muscles cardiaque et squelettiques (*ID1*).

Tableau 18 : Liste des gènes différentiellement méthylés dans la lignée cblG

Gène	DMR	Moyenne beta-Fold	FDR change	Fonctions
<i>HOXB4</i>	DMR2	0,41	3,05E-31	facteur de transcription (développement)
<i>HOXA13</i>	DMR3	0,36	6,86E-25	facteur de transcription (développement)
<i>SATB2</i>	DMR5	0,34	1,76E-21	régulateur de la transcription et du remodelage de la chromatine (fente palatine isolée et déficit cognitive)
<i>PAX6</i>	DMR6	0,33	7,16E-14	Facteur de transcription (développement des yeux, du nez, du système nerveux central et du pancréas)
<i>TBX3</i>	DMR9	0,27	3,7E-138	répresseur transcriptionnel (développement de l'axe antérieur / postérieur du membre antérieur)
<i>VTRNA2-1</i>	DMR10	0,25	8,5E-115	micro-ARN (régulation de la croissance cellulaire)
<i>NR2F2</i>	DMR11	0,25	9,09E-15	facteur de transcription (régulation de nombreux gènes différents)
<i>NAV1</i>	DMR15	0,22	2,34E-41	migration neuronale (développement et la régénération des neurones).
<i>ADAMTS18</i>	DMR14	-0,23	4,12E-16	peut réguler l'équilibre hémostatique (atrophie myorique du choriorétinien)
<i>ID1</i>	DMR16	-0,22	2,76E-16	Inhibiteur de liaison à l'ADN (Inhibe la différenciation des muscles squelettiques et des myocytes cardiaques)

- **Analyse intégrative sans a priori du méthylome et du RNA-Seq**

L'expression et la méthylation de 3 fibroblastes de patients cblC et 4 cblG ont été obtenues en utilisant respectivement le RNA-Seq et la puce Human Methylation 450k. La principale fonction de la méthylation de l'ADN est la régulation de l'expression des gènes. Le résultat le plus fréquent est une corrélation négative entre l'expression et la méthylation.

Pour déterminer si les changements de méthylation de l'ADN associés aux régions promotrices affectent l'expression des gènes, nous avons effectué une analyse intégrative sans a priori des gènes montrant une méthylation modifiée dans les régions promotrices avec les DEG chez les mêmes patients cblC et cblG en appliquant un seuil sur la $FDR < 0,05$ et une valeur Beta $\pm 0,2$. L'analyse du croisement des listes des DEG et des DMR significatifs n'a révélé aucun gène commun entre les deux techniques.

- **Analyse ciblée du méthylome sur les 271 loci différentiellement exprimés dans les fibroblastes cblC et cblG vs 62 contrôles de fibroblastes externes**

Compte-tenu du profil global de méthylation des groupes cblC et cblG, nous avons comparé le profil de méthylation des 8 échantillons cblC/cblG avec celui de 62 contrôles (Quintana et al. 2017) en utilisant un t-test avec ajustement aux tests multiples par les corrections de Bonferroni et de Benjamini-Hochberg (également appelée, false discovery rate). Afin d'optimiser la puissance de l'analyse, compte-tenu du faible effectif dans le groupe cblC/cblG, nous avons ciblé un set de 271 loci différentiellement exprimés dans l'analyse du transcriptome, ce qui correspond à 4062 sondes CpG. Compte-tenu du profil de co-méthylation des sondes CpG, nous avons optimisé le ratio signal/bruit de fond en utilisant une méthode de « smoothing » tel que rapporté précédemment (Guéant et al. 2018).

La comparaison des profils de méthylation des ADN de fibroblastes cblC ou cblG avec celui des contrôles montre une signature de méthylation dans l'îlot CpG :174 du gène *PITX1* (Fig. 43A). A l'échelle du génome, cette signature est située au niveau du chromosome 5 (Fig. 43B). L'îlot CpG :174 englobe le dernier exon (exon 3) et la région 3'UTR du gène *PITX1*. Cet îlot contient 5 sondes CpG (cg22827250, cg04223420, cg07274716, cg00396667, cg12673103) ayant un profil hémi-méthylé dans le groupe cblC/cblG (ligne rouge) et un profil non-méthylé dans le groupe contrôle (ligne bleu) (Fig. 43C). L'évaluation à l'échelle de chaque patient des 5 sondes CpG montre un profil complètement méthylé chez 3 patients cblG sur 4 et un profil complètement non méthylé chez la totalité des patients cblC.

PITX1 est un gène bien documenté dans la littérature ayant des fonctions dans l'embryogenèse, le développement de la symétrie droite/gauche. Un lien potentiel entre ce gène, le stress induit par l'hypoxie et le déficit en cbl a été montré notamment dans les pathologies de neurodéveloppement et de développement rétinien (Mudie et al. 2015) ; (Madrid et al. 2018).

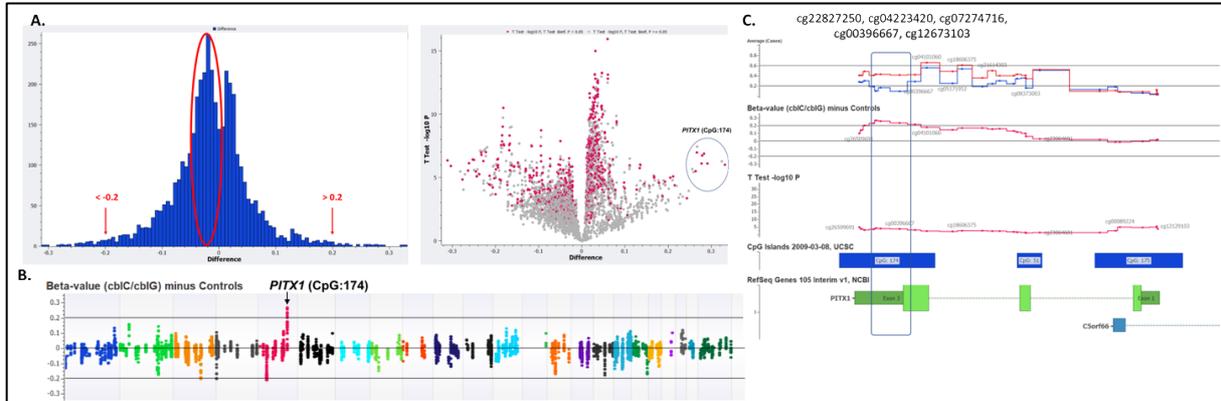


Figure 43 : Comparaison du profil de méthylome des fibroblastes cblC et cblG vs 62 contrôles

A. Violin plot des différences de beta value en fonction du log10 de la p-value. B. Différence de méthylation à l'échelle du génome. C. Identification des sondes CpG méthylées de PITX1

I.2. Analyse de la méthylation des histones

Les modifications des histones incluant la méthylation interviennent en parallèle avec la méthylation de l'ADN. Ces modifications sont responsables de la régulation de l'état condensé ou non de la chromatine permettant l'accès des facteurs de transcription régulateurs de l'expression de nombreux gènes. Afin de déterminer si les modifications H3K4me2 et H3K36me3 jouent un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les pathologies cblC et cblG, nous avons extrait les histones des culots cellulaires puis nous les avons analysées en western blot en utilisant les anticorps anti-histone 3 diméthylée sur la lysine 4 (H3K4Me2) et l'histone 3 tri-méthylée sur la lysine 36 (H3K36me3) dont les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'histone 3 total (H3). Les résultats semblent montrer une diminution de la di-méthylation H3K4 et aucune variation de H3K36 chez les deux groupes de patients comparés aux contrôles (Fig. 44)

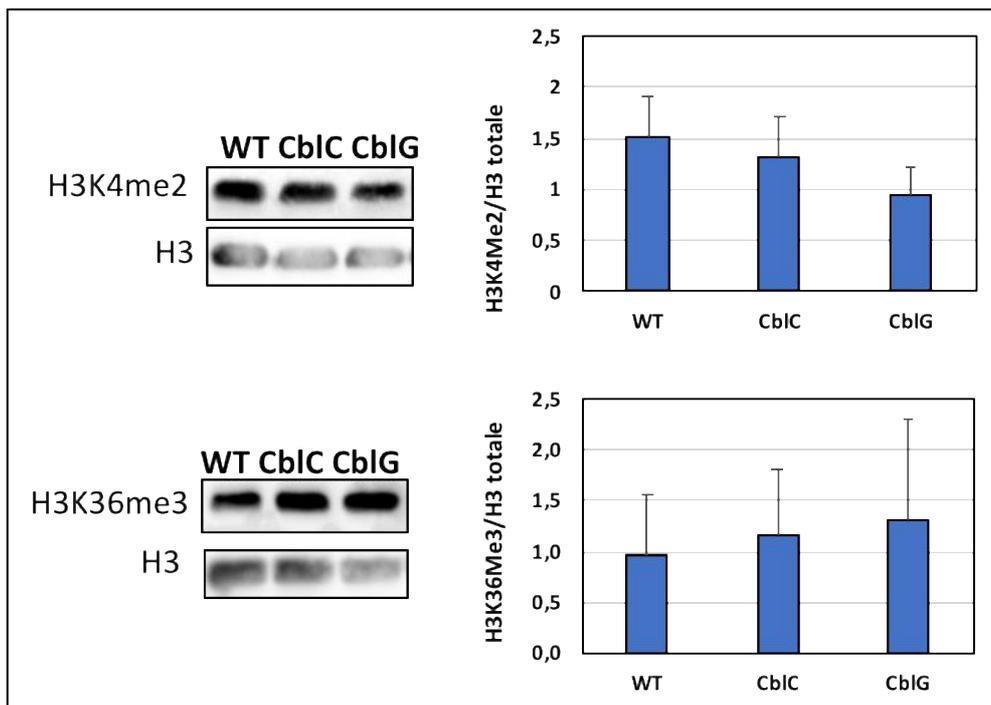


Figure 44 : Analyse de la méthylation des histones

Les histones ont été extraites des culots cellulaires puis dosées avec le kit BCA Assay. Les histones ont été analysées en WB par utilisation des anticorps anti-H3K4me2 et anti-H3K36me3. Après révélation, les membranes ont été incubées avec un tampon de déshybridation douce pour décrocher les anticorps précédemment utilisés. Ensuite les membranes ont été incubées avec l'anticorps anti-H3 total. L'intensité des bandes a été analysée en utilisant le logiciel ImageJ. Les valeurs représentent la moyenne +/- écartype de 3 expériences indépendantes.

I.3. Analyse de la méthylation de l'ARN m6A ou « épitranscriptome »

Afin d'étudier d'éventuelles altérations de l'épitranscriptome, nous avons mesuré le niveau de méthylation des ARN m6A dans 3 fibroblastes de patients cblC, 4 cblG et 3 contrôles en utilisant le kit EpiQuik™ de dosage colorimétrique de la quantité d'ARN m6A (Epigentek). L'analyse n'a montré aucune variation du taux de méthylation des ARN m6A dans les fibroblastes de patients cblC et cblG (Fig. 45).

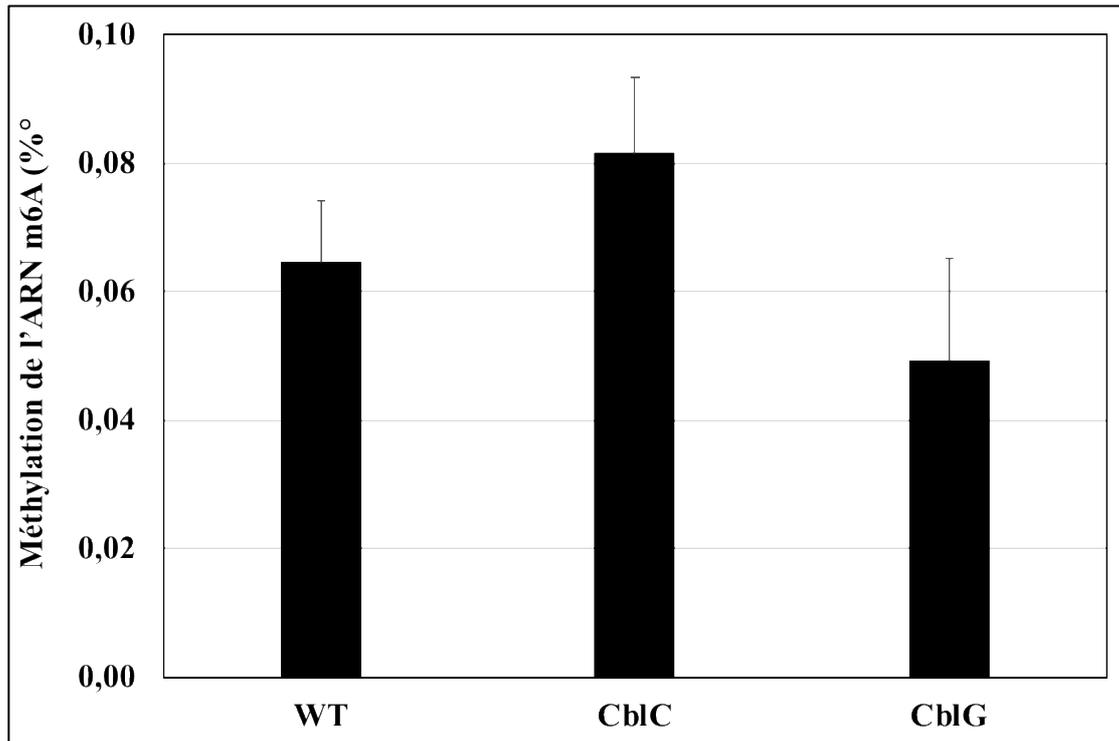


Figure 45 : Profil global de méthylation de l'ARN m6A

L'ARN total est fixé dans les puits à l'aide d'une solution qui permet de retenir l'ARN. La méthylation de l'ARN en position 6 de l'adénosine ou N6-méthyladénosine(m6A) est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique de liaison aux m6A et d'un anticorps de détection. La solution de dosage devient bleue en présence de m6A. Le signal détecté est quantifié en lisant l'absorbance dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. La quantité de m6A est proportionnelle à l'intensité de la densité optique mesurée. Une courbe standard a été utilisée pour quantifier la quantité absolue de m6A et de déterminer les états relatifs de méthylation de l'ARN m6A des deux échantillons d'ARN des patients comparés aux contrôles. Les résultats représentent la moyenne +/- écartype de 3 réplicats biologiques.

Nous avons également entrepris une étude de la méthylation 2'-O-Me des ARN ribosomiques qui n'a pas mis en évidence de différence significative par rapport aux contrôles.

Partie 3 : Validation des hypothèses mécanistiques en lien avec les pathologies neuronales dans les modèles de neurones transdifférenciés

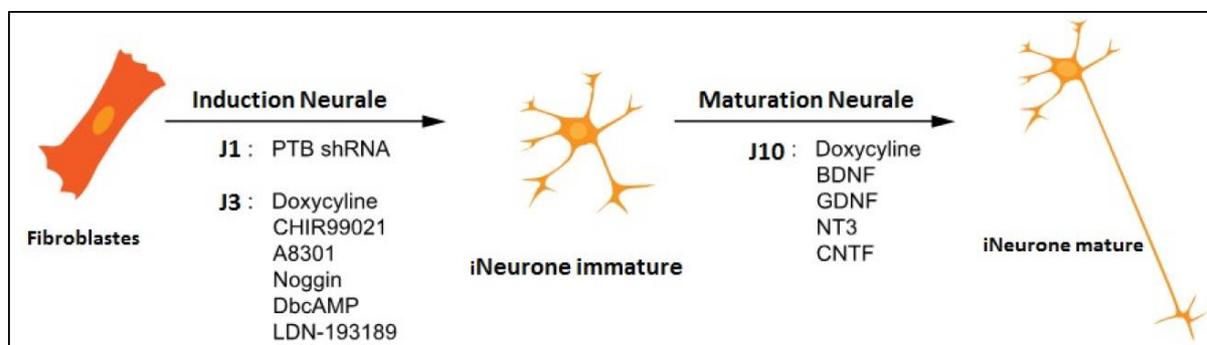
I. Validation des altérations moléculaires dans les modèles neuronaux cblC et cblG transdifférenciés

I.1. Neurones transdifférenciés

Afin de pouvoir valider les résultats obtenus par l'étude des fibroblastes sur un modèle cellulaire plus adapté aux pathologies neurologiques, nous avons utilisé une méthode de transdifférenciation directe des fibroblastes de patients cblC et cblG en « neurones ».

Principe de la transdifférenciation

La différenciation des fibroblastes en « neurones » se fait directement sans passer par l'étape de cellule pluripotente induite (iPS). La technique utilisée a été initialement publiée par Xue et son équipe (Xue et al. 2013) puis réadaptée par Schaffer et son équipe (Schaffer et al. 2014). La technique de base consiste à transfecter directement les fibroblastes de patients avec des particules lentivirales (SHCLNV, sigma) contenant un plasmide pLKO.1 (NM_002819 / TRCN0000231420 / 10^6 TU / 1.0 ml / pLKO.1) qui code pour un « Short hairpin RNA » (shRNA) dirigé contre le gène Polypyrimidine tract-binding protein 1 (*PTBP1*) (Xue et al. 2013). *PTBP1* est un facteur de transcription exprimé de manière basale dans toutes les cellules ; néanmoins, il existe aussi une forme spécifiquement neuronale (*nPTBP1*). L'expression de ces formes étant exclusive, l'inhibition de l'expression de *PTBP1* provoque l'expression de la forme *nPTBP1* favorisant la différenciation en neurones. La sélection des cellules transfectées par utilisation d'antibiotique qui élimine tous les fibroblastes n'ayant pas intégré le gène de résistance à la puromycine ainsi que l'ajout de facteurs neurotrophiques (BDNF, GDNF, NT3 et CNTF) conduit à la maturation des neurones (Fig. 46).



(Schaffer et al. 2014)

Figure 46 : Transdifférenciation des fibroblastes en neurones

Les fibroblastes sont cultivés jusqu'à 80% de confluence avant infection par les particules lentivirales durant 24h supplémentaires. Il s'ensuit une sélection avec de la puromycine à 2

µg/mL pendant 48h et les premiers neurones apparaissent au bout de 5 jours. L'ajout des facteurs neurotrophiques va permettre la maturation des « i-neurones »

I.2. Etude de la morphologie et caractérisation des « i-neurones »

Les cellules transdifférenciées (TD) cblC/cblG possèdent une morphologie différente de celle des cellules transdifférenciées issues de fibroblastes contrôle (Fig. 47A). Les contrôles TD présentent un nombre plus important de ramifications. Le nombre moyen de dendrites par neurone est d'environ 6 dans la lignée contrôle. Ce nombre est significativement diminué dans les lignées cblC et cblG par rapport au contrôle (Fig. 47B). La taille des prolongements incluant l'axone et les dendrites est également significativement diminuée dans les deux groupes de neurones issus de cellules de patients comparés au contrôle (Fig. 47C).

Afin de caractériser les neurones transdifférenciés, nous avons réalisé un marquage immunofluorescent avec des anticorps spécifiques des neurones dont NEUN qui marque les neurones matures, MAP2 pour les microtubules, SYN1 pour les synapses et TUJ1 pour la tubuline (Fig. 47D). L'analyse des images montrent un marquage positif pour les marqueurs utilisés.

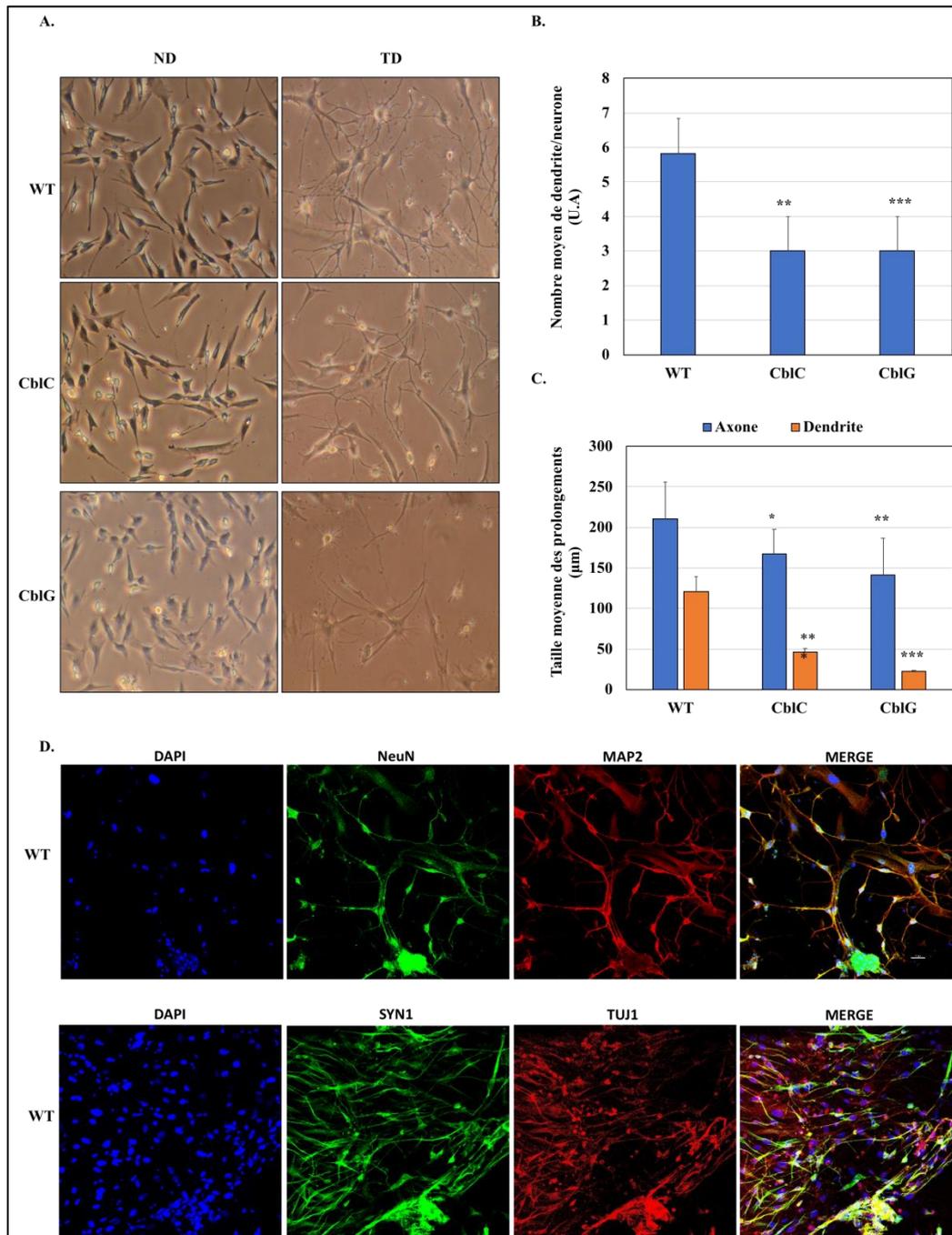


Figure 47 : Neurones transdifférenciés

ND : cellules non différenciées ; TD : Cellules transdifférenciées

A. Morphologie des cellules ND et TD visualisées par microscopie optique (objectif x4) B. Mesure de la taille des prolongements des neurones transdifférenciés ; l'analyse a été effectuée avec le logiciel ImageJ qui fournit une valeur en intensité de pixel. Cette valeur est ensuite convertie en micromètres en se basant sur les dimensions d'une cellule de Thomas (4 carreaux=200 µm) C. Marquage par immunofluorescence des cellules avec des anticorps spécifiques des neurones et observation par microscopie confocale (objectif X60).

I.3. Validation de l'expression de MYH1 et étude du cytosquelette des neurones transdifférenciés

Nous avons analysé l'expression des protéines MYH1 et de l'actine filamenteuse ou F-actine dans les modèles expérimentaux neuronaux par immunofluorescence. Les résultats préliminaires ne semblent pas montrer de différence d'expression de MYH1 et de la F-actine dans les cellules cblC et cblG TD par rapport au contrôle TD. Cette étude est préliminaire et nécessite des expériences complémentaires (Fig. 48).

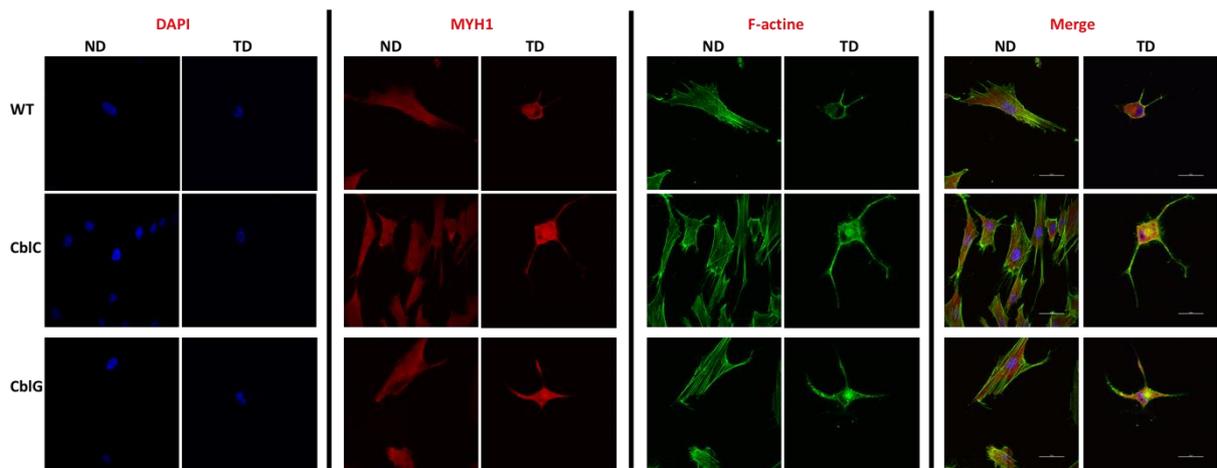


Figure 48 : Validation de l'expression de MYH1 dans les neurones transdifférenciés et étude du cytosquelette d'actine

Les cellules non différenciées (ND) et transdifférenciées (TD) ont été étudiées par immunofluorescence en utilisant l'anticorps MYH1 et la phalloïdine pour marquer la F-actine. Les images ont été obtenues après visualisation au microscope confocal.

Discussion

Contexte

Les erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la cbl conduisent à un défaut de synthèse ou d'utilisation de l'Adocbl responsable d'une acidurie méthylmalonique isolée, un défaut de synthèse ou d'utilisation de la Mecbl conduisant à une homocystinurie isolée ou à un défaut de synthèse de ces deux co-facteurs responsables d'une acidurie méthylmalonique combinée à une homocystinurie. Une des conséquences principales des troubles affectant la voie de synthèse de la Mecbl est une altération de la voie de re-méthylation de l'homocystéine associée à une réduction de l'activité de la méthionine synthase. De nombreuses études expérimentales ont illustré l'importance de cette voie de re-méthylation pour le maintien du taux de SAM cellulaire en montrant qu'une carence en cbl influence directement la concentration en SAM ou en SAH et conduit à la diminution du rapport SAM/SAH (Blaise et al. 2007) ; (Daval et al. 2009).

Les fibroblastes de patients présentant les défauts génétiques cblC et cblG utilisés dans cette étude, présentent par rapport au contrôle une réduction significative de l'activité de la méthionine synthase, du taux cellulaire en SAM et du ratio SAM/SAH. Pris dans leur ensemble, ces résultats confirment que les fibroblastes de patients cblC et cblG utilisées ici présentent les mêmes caractéristiques biochimiques observées généralement chez les patients cblC et cblG. Ces résultats justifient également le choix de ces cellules dans notre étude visant à évaluer les potentiels effets d'une altération de la méthylation sur l'expression des gènes.

Chez l'homme, les manifestations cliniques associées à un dysfonctionnement du métabolisme de la vitamine B12 sont d'une nature et d'une sévérité variables et incluent des troubles ophtalmologiques (atrophie optique, rétinite pigmentaire, cécité), neurologiques (paresthésies, ataxie, convulsions, myélopathie, microcéphalie), neurocomportementaux (défauts cognitifs, hallucinations, démence, psychoses), neuromusculaires (hypotonie, léthargie, spasticité musculaire, troubles de la marche), hépatiques (stéatose hépatique) et cardiaques (cardiomyopathie, malformations cardiaques) (Lerner-Ellis et al. 2006b) ; (Stabler, 2013) ; (Huemer and Baumgartner 2018) ; (Murray and Jadavji undefined/ed). Ce large spectre de pathologies suggère que différents processus cellulaires pourraient être affectés par des différences d'expression de nombreux gènes.

Un nombre limité d'études sur les modifications de l'expression des gènes dans des cellules de patients présentant des anomalies génétiques du métabolisme intracellulaire de la cobalamine, a été effectué. Il a été montré que des fibroblastes de patients présentant des mutations du gène *HCFC1* ou du gène *THAP11* (défaut *cblX*) partagent certaines similitudes dans leur transcriptome avec un groupe de 46 gènes exprimés de manière différentielle par rapport aux témoins (Quintana et al. 2017). Des modifications de l'expression des protéines dans des cellules de patients présentant le défaut *cblD-MMA* ont également été rapportées dans une analyse des mitochondries, ce qui a conduit à l'identification de protéines principalement impliquées dans l'apoptose, le stress oxydatif et le métabolisme cellulaire (Richard et al. 2007). Deux autres études portant sur les cellules *cblC* ont identifié des modifications de l'expression de protéines principalement liées à l'organisation du cytosquelette, à la signalisation du système nerveux, au métabolisme énergétique et à la détoxification cellulaire (Caterino et al. 2015) ; (Hannibal et al. 2011).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces différences d'expression ne sont pas clairement établis. C'est pourquoi, notre étude vise à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces pathologies provenant des erreurs innées du métabolisme intracellulaire de la *cbl* en nous focalisant sur l'étude du transcriptome, du méthylome et du protéome de fibroblastes de patients *cblC* et *cblG*.

Objectifs

L'analyse du transcriptome complet des fibroblastes *cblC* et *cblG* visait deux objectifs principaux. Premièrement, nous avons voulu caractériser l'expression des gènes perturbés par ces défauts génétiques et susceptibles de contribuer aux mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des symptômes cliniques. Deuxièmement, nous voulions déterminer si la diminution de l'index de méthylation SAM/SAH était associée à une modification de la méthylation de l'ADN qui pourrait expliquer les modifications transcriptomiques. Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons analysé le transcriptome, le méthylome et le protéome de fibroblastes de 4 patients *cblG* porteurs de mutations différentes du gène *MTR* et de 3 patients *cblC* présentant des mutations du gène *MMACHC*.

Résultats : gènes différentiellement transcrits

Nos résultats ont révélé des changements transcriptomiques importants dans les fibroblastes de patients cblC et cblG affectant les processus de développement des muscles, des os et du système nerveux, en accord avec les manifestations de l'apparition précoce de la maladie (Fischer et al. 2014) ; (Huemer et al. 2014a). Parmi les gènes les plus différentiellement exprimés (DEG), plusieurs d'entre eux codent pour des facteurs de transcription, ce qui déclenche très probablement des cascades de dérégulation. En effet, nous avons constaté une diminution très importante de l'expression des facteurs de transcription *ISL2* et *FOXE1* avec un facteur de variation (FC) dans les cellules cblC atteignant 58 et 128 et dans les cellules cblG 30 et 145, respectivement.

Fait intéressant, l'analyse fonctionnelle des DEG a également mis en évidence un enrichissement significatif des gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette, confirmant une analyse protéomique antérieure de cellules cblC (Hannibal et al. 2011). De plus, nos résultats indiquent que parmi les gènes exprimés de manière différentielle, beaucoup d'entre eux codent des protéines cytosquelettiques directement associées à des troubles cardiaques et neurologiques. De nombreuses études indiquent que les conséquences des anomalies du cytosquelette contribuent au développement de pathologies neurologiques et cardiaques. Des résultats du laboratoire ont d'ailleurs précédemment montré dans un modèle cellulaire de déficit en folate que la désorganisation du cytosquelette pouvait entraîner une altération du transport vésiculaire et des fonctions synaptiques (Akchiche et al. 2012). Il a également été démontré que des modifications du cytosquelette pouvaient affecter la mobilité cellulaire et le guidage axonal chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (Prudencio et al. 2015) ; (D'Erchia et al. 2017).

Notre étude sur le séquençage de l'ARNm montre également des DEG potentiellement impliqués dans des pathologies cardiaques proches de celles présentées par les patients cblC et de cblG. Le gène *MYH10* est fortement régulé négativement dans les cellules cblC et cblG avec un FC proche de 6 dans les deux types de lignées. Des mutations du gène *MYH10*, qui code pour une myosine non musculaire, ont été associées à des anomalies du développement du cerveau et du cœur (Ridge et al. 2017). De plus, des mutations de *MYH10* ont également été associées chez des souris, à des anomalies cardiaques graves, notamment une anomalie du septum ventriculaire (Ma and Adelstein 2014). La protéine codée par *PDLIM3* ou *ALP*, deux

gènes sous-régulés dans les cellules cblC et cblG avec un FC atteignant respectivement -19 et -69, est supposée être impliquée dans l'assemblage du cytosquelette et joue un rôle important dans les muscles cardiaques de la souris. En effet, les souris déficientes en *PDLIM3* entraînent une dilatation de la chambre ventriculaire droite et un dysfonctionnement suggérant un rôle dans l'apparition de la cardiomyopathie (Pashmforoush et al. 2001). Le gène *TLL1* code pour une métalloprotéase cruciale pour le développement du cœur des mammifères et est régulé négativement dans les deux types de cellules (FC cblC -19 ; FC cblG -68.6) (Clark et al. 1999). Le rôle de ce gène a été confirmé par l'identification de mutations délétères de *TLL1* chez quatre patients non apparentés présentant un défaut septal auriculaire (Stańczak et al. 2009). La *DMD* est un autre gène important fortement sous-exprimé dans les cellules cblC. Il code pour la dystrophine, une protéine qui relie le cytosquelette d'actine filamenteuse à la matrice extracellulaire. Le rôle de cette protéine étant de stabiliser la membrane plasmique, un déficit fonctionnel en dystrophine entraîne une faiblesse musculaire progressive conduisant à une perte de déambulation, à des complications respiratoires et à une insuffisance cardiaque. En effet, la cardiomyopathie dilatée est considérée comme une cause majeure de décès chez les patients présentant des mutations de *DMD* (Kamdar and Garry 2016). Les mécanismes moléculaires précis responsables des dommages cellulaires provoqués par un déficit fonctionnel de la dystrophine sont encore mal compris. Cependant, les principales hypothèses suggèrent un mécanisme direct, une dérégulation des voies du calcium et une augmentation du stress oxydatif (Allen et al. 2016). Outre les structures de la F-actine, le complexe protéique de la dystrophine est également associé aux microtubules et aux filaments intermédiaires et le rôle du cytosquelette dans l'insuffisance cardiaque est bien documenté (Hein et al. 2000).

Plusieurs gènes régulés positivement dans les cellules cblC et cblG sont également associés à des troubles cardiaques. La surexpression de *DUSP4*, qui code une protéine phosphatase à double spécificité pouvant inactiver les MAP kinases, a été observée dans les cas de cardiomyopathie dilatée (Communal et al. 2002). De plus, la surexpression cardiaque spécifique de *DUSP4* est suffisante pour provoquer une cardiomyopathie chez les souris transgéniques (Choi et al. 2012). *PPARG* est un autre gène régulé positivement dans les fibroblastes cblC et cblG. Il code pour le récepteur-gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ), un facteur de transcription activé par un ligand qui régule l'accumulation de triglycérides dans les tissus. Sa surexpression chez la souris a été associée à une cardiomyopathie dilatée (Son et al. 2007). L'expression de PPAR γ est réprimée par SIRT1 (Picard et al. 2004). Nous avons trouvé une régulation à la hausse de PPAR γ et une diminution

significative de l'expression protéique de SIRT1 parallèlement à une diminution de l'expression de PPAR α et de SIRT1 chez les rats exposés à la programmation fœtale de la carence en vitamine B12 et en folate (Garcia et al. 2011) ; (Ghemrawi et al. 2019). Ainsi, la régulation à la hausse de *PPARG* rapportée dans les cellules de nos patients pourrait être la conséquence de la diminution de l'expression de SIRT1 associée à un métabolisme altéré de la cbl (Guéant et al. 2013) ; (Ghemrawi et al.2019).

L'analyse du transcriptome par RNA-Seq a également permis d'identifier des DEG potentiellement impliqués dans les troubles neurologiques présentés par les patients cblC et cblG. *EPHA5* est un gène fortement régulé à la fois dans les cellules cblC et cblG (FC cblC : 211 ; FC cblG : 13) et s'est révélé crucial pour la synaptogenèse au cours du développement de l'hippocampe. Cette protéine codée par gène est un membre des récepteurs de l'éphrine qui participent à diverses fonctions cellulaires telles que le développement des cellules immunitaires et la migration des cellules neuronales, notamment le guidage axonal des cellules ganglionnaires de la rétine (Murai and Pasquale 2004). *ISL2* (FC cblC : 58 ; FC cblG : 30) est un autre gène fortement régulé à la baisse chez les patients, et a été associé à des problèmes neurologiques et visuels. Il code pour un facteur de transcription important pour les motoneurons de la moelle épinière embryonnaire et pour le développement des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Thaler and Benartzi 2004) ; (Pak et al. 2004).

Certains des gènes régulés positivement présents dans les fibroblastes cblC et cblG pourraient également contribuer au développement de troubles neurologiques. En effet, nous avons mesuré une surexpression de *LYNX1* (FC cblC : 10.9 ; FC cblG : 8.4), un gène codant pour une protéine membranaire connue pour moduler la fonction des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, qui contribuent à une multitude de fonctions dont l'apprentissage et la mémoire. Fait intéressant, l'expression accrue de *LYNX1* altère la plasticité dans le cortex visuel primaire des souris, tandis que son absence améliore les capacités d'apprentissage et de mémoire (Miwa et al. 2006) ; (Morishita et al. 2010). Nous avons également identifié une régulation à la hausse de *DAPK1* (FC cblC : 10.5 ; FC cblG : 14.6) qui code pour une kinase Ser/Thr qui joue un rôle important dans le développement neuronal. *DAPK1* contribue à la pathogenèse de nombreuses maladies neurologiques telles que l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. En effet, une surexpression de *DAPK1* a été observée dans l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et est suffisante pour provoquer des anomalies locomotrices

et la mort de neurones dopaminergiques dans un modèle murin de la maladie de Parkinson (You et al. 2017) ; (Su et al. 2019).

Résultats : gènes différenciellement épissés

Il est bien connu que les perturbations du métabolisme de l'ARN, y compris les altérations de l'épissage alternatif, sont associées à de nombreuses pathologies, telles que les maladies neurologiques, la cardiomyopathie dilatée, la rétinite pigmentaire et de nombreux types de cancer (Scotti and Swanson 2016). Ainsi, en plus d'étudier les modifications quantitatives du transcriptome des cellules cblC et cblG, notre objectif était également d'identifier les modifications potentielles de l'épissage alternatif. Nos résultats révèlent que le nombre de gènes épissés différenciellement (719 dans le groupe cblC et 1007 dans le groupe cblG) est beaucoup plus élevé que le nombre de gènes exprimés de manière différentielle (174 gènes dans le groupe cblC et 183 dans le groupe cblG ; FDR <0,05 ; FC >1,5). L'analyse de ces gènes épissés différenciellement a révélé un enrichissement significatif en fonctions liées à la réponse cellulaire au stress, à l'organisation du cytosquelette et à la régulation de l'expression des gènes par méthylation. Nous avons confirmé l'altération de l'épissage alternatif par RT-PCR de *MBD5*, qui code pour une protéine de la famille du domaine de liaison au méthyl-CpG (MBD), qui comprend également le gène *MECP2*, associé au syndrome de Rett. Des altérations de *MBD5* ont été associées à des encéphalopathies épileptiques, à une déficience intellectuelle et à un trouble du spectre autistique (Carvill et al. 2013) ; (Talkowski et al. 2011). Une étude réalisée sur un modèle murin du syndrome de Rett a révélé que la perte de fonction de *MECP2* était associée non seulement à des aberrations généralisées dans l'expression des gènes, mais également à des schémas anormaux d'épissage alternatif après stimulation neuronale (Osenberg et al. 2018).

Nous avons récemment démontré en utilisant des fibroblastes de patients cblC et cblG que ces défauts génétiques sont associés à une mauvaise localisation globale de l'ARNm et à une localisation subcellulaire anormale des protéines de liaison à l'ARN HuR, HnRNPA1 et SRSF1 (Battaglia-Hsu et al. 2018); (Ghemrawi et al. 2019). Notre analyse des motifs d'ARN particulièrement concernés par les modifications d'épissage suggère que d'autres RBP jouent également un rôle important dans l'épissage aberrant détecté dans les fibroblastes cblC et cblG : PCBP2 et SRSF7 dans les cellules cblC, ; HNRNPL, KHDRBS1, MSI1, RBM5, SRSF10 et SRSF3 dans les cellules cblG et ELAV1/HuR, FMR1, HNRNPC, HNRNPK, IGF2BP2,

IGF2BP3, LIN28A, PTBP1, RBM37, SRSF1, SRSF9, TARDBP et TIA1 dans les deux types cellulaires. Même si la plupart de ces RBP ne se sont pas révélées délocalisées dans les deux lignées cellulaires, nos données indiquent cependant, une surexpression de HNRPNL dans les fibroblastes cblC et cblG. Nous avons également remarqué que l'ARNm de *HNRNPL*, ainsi que de beaucoup d'autres gènes différentiellement exprimés dans notre étude et pertinents pour l'analyse des pathomécanismes, sont des cibles de HuR (*DMD*, *MYH10*, *PPARG*, *DUSP4*, *DAPK1*). Ainsi, nos résultats suggèrent que des changements dans l'expression de HNRNPL pourraient résulter d'une localisation subcellulaire de HuR anormale et confirment nos études antérieures sur le rôle crucial de HuR dans les conséquences d'un dysfonctionnement du métabolisme de la cobalamine (Battaglia-Hsu et al. 2018); (Ghemrawi et al. 2019).

Résultats : méthylation de l'ADN

Une des conséquences d'un déficit en cbl est une diminution de l'index de méthylation SAM/SAH qui pourrait affecter de nombreux mécanismes épigénomiques incluant la méthylation de l'ADN, des histones, de l'ARN et des co-régulateurs de l'expression des gènes (Anderson et al. 2012). De nombreuses études réalisées chez l'homme et chez l'animal ont montré que la carence en cbl et une diminution de l'activité de MS sont associées à une hypométhylation de l'ADN (Kulkarni et al. 2011) ; (Quinlivan et al. 2013) ; (Brunaud et al. 2003) ; (Brunaud et al. 2005) . L'hypométhylation de l'ADN peut induire une répression transcriptionnelle par inhibition des facteurs de transcription. De plus, les changements anormaux de la méthylation de l'ADN ont été associés à plusieurs maladies telles que des maladies auto-immunes et des troubles métaboliques et physiologiques (Jin and Liu 2018). Les maladies neurologiques constituent d'autres types de maladies pour lesquelles la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le développement.

Notre analyse de la méthylation de l'ADN a montré une hypométhylation globale dans les lignées de patients par rapport aux contrôles. L'analyse ciblée des régions différentiellement méthylées (DMR) montrent que la majorité des gènes hypométhylés codent pour des facteurs de transcription régulateurs de l'expression de gènes impliqués dans le neurodéveloppement et le fonctionnement du cerveau (*PITX1*, *FGF20*, *LHX8*) tandis que les gènes hyperméthylés sont impliqués dans des fonctions liées au développement d'organe (*HOXA2*, *TBX3*) dans les lignées cblC par rapport au contrôle. Les mêmes fonctions sont altérées dans la lignée cblG qui partage

le gène *TBX3* avec la lignée cblC. *TBX3* est hyperméthylé dans les lignées cellulaires et est un répresseur transcriptionnel de gènes du développement musculaire. D'autres gènes hyperméthylés sont impliqués dans le développement (*HOXB4*, *HOXA13*, *SATB2*, *NR2F2*) et dans le neurodéveloppement (*SATB*, *PAX6*, *NAV1*).

Fait intéressant, deux des gènes hyperméthylés (*TBX3* et *NR2F2*) dans la lignée cblC et cblG ont été documentés dans la littérature comme étant des super-amplificateurs responsables de la sur-expression de gènes liés au développement (Baribault et al. 2018). En effet, en plus de l'hypométhylation globale associée à des activateurs de la transcription, la méthylation de l'ADN dans certaines sous-régions de ces activateurs peut en réalité faciliter la fonction amplificateur de la transcription (Charlet et al. 2016). Les gènes hypométhylés significativement dans la lignée cblG sont associées à des pathologies du développement des muscles cardiaques et squelettiques (*ID1*). Le croisement de la liste des DEG et de celle des DMR, issu de l'analyse intégrative sans a priori du méthylome et du transcriptome n'a révélé aucun gène en commun.

L'analyse du méthylome des fibroblastes de patients comparés à 62 fibroblastes contrôles a identifié une signature d'expression de méthylation différentielle du gène *PITX1* dans les lignées cblC et cblG par rapport aux contrôles. Les groupes de patients présentent une hémiméthylation de l'îlots CpG : 174 dans la région 3'UTR du gène. L'hyperméthylation de *PITX1* a été associée à une diminution significative du niveau d'expression de l'ARNm. *PITX1* est un gène bien documenté dans la littérature ayant des fonctions dans l'embryogenèse et le développement de la symétrie droite/gauche. Il a été montré un lien potentiel entre ce gène, le stress induit par l'hypoxie et le déficit en cbl notamment dans les pathologies liées au neurodéveloppement et au développement rétinien (Mudie et al. 2015) ; (Madrid et al. 2018). Bien que l'analyse du méthylome par ces deux approches ne produise pas les mêmes résultats, nos données montrent que les défauts génétiques cblC et cblG sont associés à une altération de la méthylation de certains gènes liés au développement d'organes et au neurodéveloppement, qui pourraient être en lien avec la présentation très précoce des patients. Par contre, et contrairement à nos hypothèses initiales, nos résultats ne montrent pas une corrélation claire entre un défaut de méthylation de l'ADN et les gènes différentiellement exprimés. C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés à la méthylation des histones et de l'ARN.

Résultats : méthylation des histones

Les modifications des histones, incluant la méthylation, interviennent en parallèle avec la méthylation de l'ADN. Ces modifications sont responsables de la régulation de l'état condensé ou non de la chromatine permettant l'accès des facteurs de transcription régulateurs de l'expression de nombreux gènes. Un lien direct a été établi entre le métabolisme des monocarbones et la méthylation des histones (Serefidou et al. 2019) et serait directement lié au statut métabolique de la cellule (Sharma and Rando 2017). La méthylation de l'histone 3 (H3) sur la lysine 4 (K4), K36 ou K79 est généralement associée à la chromatine active, tandis que la méthylation sur K9, K27 et l'histone 4 (H4) K20 est fréquemment associée à la chromatine réprimée. Il a été rapporté que la méthylation de H3K9me3 diminuait l'expression de MATII α et cette diminution entraîne également une diminution globale de H3K4me3 pouvant entraîner une perte générale de l'activité transcriptionnelle (Kera et al. 2013). L'altération des marques de méthylation des histones H3K36, H3K4, H3K9, H3K27 a été associée à des maladies neurodégénératives, notamment la diminution de la méthylation marque H3K4 a été associée à des défauts cognitifs (Collins et al., 2019) impliquant aussi la maladie d'Huntington (Zsindely and Bodai 2018). Nos résultats indiquent que l'analyse de la méthylation des marques histones H3K4me2 semble être diminuée et la marque H3K36me3 ne présente pas de variation chez les deux groupes de patients comparés aux contrôles. Cette première étude de la méthylation des histones reste encore très préliminaire et d'autres investigations seraient nécessaires pour étudier de façon systématique d'éventuelles modifications des histones dans les pathologies cblC et cblG.

Résultats : méthylation de l'ARN

La signification biologique de la modification de l'ARN reste largement inconnue dans les troubles métaboliques, mais de nombreuses preuves suggèrent que la régulation dynamique des modifications de l'ARN pourrait avoir de profondes répercussions sur l'épissage, la traduction, la maturation des microARN non codants (miRNA) et les interactions avec les protéines de liaison à l'ARN (RBP). Les ARN sont sujets à des modifications du statut de méthylation, de la structure chimique et de la localisation cellulaire, ce qui pourrait affecter l'affinité pour les RBP et ainsi modifier les complexes ARN-RBP (Wang and He 2014). La méthylation m6A joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes impliquées dans les processus

cellulaires fondamentaux et diverses fonctions physiologiques dont le métabolisme. Plusieurs études ont mis en évidence le lien entre le métabolisme lié à la nutrition et les modifications m6A (Wu et al. 2019). En effet, les ARN méthylases utilisent la SAM comme donneur de groupe méthyle et il a récemment été signalé que le niveau de MAT2A est régulé par la modification de m6A lors de l'épuisement de la méthionine dans le milieu de culture cellulaire, favorisant la rétention d'un intron lors de l'épissage (Zhou et al. 2015) ; (Pendleton et al. 2017). Dans une autre étude, il a également été rapporté chez un modèle de rat supplémenté en bétaïne que le niveau de SAM était restauré dans le foie, résultant en une augmentation du niveau de m6A. Cela suggère qu'un défaut de synthèse de la SAM pourrait induire une réduction du niveau de méthylation m6A et que la carence en B12 pourrait avoir un impact direct ou indirect sur la méthylation de l'ARN m6A (Mosca et al., 2019) . Une perturbation des activités des méthylases conduit à une expression perturbée de milliers de gènes notamment du développement impliquant le rôle régulateur de m6A dans le métabolisme de l'ARN (Niu et al. 2013). L'analyse de la méthylation m6A de l'ARN des fibroblastes de patients cblC et cblG n'a montré aucune variation significative par rapport aux contrôles. Nous avons également entrepris une étude de la méthylation 2'-O-Me des ARN ribosomiques qui n'a pas mis en évidence de différence significative par rapport aux contrôles.

Résultats : respiration mitochondriale

L'analyse du protéome des fibroblastes cblG a révélé une augmentation significative de l'expression des protéines impliqués dans la biogénèse mitochondriale du complexe I et la phosphorylation oxydative était particulièrement affectée par ces défauts génétiques. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la respiration mitochondriale de ces cellules. Nos résultats ont montré une réduction significative des paramètres de la respiration mitochondriale par rapport au contrôle, ceci en condition basale et lorsque les cellules sont soumises à des inducteurs de stress. Ces résultats montrent que les fibroblastes utilisés dans cette étude présentent un dysfonctionnement mitochondrial qui reflète un stress cellulaire.

Les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 peuvent conduire à une augmentation du stress oxydatif par différents mécanismes. Une réduction de l'activité de la méthionine synthase ou de la méthionine synthase réductase a été associée à une augmentation du stress oxydatif et notamment à une surproduction de ROS intracellulaire, favorisant la mort cellulaire par apoptose (Richard et al. 2007) ; (Richard et al. 2009) (Richard et al. 2013). Les déficits en donneurs de méthyle sont également responsables du développement d'un stress

cellulaire. (Pooya et al. 2012) ; (Garcia et al. 2011) ;(Joseph 2011). La persistance de ce stress peut favoriser l'apparition de maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, hépatiques et certains cancers (Ames 2010) ; (Liguori et al. 2018) (Pooya et al. 2012) ; (Garcia et al. 2011) ; (Joseph 2011). Plusieurs études ont montré que l'acidémie méthylmalonique conduit également à un stress oxydatif étroitement associé à la physiopathologie de troubles métaboliques. De plus, la cbl a des propriétés antioxydantes (Manzanares and Hardy 2010) et une carence en cbl peut donc contribuer au stress oxydatif et à l'apparition de pathologies (Liguori et al. 2018).

Nos résultats concernant la production des espèces réactives à l'oxygène a effectivement mis en évidence une accumulation de ROS, signe d'un stress oxydatif plus important, dans les cellules de patients. De plus, notre laboratoire a montré que l'indisponibilité intracellulaire de la cbl dans les cellules murines TO, comparé aux cellules OT, conduit à un stress du réticulum endoplasmique via la diminution de l'expression de la déacétylase SIRT1 qui conduit à une diminution de l'activation par dé-acétylation du facteur de transcription HSF1. Ces mécanismes conduisent à une diminution de l'expression des protéines chaperonnes et donc in fine au stress du RE (Ghemrawi et al. 2013). L'analyse de l'expression protéique de SIRT1 dans les fibroblastes cblC et cblG a montré une sous-expression significative de cette protéine, ce qui suggère que ces mécanismes de développement du stress du RE sont aussi à l'œuvre dans les fibroblastes de patients. Nous avons depuis confirmé ces résultats dans une étude récente qui a montré dans les fibroblastes de patients cblC et cblG l'existence d'un stress du RE et de la délocalisation des RBP. Il est intéressant de noter que cette étude a également montré que l'activation pharmacologique de SIRT1 par le SRT1720 était capable de réduire le stress du RE et de corriger la délocalisation subcellulaire des RBP (Ghemrawi et al. 2019).

Conclusion et perspectives

L'objectif global de mon travail de thèse peut être présenté en deux parties complémentaires : caractériser les modifications du transcriptome et identifier les mécanismes impliquant la méthylation pouvant être contribuer à ces altérations.

Nos données sur l'analyse du transcriptome montrent clairement que les anomalies cblC et cblG entraînent une altération de l'expression et de l'épissage de nombreux gènes impliqués dans des processus de développement et des mécanismes pouvant être à l'origine de pathologies cardiaques et neurologiques, proches de celles observées chez les patients. En effet, nous avons découvert que plusieurs de ces gènes sont directement impliqués dans des pathologies connues, et confirment des études protéomiques antérieures réalisées avec des cellules cblC (Hannibal et al. 2011) ; (Caterino et al, 2015). De plus, nous avons constaté que l'épissage alternatif anormal associé aux deux défauts génétiques affecte également d'importants processus biologiques tels que l'organisation du cytosquelette, la modification des protéines impliquées dans l'expression des gènes et la liaison à l'ARN. Une des limites de cette étude est l'absence de données cliniques précises concernant les différents patients. Il aurait été intéressant de disposer de ces informations pour éventuellement établir un lien entre le niveau d'expression d'un gène donné dans les fibroblastes de patients et leur présentation clinique. Nous avons analysé un groupe représentatif de lignées de patients cblC (présentation précoce et tardive) et cblG (présentation classique et sévère) mais une autre approche aurait consisté en une analyse d'un groupe plus homogène composé de fibroblastes de patients porteurs de la même mutation. De même, nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes différentiellement exprimés dans les deux types de lignées alors qu'une analyse comparée d'un plus grand nombre de lignées cblC et cblG aurait aussi pu nous donner des informations spécifiques à chacun de ces défauts.

De plus, bien que nous ayons réussi à transdifférencier les fibroblastes en neurones, nous n'avons pas encore pu suffisamment exploiter ce nouveau modèle cellulaire pour tester les hypothèses mécanistiques en lien avec les pathologies neuronales.

La mise en évidence des altérations du transcriptome impliquant divers gènes, suggère l'existence de perturbations de mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Même si l'analyse de nos données transcriptomiques n'a pas mis en évidence le rôle spécifique des RBP dans les modifications du niveau d'expression des gènes, notre étude révèle que certaines de

ces molécules jouent un rôle majeur dans les modifications de l'épissage alternatif et de l'expression des protéines associées aux défauts cblC et cblG. Les mécanismes à l'origine des modifications de la fonction de ces RBP sont encore très peu connus. Nos résultats précédents avaient montré que les dysfonctionnements du métabolisme de la vitamine B12 pouvaient conduire à une altération des modifications post-transcriptionnelles, phosphorylation et méthylation, des RBP HuR, HnRNPA1 et SRSF1 nécessaires à leur transport nucléocytoplasmique. Nous n'avons pas pu détecter de problèmes de localisation cellulaire des RBPs identifiées par l'analyse transcriptomique. Par contre, nous avons mesuré une surexpression de HNRNPL qui pourrait affecter sa contribution aux mécanismes d'épissage. Sachant que l'ARNm de HNRNPL est une cible de HuR, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'index de méthylation associée aux défauts cblC et cblG pourrait conduire à une localisation anormale de certaines RBP, perturber leur fonction et conduire à une modification de l'expression de certaines protéines clés dont des facteurs de transcription et d'autres RBP qui à leur tour contribueraient aux modifications de l'expression génique. Cet aspect de nos résultats ouvre également de nouvelles perspectives. En effet, notre étude suggère que la correction de la mauvaise localisation des RBP telles que HuR pourrait constituer une nouvelle stratégie potentielle dans le traitement des cas graves de résistance aux traitements classiques. Cette approche fait actuellement l'objet d'un nouveau projet à l'U1256 visant à évaluer l'efficacité d'un traitement par des agonistes de SIRT1 sur les capacités cognitives d'un modèle murin de la maladie cblG.

L'étude des mécanismes épigénomiques a montré une hypométhylation globale de l'ADN de gènes impliqués dans des processus développementaux bien que nous n'ayons pas retrouvé les mêmes gènes dans les analyses du transcriptome, du méthylome et du protéome. Bien que la diminution de la synthèse de la SAM et du rapport SAM/SAH aurait induit une hypométhylation globale de l'ADN, nous n'avons pas pu mettre en évidence un lien direct entre méthylation d'un gène et son niveau d'expression. Néanmoins, il conviendrait de poursuivre nos investigations sur les conséquences d'éventuelles altérations de la méthylation de l'ADN ou de l'ARNm avec un plus grand nombre de lignées de fibroblastes. Contrairement à l'ADN, la méthylation de l'ARN m6A et des histones H3K4me2 et H3K36me3 n'a pas montré de variation. Il serait intéressant d'étudier les autres marques épigénétiques de méthylation mais également d'acétylation des histones. L'analyse de la méthylation de l'ARN par séquençage des ARNm m6A pourrait aussi permettre d'identifier des signatures spécifiques de méthylation qui pourraient être responsables de la régulation de l'expression des gènes.

Nos données ont également montré que les patients cblC et cblG subissent un stress cellulaire endogène caractérisé par un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, l'analyse protéomique a montré l'implication des protéines de la biogenèse du complexe I de la chaîne de transport d'électrons. Ces données sont en accord avec des résultats précédents du laboratoire qui avaient mis en évidence le lien entre les dysfonctionnements du métabolisme des monocarbones et une dérégulation du métabolisme énergétique. Notre analyse de la respiration mitochondriale montre aussi une plus grande sensibilité au stress par une diminution de la capacité de réserve. Ces résultats sont là aussi à mettre en lien avec les perturbations de l'activité des RBP liées à la réponse cellulaire au stress.

Ainsi, pris dans leur ensemble, nos résultats contribuent à une meilleure compréhension de ces mécanismes moléculaires en ouvrant de nouvelles perspectives dans l'étude des pathologies associées aux défauts cblC et cblG. Ils confirment également certains travaux antérieurs du laboratoire concernant l'importance du stress et des RBP dans les mécanismes moléculaires déclenchés par un dysfonctionnement de la vitamine B12.

Matériels et méthodes

Fiche 1 : Mise culture des fibroblastes de patients cblC et cblG

Les fibroblastes de 3 patients cblC, 4 cblG et 3 lignées témoins ont été obtenus auprès du Centre de référence pour les maladies métaboliques héréditaires de l'Inter-région Grand Est, de l'Hôpital universitaire de Nancy, de l'Hôpital universitaire pour enfants de Zürich et de l'Université McGill. Les caractéristiques cliniques de chaque lignée cellulaire se trouvent dans le tableau 6.

Les fibroblastes ont été cultivés dans du milieu de culture DMEM (D5796, Sigma Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (F7524, Sigma Aldrich) inactivé par la chaleur à 56°C pendant 30 min, 1% de pyruvate de sodium à 100 nM (S8636, Sigma Aldrich), 1% de solution d'antibiotique à 10.000 unités de pénicilline et 10mg/mL de streptomycine (P4333, Sigma Aldrich) (Tableau 18) puis incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture a été changé tous les 3 jours et les cellules ont été récoltées à confluence pour des études ultérieures.

Tableau 19 : Composition du milieu utilisé pour l'entretien des fibroblastes des patients

Milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Glucose 4500mg/mL (Sigma Alrich, D5796)
10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté par la chaleur (Eurobio, CVFSVF0001)
1% pyruvate de sodium (Sigma Aldrich, S8636)
1% pénicilline-streptomycine (Sigma Aldrich, P4333)

Trypsination des fibroblastes de patients cblC et cblG

- Éliminer le milieu de culture
- Rincer le tapis cellulaire une fois avec du PBS 1X stérile
- Ajouter le volume adéquat de trypsine (cf tableau 20)
- Incuber à 37°C sous atmosphère humide et 5% CO₂ pendant **10** minutes
- Inhiber l'action de la trypsine en ajoutant du milieu contenant le SVF (le SVF contient des inhibiteurs naturels de la trypsine (α 1-antitrypsine et α 2-macroglobuline))
- Ajouter 5 volumes de milieu pour 1 volume de trypsine

- Réaliser une dizaine d'arcs de cercle avec la suspension cellulaire afin de décoller les dernières cellules du support
- Transférer la suspension cellulaire dans un tube Falcon adapté
- Centrifuger 5 minutes à 200g à température ambiante (T° amb)
- Eliminer le surnageant
- Resuspendre le culot cellulaire dans du milieu de culture complet (cf Tableau 20) pour le maintien des cellules à une dilution au 1/3 de la suspension cellulaire ou pour les analyses cellulaires et immunofluorescence après comptage.
- Le nombre de cellules dans une suspension cellulaire est déterminé grâce à l'appareil Luna TM Automated cell en mélangeant 10 µl de suspension cellulaire avec 10 µl de Bleu de Trypan, ensuite 10 µl du mélange précédent est placé dans une cellule de comptage pour être analysé.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différents volumes de réactifs utilisés en fonction du support de culture cellulaire

Support de culture	Surface (cm ²)	Milieu de culture (mL)	Volume de PBS 1X stérile (mL)	Volume de trypsine (mL)	Volume milieu, inactivation trypsine (5X volume de trypsine) (mL)	Volume SVF pur, inactivation trypsine (mL)
48 puits	1,1	0,5	0,2	0,2	1	0,1
24 puits / 4 puits	1,9	1	0,5	0,5	2,5	0,2
6 puits	9,6	3	1	0,5	2,5	0,2
T25	25	5	2	1	5	0,5
P100	57	10	3	2	10	1
T75	75	15	5	3	15	1
T150	100	30	10	6	30	2

Fiche 2 : Congélation et décongélation des cellules

1. Congélation :

- Après trypsination des cellules, reprendre le culot cellulaire dans 400 µL de milieu de culture
- Transférer les 400 µL dans un cryotube de 1 mL
- Ajouter goutte à goutte un mélange de 600µL (500 µL SVF + 100 µL diméthylsulfoxyde (DMSO))
- Placer le cryotube dans une boîte de congélation
- Mettre la boîte de congélation à -80°C pendant 24h minimum
- Transférer le cryotube dans l'azote liquide (-196°C)

2. Décongélation :

- Remplir un tube Falcon de 15 mL avec 12 mL de milieu de culture
- Décongeler le cryotube rapidement par friction entre les mains jusqu'au dernier glaçon
- Décontaminer l'extérieur du cryotube à l'éthanol 70%
- Transférer le contenu du cryotube dans le falcon contenant les 12 mL de milieu de culture
- Agiter doucement
- Centrifuger 5 min à 200g à T°amb
- Eliminer le surnageant
- Reprendre le culot dans le volume adéquat et placer la suspension cellulaire dans le support de culture adapté.

Fiche 3 : « In neurones » transdifférenciés à partir de fibroblastes de patients

cblC et cblG

J-1 Préparation des plaques et du milieu de culture

Ensemencer les fibroblastes (50 .000 cellules/puits) dans une plaque 12 puits avec lamelle, avec du milieu DMEM + 10% SVF TET-Free + 1% pyruvate + 1% penicilline-streptomycine (qsp 2 mL).

J0 – Infection

Les fibroblastes devraient être à 80% de confluence

Décongeler les particules lentivirales (-80°C) sur glace à 4°C et le polybrène à 4°C.

Mélanger doucement en agitant le tube

Ajouter 8 µg/mL de polybrène, mélanger en agitant légèrement la plaque

Ajouter 25 µL/puit de particules lentivirales au milieu de culture

J1 – Sélection

Rincer 3 fois les cellules avec du milieu de culture chauffé à 37°C et remettre du milieu 12-16h après infection (à 10h maximum pour une infection à 18h)

Ajouter 2 µg/mL de puromycine (0,4 µL pour 2mL) dans le milieu pendant 48h

J3 – Induction neuronale

Différenciation des fibroblastes

- Aspirer le milieu avec la pipette
- Rincer 3 fois les cellules avec du milieu 1 de différenciation chauffée à 37°C
- Ajouter 2 ml de Milieu 1 : N3/Basal + SM + FGF + Doxycycline /préparer 50 ml

J7-8 Maturation neuronale

Changer le milieu de culture pour maturer les iNeurones

- Milieu 2 : N3/Basal + FGF + Doxycycline + NTF

Changer le milieu tous les 2 jours

Tableau 21 : Milieu 1 de différenciation des fibroblastes en « neurones »

Milieu N3/Basal	Référence	Ci	Ci (nmol/ml)	Cf	Fournisseur
DMEM/F12: neurobasal mixed at 1:1	D8437	-	-	-	Sigma
Insulin solution human	I9278	10mg/ml	-	25 µg/mL	Sigma
Apo-Transferrin human powder	T1147	50 mg/ml	-	50 µg/mL	Sigma
Sodium selenite	S5261	1mg/ml	5782,35	0,03nmol/mL	Sigma
Progesterone	P6149	20 µg/ml	63,60	0,02nmol/mL	Sigma
Putrescine	51799	5mg/ml	56721,50	0,1nmol/mL	Sigma
B27	17504044	50 x	-	0,40%	Sigma
+SMs					
CHIR99021	SML1046	2mg/mL	4297,93	1 nmol/mL	Sigma
SB 431542 hydrate	S4317	10mg/ml	26015,24	10 nmol/mL	Sigma
db-cAMP	D0260	10mg/ml	20351,26	0,5 nmol/mL	Sigma
Recombinant Human Noggin	6057	25 mg/mL	25000,00	0,1 µg/mL	R&D
LDN193189 hydrochloride	SML0559	5mg/ml	12300,73	0,5 nmol/mL	Sigma
+ Antibiotique					
Doxycycline hyclate	D9891	20 mg/mL	-	1 µg/mL	Sigma
NTF					
Fibroblast Growth Factor-Basic human recombinant, expressed in Escherichia coli	F0291	25 µg/mL	-	0,01 µg/mL	Sigma

Tableau 22 : Milieu 2 de maturation des "neurones"

Milieu 1 + NTF	Référence	Ci (µg/ml)	Cf (ng/mL)	Vi (µL) pour Vf=10 mL	Fournisseur
CNTF	C3710	20	20	20	Sigma
BDNF	B3795	100	10	1	Sigma
NT-3 human	SRP3128	10	10	10	Sigma
GDNF	G1777	13,8	20	14.5	Sigma

1. Caractérisations des "neurones"

Afin de caractériser fonctionnellement les « neurones », nous avons effectué 4 immunomarquages spécifiques aux neurones en utilisant le protocole détaillé de la fiche 17. Les références des anticorps testés se trouvent dans le tableau 25. Les 4 protéines choisies sont les suivantes :

- Microtubule-associated protein 2 (MAP 2) : protéines associées aux microtubules spécifiques aux neurones
- NeuroN (NeuN) : protéine nucléaire présente dans les neurones matures.
- Synapsin 1 (SYN 1) : phosphoprotéine neuronale.
- Beta tubuline isoforme 3 (TujI) : forme spécifique des neurones.

Fiche 4 : Extraction d'ADN (QIAamp DNA Mini)

- Resuspendre le culot cellulaire avec 200 µl de PBS1x
- Ajouter 20 µl de protéinase k
- Ajouter 200 µl de tampon AL à l'échantillon. Mélanger au vortex pendant 15 secondes. Incuber 56°C pendant 10 min
- Centrifuger brièvement le tube afin d'enlever les gouttes à l'intérieur du couvercle
- Ajouter 200 µl d'éthanol 100% à l'échantillon et mélanger en vortexant pendant 15 s. Après le mélange, centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml afin d'enlever les gouttes à l'intérieur du couvercle.
- Transférer le mélange dans une colonne QIAamp Mini et centrifuger à 6 000 x g (8 000 tr / min) pendant 1 min. Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube collecteur propre de 2 ml (fourni) et jetez le tube contenant le filtrat.
- Ajouter 500 µl de tampon AW2 sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g ; 14 000 tr / min) pendant 3 min
- Placez la colonne QIAamp Mini dans un tube à centrifuger propre de 1,5 ml et jetez le tube collecteur contenant le filtrat.
- Ouvrir la colonne QIAamp Mini avec précaution et ajouter 200 µl de tampon AE
- Incuber à la température ambiante (15-25 ° C) pendant 1 min, puis centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min.

Fiche 5 : Extraction des ARNs totaux (RNeasy plus mini ki)

1. Ajouter **18 µl** de de Beta-Mercaptoéthanol (**β-ME**) dans **1.8 ml de Buffer RTL Plus**
2. Ajouter **600 µl de Buffer RTL Plus** dans le culot cellulaire et **homogénéiser par pipetage**
3. Passer le **lysate cellulaire 5 fois** à travers une seringue de 1 ml et une **aiguille à 23 Gauge**
4. Transférer le lysate cellulaire dans la **colonne gDNA Eliminator spin et centrifuger 30s à 8000g**. Jeter la colonne et garder l'éluat.
5. Ajouter **600 µl d'éthanol 70%** à l'éluat et mélanger par pipetage
6. Transférer **700 µl d'éluat** dans la **colonne RNeasy spin**. Centrifuger **15s à 8000g** et jeter l'éluat.
7. Répéter l'étape 6 avec le reste de l'éluat
8. Ajouter **700 µl de buffer RW1** dans la **colonne RNeasy spin**, centrifuger **15s à 8000g** et jeter l'éluat.
9. Ajouter **500 µl de Buffer RPE** à la **colonne RNeasy spin**, centrifuger **15 à 8000g** et jeter l'éluat.
10. Ajouter **500 µl de RPE** dans la **colonne RNeasy spin**, centrifuger **2 min à 8000g** et jeter l'éluat
11. Mettre la colonne dans un **nouveau tube de 2 ml** et centrifuger **1 min à 10000g**.
12. Placer la **colonne RNeasy spin** dans un **tube de 1.5 ml** et ajouter **30 µl de RNase free** directement dans la membrane de la colonne et centrifuger **1 min à 8000g** pour éluer l'ARN.
13. Procéder au dosage des ARNs par le spectrophotomètre
14. Si la quantité d'ARN > 30 µg, répéter l'étape 12

Fiche 6 : Digestion de l'ARN total à la DNase

1. Dissoudre le culot d'ARN dans 150 µL de tampon DNase-I Turbo 1x (Ambion AM1906) contenant 1 µl d'enzyme DNase et 1 µl de RNaseOUT. Incuber à 37°C/30 min/ 300 rpm (bloc chauffant agitant).

Pour 7 extractions : Mélanger **105 µl** Tp 10x + **945 µl** eau RNase Free + **7 µl enzyme DNase** + **7 µl RNaseOUT** et distribuer **152 µl** dans chaque tube.

2. Ajouter **350 µl** d'eau milliQ
3. Ajouter **500 µl** de phénol/chloroforme saturé (ph 4.5), mélanger **1 min à la main**. Centrifuger à **12000g/4°C/10 min**, transférer environ **560 µl** de la **phase aqueuse supérieure dans un nouveau tube safelock**, éliminer la phase organique inférieure.
4. Ajouter **500 µl de chloroforme**. Mélanger **1 min à la main**. Centrifuger **12000g/4°C/10 min**. et récupérer environ **560 µl de phase aqueuse supérieure**.
5. Ajouter (**56 µl**) **10% d'acétate de sodium 3M, ph 4.5** puis 1 volume (**616 µl**) **d'isopropanol froid**, placer les tubes à **20°C (1h) ou -80°C (10 min)**. Centrifuger **12000g/4°C/10 min** et éliminer le surnageant.
6. Laver le culot avec **1 ml d'éthanol 75% (37.5 ml d'éthanol 100% + 12,5ml d'eau MQ)**, agiter l'échantillon brièvement et centrifuger le tube à **7500g/4°C/5min**. Eliminer le surnageant.
7. Sécher à **l'air libre pendant 5-10 min**. Reprendre le culot d'ARN avec **30 µl de tampon souhaité (eau RNase Free ou eau milliQ)**.
8. Chauffer à **55-60°C/5min** pour le solubiliser ou laisser à 4°C 1h

Note : Ne pas sécher complètement au risque de rendre l'ARN non insoluble.

Les ARNs partiellement solubilisés ont un ratio A260/A280 < 1.6.

Fiche 7 : Quantification des acides nucléiques

- Déposer 2 μl d'ARN ou d'ADN (pure ou dilué) sur la plaque de lecture
- Lire l'absorbance à 260 et 280 nm avec à un spectrophotomètre.
- Une concentration de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARN et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ADN double brin correspond à une unité d'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm.
- Les concentrations en acide nucléique sont calculées selon les formules suivantes :

$$[\text{ARN}] = 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution.}$$

$$[\text{ADN}] = 50 \mu\text{g}/\text{mL} \times A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution.}$$

D'une manière générale, la pureté d'une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque le ratio $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ est compris entre 1,8 – 2,0 pour l'ADN et entre 2,0 – 2,2 pour l'ARN

Fiche 8 : Vérification de la qualité des acides nucléiques avec le Bioanalyseur

Le Bioanalyzer 2100 (Agilent) est permet la séparation des échantillons d'Acides nucléiques par électrophorèse en vue de leur contrôle-qualité Ref Kit: 5065-4476 (<http://www.chem.agilent.com>)

Réactifs et matériels :

- Bioanalyseur 2100 Agilent
- RNA 6000 Nano Kit
- RNA 6000 Nano Chips
- Chip priming station
- Echantillons à doser (12 échantillons/puce)
- RNA 6000 ladder

La concentration requise pour les échantillons requise doit être comprise entre 5 et 500 ng/ μ L

Préparation du « ladder »

Pour préparer le « ladder », le décongeler et le dénaturer 2 min à 70 °C puis le placer immédiatement sur glace.

Préparation du matériel

- Sortir le RNA 6000 Nano Assay Kit à température ambiante, 30 min avant utilisation, à l'abri de la lumière.
- Allumer le bloc chauffant à 70 °C.
- Préparer la station

Préparation du Gel-dye Mix

- Placer 550 μ L de RNA gel matrix sur la colonne de filtration. Centrifuger 10 min à 4000 rpm (1500 rcf)
- Mettre 65 μ L de RNA gel matrix filtré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et rajouter 1 μ L de RNA dye concentré puis Vortexer, Centrifuger 10 min à 12 000rpm (13 000 rcf) le Gel-dye

Préparation des échantillons et du marqueur de taille

- Décongeler le RNA 6000 Ladder sur glace.
- Incubation des échantillons et du ladder (optionnel pour le ladder), 2 min à 70 °C, pour les dénaturer.
- Placer immédiatement les tubes sur glace. Les centrifuger (les conserver sur la glace).

Couler le gel

- Placer la seringue sur « La station ».
- Régler la seringue sur 1 mL.
- Déposer 9 μ L de Gel-dye mix dans le puits G de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !)
- Placer la puce dans « La station ». Fermer « La station » et presser doucement sur la seringue jusqu'au « clip ». Attendre Exactly 30 secondes
- Déclipser la seringue. Laisser la position de la seringue remonter doucement (jusqu'à la graduation 0,8 mL environ), remonter doucement le piston de la seringue à 1 mL. Ouvrir « La station ».

Puce

- Déposer 9 μ L de Gel-dye mix dans les deux puits notés G de la puce (ne pas introduire de bulles d'air !).
- Vortexer le RNA 6000 Nano marker.
- Déposer 5 μ L de RNA 6000 Nano marker dans le puit réservé au ladder et dans les 12 puits réservés aux échantillons.
- Déposer 1 μ L de ladder (L décongelé) dans son puits et déposer 1 μ L de chaque échantillon.
- Vortexer 1 min la puce à 2400 rpm.
- Placer la puce dans l'appareil Agilent 2100 bioanalyzer. Fermer le couvercle de l'appareil doucement pour ne pas endommager les électrodes. Démarrer l'analyse dans un délai maximum de 5 min et Analyser

Fiche 9 : Retro-transcription de l'ARN et expression génique par PCR quantitative

L'expression des gènes a été évaluée par RT-qPCR en utilisant le kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step (#1725151). Les amorces utilisées ont été validés par Biorad et sont reçues lyophilisés dans une plaque personnalisée. La liste des caractéristiques des gènes utilisés dans cette étude se trouve dans le tableau 9.

Tableau 23 : Listes des amorces utilisées en PCR quantitative

Gene	Localisation du Chromosome	RefSeq	Taille de l'amplicon	Identifiant Ensembl	UniGene	Assay Design
<i>AASDH</i>	4:57248691-57250293	NC_000004.11NT_022853.15	101	ENSG00000157426	Hs.104347	intron-spanning
<i>ALAS1</i>	3:52248056-52248170	NC_000003.11NT_022517.18	85	ENSG0000023330	Hs.476308	intron-spanning
<i>DUSP4</i>	8:29195799-29195912	NC_000008.10NT_167187.1	84	ENSG00000120875	Hs.417962	exonic
<i>PPARG</i>	3:12421376-12422912	NC_000003.11NT_022517.18NG_011749.1	117	ENSG00000132170	Hs.162646	intron-spanning
<i>FAM19A2</i>	12:62104005-62104125	NC_000012.11NT_029419.12	91	ENSG00000198673	Hs.269745	exonic
<i>DAPK1</i>	9:90258337-90260878	NC_000009.11NT_008470.19	86	ENSG00000196730	Hs.380277	intron-spanning
<i>MLPH</i>	2:238462375-238462465	NC_000002.11NT_005120.16NG_007286.1	61	ENSG00000115648	Hs.102406	exonic
<i>DCN</i>	12:91572210-91572315	NC_000012.11NG_011672.1NT_029419.12	76	ENSG00000011465	Hs.156316	exonic
<i>IL16</i>	15:81593750-81595953	NC_000015.9NT_010194.17	138	ENSG00000172349	Hs.459095	intron-spanning
<i>CDON</i>	11:125891320-125893335	NC_000011.9NT_033899.8	106	ENSG00000064309	Hs.38034	intron-spanning
<i>COL6A6</i>	3:130300834-130305396	NC_000003.11NT_005612.16	96	ENSG00000206384	Hs.591282	intron-spanning
<i>LYNX1</i>	8:143857327-143857444	NC_000008.10NT_008046.16	88	ENSG00000180155	Hs.158665	exonic
<i>RCAN2</i>	6:46214630-46216534	NC_000006.11NT_007592.15	72	ENSG00000172348	Hs.440168	intron-spanning
<i>KCNJ2</i>	17:68170965-68171100	NC_000017.10NG_008798.1NT_010783.15	106	ENSG00000123700	Hs.1547	exonic
<i>LUM</i>	12:91497979-91501948	NC_000012.11NT_029419.12	142	ENSG00000139329	Hs.406475	intron-spanning
<i>TNFRSF21</i>	6:47202594-47221055	NC_000006.11NT_007592.15	75	ENSG00000146072	Hs.443577	intron-spanning
<i>ADGRG7</i>	3:100368599-100373750	NC_000003.11 NT_005612.16	95	ENSG00000144820	Hs.334511	intron-spanning
<i>TLL1</i>	4:166910588-166914002	NC_000004.11 NG_016278.1 NT_016354.19	73	ENSG00000038295	Hs.106513	intron-spanning
<i>FOXE1</i>	9:100618083-100618174	NC_000009.11 NG_011979.1 NT_008470.19	62	ENSG00000178919	Hs.159234	exonic
<i>ISL2</i>	15:76632688-76632867	NC_000015.9 NT_010194.17	150	ENSG00000159556	Hs.444677	exonic
<i>HTRA4</i>	8:38840496-38845501	NC_000008.10 NT_167187.1	89	ENSG00000169495	Hs.661014	intron-spanning
<i>SRGN</i>	10:70863783-70863876	NC_000010.10 NT_030059.13	64	ENSG00000122862	Hs.1908	exonic
<i>PDLIM3</i>	4:186423350-186423491	NC_000004.11 NT_016354.19	112	ENSG00000154553	Hs.731826	exonic
<i>RBP7</i>	1:10075850-10075998	NC_000001.10 NT_021937.19	119	ENSG00000162444	Hs.422688	exonic
<i>MYH10</i>	17:8508252-8526298	NC_000017.10 NT_010718.16	98	ENSG00000133026	Hs.16355	intron-spanning
<i>BMPRI1B</i>	4:96025658-96035959	NC_000004.11 NG_009245.1 NT_016354.19	120	ENSG00000138696	Hs.598475	intron-spanning
<i>TNFRSF10A</i>	8:23058229-23059391	NC_000008.10 NT_167187.1	86	ENSG00000104689	Hs.591834	intron-spanning
<i>MYEF2</i>	15:48451944-48458221	NC_000015.9 NG_011500.1 NT_010194.17	120	ENSG00000104177	Hs.6638	intron-spanning
<i>STK38L</i>	12:27450718-27461319	NC_000012.11 NT_009714.17	140	ENSG00000211455	Hs.184523	intron-spanning
<i>EPHA5</i>	4:66201659-66201804	NC_000004.11 NT_022778.16	116	ENSG00000145242	Hs.654492	exonic

Fiche 10 : Extraction des protéines par différents tampons d'extraction

- **Tampon NaCl pour les protéines totales** (Co-immunoprécipitation/WB)

Le culot cellulaire a été repris avec 2,5 volumes du tampon de lyse contenant 150 mM NaCl (Sigma, S9888), 1% IGEPAL, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% PIC (Sigma, P8340), 1% PMSF (Sigma, Réf : P7626), 1% Na₃VO₄ (Sigma, S6508) puis incubé 30 min sur glace. La suspension cellulaire a été centrifugée 30 min à 20 000g, 4°C et le surnageant protéique a été récupéré pour le dosage des protéines par la méthode BCA assay (Thermo fischer).

- **Tampon RIPA pour les protéines totales** (WB/métabolites intracellulaire)

Les cellules ont été reprises avec 1 ml de tampon RIPA (Tableau 24) supplémenté avec 1% de PMSF, 1% de Na₃VO₄ et 0.5% de PIC. La suspension cellulaire a été homogénéisée par 20 allers retours avec une seringue de 1 ml et une aiguille à 0.8 mm pour lyser les membranes cellulaires et libérer le contenu cellulaire. Ensuite, le lysat a été soumis à 2 cycles de congélation-décongélation avec de l'azote liquide et un bain marie à 37°C puis centrifugé 30 min à 4°C/12000g et le surnageant a été transféré dans un nouveau tube. Les concentrations en protéines ont été dosées par la méthode BCA assay (Thermo Fischer).

Tableau 24 : Composition du tampon RIPA

Produits	Fournisseur	Référence	Quantité	
NaCl	SigmaAldrich	S9888	8g/L	dans PBS 1X sans Ca, Mg
Na ₂ HPO ₄	SigmaAldrich	S0876	1,44g/L	
KH ₂ PO ₄	Merck	646A148973	0,24 g/L	
NP40	Euromedex	UN3500-A	1%	
DOC	SigmaAldrich	D6750	0,50%	
SDS	SigmaAldrich	L4509	0,10%	
PMSF (10 mg/mL d'éthanol)	SigmaAldrich	P7626	10 µL/mL de RIPA	
Na ₃ VO ₄ (18,39 mg/mL d'H ₂ O)	SigmaAldrich	S6508	10 µL/mL de RIPA	
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	SigmaAldrich	P8340	10 µL/mL de RIPA	

- **Tampon pour les protéines cytoplasmiques** (Activité de la MS)

Les culots cellulaires ont été remis en suspension avec un tampon de lyse contenant du PBS 0.1x et 0.5% PIC (Protease Inhibitor Cocktail). Les cellules ont été lysées par broyage mécanique à l'aide d'un sonicateur Branson (Microtip limit, mode pulsed, 40%) en y appliquant 45 pulses. Le lysat a été centrifugé à 20.000g/4°C pendant 30 min. Le surnageant protéique a été prélevé, homogénéisé, placé dans un microtube à ultrafiltration (Amicon Ultra 0.5 ml, YM10) (millipore) et centrifugé à 14000g/4°C pendant 20 min afin de concentrer et de purifier les protéines. La solution protéique a été récupérée par centrifugation à 1000g/4°C pendant 2 min. La fraction protéique a ensuite été dosée par la méthode DC protein assay (Bio-Rad).

- **Tampon pour l'extraction des histones**

Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 700 µL de tampon de lyse hypotonique (10 mM Tris pH 8, 1mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 1 mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 2 mM NaF, 5 mM NaBu, 2 % cocktail inhibiteurs de protéases (v/v)). Les cellules ont ensuite été broyées par 15 allers-retours à la seringue (23G) et les extraits ont été incubés pendant 30 min à 4 °C sur un agitateur rotatif puis centrifugés pendant 10 min à 10000 xg à 4 °C afin d'isoler les noyaux et le surnageant a été éliminé. ; Les culots ont été repris dans 400 µL d'acide sulfurique H₂SO₄ 0,2 M (0,4 N) et incubés 2 h à 4 °C sur un agitateur rotatif puis centrifugés pendant 10 min à 14000 xg à 4 °C. Les surnageants contenant les histones ont été récupérés et dialysés sur la nuit contre 400 mL d'acide acétique 2,5 % (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO, 0.5 mL, Thermo Fisher). Le lendemain, les extraits ont été récupérés dans des tubes low binding (Thermo Fisher), mis à -80 °C pendant 2 h 35 puis lyophilisés (Savant SC110A-120 Speed Vac Plus Vacuum Concentrator, Thermo Fisher) ; Les histones lyophilisées ont finalement été resuspendus dans 50µL d'eau Milli-Q avant d'être dosées par la méthode BCA.

Fiche 11 : Dosage des protéines par la méthode « BCA Assay »

1. Préparer une gamme étalon en triple exemplaire :

Cf (µg/mL)	VBSA µL	VH ₂ O (µL)	Vf (µL)	Ci BSA µg/mL
0	0	25	25	2000
96	1,20	23,8	25	2000
200	2,5	22,5	25	2000
400	5	20	25	2000
800	10	15	25	2000
1200	15	10	25	2000
1600	20	5	25	2000
2000	25	0	25	2000

2. Préparer le réactif de travail

- Mélanger 50 volumes du réactif A (BCA) avec 1 volume de solution B (CuSO₄)

$$V_{\text{réactif de travail}} = (\text{nbr de tube de gamme} \times \text{nbr de réplicats}) + (\text{nbr d'échantillons} \times \text{nbr de réplicat}) \times V_{\text{mix BCA}}$$

3. Distribuer 25 µL de chaque dilution de BSA ou d'échantillon à doser dans une plaque 96 puits

4. Ajouter 200 µL de réactif de travail dans chaque puit et agiter la plaque

5. Couvrir la plaque et laisser 30 min à 37°C

6. Laisser refroidir la plaque à température ambiante

7. Mesurer l'absorbance à 570 nm sur un spectrophotomètre Multiskan GO

Fiche 12 : Dosage des protéines par la méthode « DC Assay »

- Utiliser des microtubes 1,5 mL
- Extraire les protéines dans un bain à ultrasons puis par chocs thermiques (1000 μ L PBS 0.1x / 100 μ L de culot cell)
- Centrifuger à 12000 g/4°C/10min, éliminer le culot
- Utiliser le kit de dosage *DC protein assay* (Bio-Rad)
- Préparer une gamme de BSA dans des microtubes 1,5 mL, à partir de BSA standard 2 mg/mL

	BSA (g/L)	Vol BSA (μ L)	vol. PBS 1x (μ L)
A	1.6	48 μ L (BSA stock)	12 μ L
B	1.2	18 μ L (BSA stock)	12 μ L
C	0.8	30 μ L (#A)	30 μ L
D	0.4	30 μ L (#C)	30 μ L
E	0.2	30 μ L (#D)	30 μ L
F	0.1	30 μ L (#E)	30 μ L
G	0.05	30 μ L (#F)	30 μ L
H	0	-	30 μ L

- Préparer 2 séries de microtubes pour les échantillons
- Ajouter 30 μ L de PBS 1x pour 10 μ L d'échantillon (dilution 1/4), mélanger puis prélever 10 μ L et diluer à nouveau dans 30 μ L de PBS 1x (dilution 1/16). Mélanger.
- Dans une microplaque transparente 96 puits à fond plat, distribuer les échantillons dilués et la gamme de BSA (10 μ L / puits), en duplicats
- A l'aide d'une pipette de distribution, distribuer 25 μ L de réactif A, mélanger la plaque à la main.
- Distribuer ensuite 200 μ L de réactif B, couvrir et laisser sous agitation douce à RT pendant 5 min.
- Mesurer l'absorbance avec le spectrophotomètre Multiskan GO à 750 nm

Fiche 13 : Dosage des métabolites intracellulaires

Les concentrations cellulaires en Homocystéine (Hcy), Acide méthylmalonique (MMA), Méthionine (Met), S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) et S-Adénosyl-L-Homocystéine (SAH) sont mesurées par une technique de chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (MSMS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) positif.

- Acidifier immédiatement un aliquot d'extrait protéique ou surnageant cellulaire (idéal = 100 µL, minimum = 30 µL) avec de l'acide acétique 1N (1 volume pour 10 volumes d'extrait)
- Congeler à -80°C et acheminer congelé
- Préparer une série de tubes Eppendorf de 1,5 ml numérotés

	Blanc Réactif	Blanc Échantillon	Standard S0 à S10	Contrôles	Échantillons
Prise essai	50 µL eau	50 µL plasma ayant servi à préparer les Std	50 µL	50 µL	50µL
Sdt Interne	50 µL DTT sans sdt int	50 µL DTT sans sdt int	50 µL	50 µL	50 µL

- Vortexer les tubes et incuber 15 min à température Ambiante

Méthanol à 0,1 % acide Formique	100 µL				
------------------------------------	--------	--------	--------	--------	--------

- Vortexer les tubes et incuber 30 min à 4°C puis vortexer à nouveau, centrifuger 10 min à 15000 rpm

DEPOT EN PLAQUE POUR PASSAGE SUR LCMSMS

- Dans une plaque de 96 puits de 350 µL :

- Distribuer en A1, 200µL H₂O + 0.2 % Acide Formique
- Distribuer 100 µL H₂O + **0.2 % Acide Formique** dans les autres puits
- Ajouter 25 µL de chaque échantillon dans les puits correspondants (dilution 1/5e)
- Souder un film sur la plaque et mettre à agiter la plaque 5 min à 600 rpm
- Centrifuger la plaque 2 min à 1500 rcf

Passer sur le LCMSMS (COLONNE HSST3- 10 cm)

Ø PHASES MOBILES (A1 : H₂O + 0.2 % Acide Formique ; WEAK : H₂O + 0.2 % Acide Formique ; B1-STRONG : MeOH + 0.2 % Acide Formique ; SONIQUER LES PHASES MOBILES 10 MIN (pour dégazer).

La colonne de chromatographie permet de séparer le MMA de son isomère, l'acide succinique (même masse moléculaire mais polarité différente). La quantification est faite grâce à une gamme d'étalonnage et un ajustement inter-échantillon grâce aux standards deutérés ajoutés en concentration connue et constante

Fiche 14 : Dosage de l'activité de la méthionine synthase

La préparation des réactifs se fait avec de l'eau mQ désoxygénée (sous flux d'azote gazeux pendant 30 min)

- Préparer un bain marie à 37°C. Préparer le DTT et l'acide ascorbique le jour même.
- Préparer une série de 4 microtubes 1.5 mL par patient, et ajouter une série de 4 pour le contrôle positif (extrait de foie de rat) et une série de 4 pour le contrôle négatif (BSA)
- Distribuer pour chaque extrait de fibroblastes (ou contrôle) 150 µg de protéines totales cytosoliques (pour un volume maxi de 70 µL)
- Compléter le volume à 70 µL avec du PBS 1x, fermer les tubes
- Préparer le mélange réactionnel ci-dessous en le maintenant sous le flux d'azote gazeux.
- Distribuer 30 µL du mélange réactionnel précédent dans chaque tube d'échantillon. Saturer chaque échantillon avec de l'azote gazeux avant de refermer le tube

Vol réac : 100 µL	C réaction	C stock	Volume (µL)	MasterMix / n
Protéines			70	/
Tp 10x (MTR)	1.x	10.x	10	10*n
DTT	25 mM	580 mM	4,31	4.31*n
Ascorbate	25 mM	720 mM	3,47	3.47*n
Adomet (SAM)	0,05 mM	20 mM	0,25	0.25*n
Me-B12	50 µM	5 mM	1	n
Hcy	5 mM	250 mM	2	2*n
[14C] MeTHF	50 µM	2,5 mM	2	2*n
H2O qsp 30 µL			6,97	6.97*n
Radioactivité spécifique	X cpm/nmol			

- Incuber le mélange 20, 40, 60 ou 80 min / 37°C pour chaque série d'échantillon.
- Dénaturer les enzymes en chauffant les tubes à 95°C/5min, puis conserver ces derniers à 4°C (dans la glace)
- Centrifuger les tubes à 12000g/10min/RT, récupérer le surnageant.

- Pendant ce temps, laver les colonnes AG1x8 (échangeuse d'anions Cl⁻, Bio-Rad) en passant 5mL d'HCl 0,5N
- Équilibrer les colonnes avec 5 lavages de 2mL d'eau mQ
- Déposer les échantillons sur les colonnes puis rincer avec 3 lavages de 1mL d'eau mQ (la [14C] méthionine est éluée en premier car non retenue par le gel, contrairement au [14C]H3-THF)
- Les colonnes sont ensuite régénérées en faisant 3 lavages de 5mL d'HCl 0,5N (élution de la [14C]H3-THF)

La radioactivité est comptée dans des tubes en Poly-Ethynène (Packard)

Fiche 15: Analyse des protéines par Western blot

ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN CONDITION DENATURANTE (SDS-PAGE) – WESTERN BLOTTING

Produits utilisés

Trizma®Base (<i>Tris-HCl</i>)	Sigma	ref : T-6066	FW=121,1
Lauryl sulfate (<i>SDS</i>)	Sigma	ref : L-4509	FW=288,4
Ammonium persulfate	Sigma	ref : A-3678	FW=228,2
Temed	Carlo Erba	ref : 600461	
2-mercaptoethanol	Merck	ref : 12006	FW=78,13
Bromophenol blue sodium salt	Sigma	ref : B-8026	FW=692
Glycine	Sigma	ref : G-7126	FW=75,07
Sample Buffer Laemmli x2	Sigma	ref : S-3401	
Methyl Alcohol	Carlo Erba	ref : 525101	
Sodium chloride (<i>NaCl</i>)	Sigma	ref : S-9888	FW=58,44
Tween 20	Sigma	ref : P-1379	
Isopropanol	Sigma	ref : I-9516	FW=60,10
Immobilon™-P (<i>PVDF</i>)	Millipore	ref : IPVH00010	
Mini Trans-Blot filter paper	Bio-Rad	ref : 1703932	
Ponceau S (<i>rouge Ponceau</i>)	Sigma	ref : P-3504	FW=760,6
Albumine Bovine, fraction V	Euromedex	ref : 04-100-810C	
Acide acétique 100%	Prolabo	ref : 20-104.323	
ECL™	Amersham Biosciences	ref : RPN2106	
<i>Western Blotting Detection Reagents</i>			
Kodak LX24 (révélateur)	Merck Eurolab	ref : 5070933	
Kodak AL4 (fixateur)	Merck Eurolab	ref : 5071071	
Hyperfilm™ MP (film photographique)	Amersham Biosciences	ref : RPN1675K	

Préparation des solutions

Solutions pour la préparation des gels de concentration et de séparation

Tris-HCl 1,5M pH 8,8

18,165 g de Tris/100ml H₂O MQ, ajuster à pH 8,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C

Tris-HCl 0,5M pH 6,8

6,055 g de Tris/100ml H₂O MQ, ajuster à pH 6,8 avec HCl, filtrer sur 0,22µm et conserver à 4°C

SDS 10%

10 g de SDS/100ml H₂O MQ, sous agitation douce pour éviter que cela mousse, conserver à température ambiante

Persulfate d'ammonium 10%

1g/10ml H₂O MQ, aliquoter par 400µl, conserver à -20°C

Tampon de dépôt de Laemmli 2X

Tris à 125mM (0,151g/10ml H₂O MQ) contenant :

SDS 4% (p/v)

2-mercaptoéthanol 10% (v/v)

Bleu de bromophénol 0,004% (p/v)

ou Solution prête à l'emploi (Sample Buffer Laemmli X2)

Tampon de migration : pour 1 litre 10X concentré

Tris 250 mM 30g
Glycine 1,92 M 144g
SDS 1 % 10g
qsp H₂O MQ

A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter à 1litre.

pH ≈ 8,3 - ne pas ajuster avec HCl

Conserver à 4°C

Utiliser à température ambiante

Tampon de transfert : pour 1 litre 10X concentré

Tris 480 mM 58,1g
Glycine 390 mM 29,3g
SDS 0,375 % (13 mM) 3,75g
qsp H₂O MQ

A utiliser 1X concentré : 100ml de la solution 10X + 200ml d'éthanol + qsp H₂O MQ

pH ≈ 9,2 – ne pas ajuster avec HCl –

Conserver à 4°C

Utiliser froid

Tampon de lavage TBS: pour 1 litre 10X concentré

Tris 200 mM 24,2g
NaCl 1,5 M 87,5g
pH 7,4 à ajuster avec HCl
qsp H₂O MQ
Conserver à 4°C

A utiliser 1X concentré : **TBST** :100ml de la solution 10X + qsp H₂O MQ + 1ml de Tween 20 à 0,1%

Conserver à 4°C.

Electrophorèse

Préparation des gels

Passer les plaques de verre à l'alcool

Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5mm)

Préparer le gel de séparation -voir tableau- à la concentration souhaitée. Pour 2 gels prévoir 20ml de solution

Couler les gels et s'arrêter au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne

Déposer un fin film (~ 500µl) d'isopropanol (ou isobutanol)

Attendre la polymérisation à température ambiante (pour gel 12%, si t° ~ 20-22°C compter 20mn)

Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau

Couler le gel de concentration à 5% -voir tableau- Pour 2 gels prévoir 8ml
Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles : polymérisation
Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration
Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central
Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

Préparation des échantillons

Les échantillons récupérés dans un tampon de lyse doivent être préalablement dosés.

Pour un premier essai, prévoir un dépôt de 20 à 30µg de protéines par puits.

Pour une plus belle migration, déposer à quantité et volume constants (pour une même quantité de protéines par échantillon, compléter avec le tampon de lyse ou de l'eau milliQ pour obtenir le même volume)

Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X à 1 volume d'échantillon
Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons et les marqueurs de taille (si nécessaire)
Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs

Migration :

Voltage constant

Gel de concentration : 80V, environ 15mn

Gel de séparation : 110V, ~1h30

Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

Electro-transfert liquide

Préparation de la membrane

Découper la membrane à la dimension du gel : 7x8,5cm minimum (gants)

Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol

Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert froid (5mn max) ainsi que les éponges et les filtres

Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)

(permet de retirer le SDS contenu dans le gel et qui peut interférer dans la fixation des protéines à la membrane durant le transfert, il peut être nécessaire d'ajouter un peu de SDS au tampon de transfert si la protéine n'est que partiellement insoluble due à son poids moléculaire élevé ou si elle contient beaucoup d'acides aminés hydrophobes)

Transfert

Préparation du sandwich : placer la face blanche en haut et noire en bas, superposer sur la face blanche dans l'ordre :

- une éponge
- 2 papiers filtres
- la membrane
- le gel (vérifier qu'il n'y a pas de bulles d'air sinon les expulser doucement au doigt)
- 2 papiers filtres: **expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique**
- une éponge

Fermer le sandwich

Placer les cassettes dans le module de transfert, face noire vers face noire

Mettre le glaçon

Remplir la cuve avec du tampon froid

Transfert à ampérage constant :
350mA pendant 45mn
ou 90mA toute une nuit

Vérification du transfert (en option)

Quand on sort les membranes de la cassette on observe des bandes sur la membrane si le transfert à marcher.

ou

Coloration de la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2% (p/v), acide acétique 0.1% (v /v), filtrée 0.2µm, 4°C) pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée.

A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure.

Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

Blocage

Repérer de quel côté sont les protéines

Mettre les membranes dans **25mL** de solution de TBST /lait écrémé 5% (ou BSA) sous agitation pendant 1 heure à température ambiante

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

1^{er} anticorps

Préparer une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane

Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5% (4 à 5ml au total)

Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Lavage

Sortir la membrane de sa pochette plastique et la mettre dans un petit bac

Faire 1 rinçage rapide avec du TBST, puis rincer avec du TBST 4X10mn sous agitation rapide à température ambiante

2^{ème} anticorps

Procéder de la même façon qu'avec le 1^{er} anticorps

Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

Lavage

Idem lavage ci-dessus

Révélation ECL

Sur un film Saran déposer 1mL d'ECL/ membrane complète

Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon, la poser sur l'ECL, protéines vers le bas en évitant la formation de bulles

Incuber 2 à 5min

Bien sécher la membrane entre deux papiers absorbants et la mettre dans une pochette plastique.

Déposer la membrane dans l'appareil de détection « fusion » et se référer aux instructions du fournisseur

Les mesures de densitométrie en Western Blot ont été faites grâce au logiciel ImageJ en faisant le rapport de l'intensité de la bande (aire sous la courbe) de la protéine d'intérêt sur la bande d de la protéine de référence.

Tableau 25 : Références et conditions d'utilisation des anticorps en Western blot

Anticorps	Fournisseur	Référence	Conditions d'utilisation de l'anticorps		Source
DMD	Abcam	ab15277	1/400	lait	rabbit
MYH1	Abcam	ab91506	1/200	BSA	rabbit
SIRT1 (H300)	Santa cruz	Sc-15404	1/700	BSA	rabbit
Beta-actine (13E)	Cell signaling	4970	1/1000	BSA	rabbit
TIA1 (C-20)	Santa cruz	Sc-1751	1/1000	Lait	rabbit
HNRNPL (A-11)	Santa cruz	Sc-46673	1/250	BSA	mouse
HuR	Millipore	07-468	1/1000	lait	rabbit
H3 total	Abcam	ab5103	1/5000	lait	rabbit
H3K4	Abcam	ab7766	1/500	lait	rabbit
H3K36	Abcam	ab9050	1/1000	lait	rabbit
Anti Rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch	711-035-152	1/10000	BSA ou Lait	rabbit
Anti Goat RP	Jackson ImmunoResearch	705-035-147	1/10000	BSA ou Lait	goat

Fiche 16 : Désybrisation douce des membranes

Produits utilisés

Glycine (reserve n°206) PM=75.1g/mol
Lauryl Sulfate (SDS) (reserve N°1020)
Tween20 (salle Western)

Tampon de deshybridation pour 1L:

Glycine	15g
SDS	1g
Tween20	10mL
Ajuster à pH 2.2	

Protocole :

- dans un bac rose, immerger votre membrane dans la solution de stripping.
- 10 minutes agitation lente
- jeter la solution de stripping et en remettre à nouveau
- 10 minutes agitation lente
- jeter la solution de stripping
- lavage 10 minutes PBS 1x
- lavage 10 minutes PBS 1x
- lavage 5 minutes TBST
- lavage 5 minutes TBST

- **Reprendre à l'étape de saturation du western** avant votre nouvel anticorps primaire !

Fiche 17 : Marquage des protéines par immunofluorescence

Fixation

10min PAF 4% (sous hotte)

Lavage 3x 5 min PBS 1x

Perméabilisation des membranes

10 min triton 0.1% PBS 1x

Lavage PBS 3x5 min

Blocage

BSA 10% PBS triton 0.01% 1h à Tamb

Anticorps Ir

Diluer les anticorps au 1/200 dans la BSA 10% PBS triton 0.01%

Incuber 1 nuit à 4°C en chambre humide sous agitation

Lavage PBS 3x5 min (possibilité de rajouter du Tween 20)

Jour 2 : Anticorps Iir (manip sensible à la lumière)

Diluer l'anticorps Iir au 1/1000 dans la BSA 10% PBS triton 0.01%

Incuber 1h à 2h à Tamb dans une chambre humide dans le noir

Lavages PBS 3x5min (possibilité de rajouter du Tween 20)

Coloration des noyaux

Diluer la solution de DAPI au 1/3000 dans H₂O MQ et Incuber 5min

Lavage PBS 3x5 min

Rincer à l'ED

Montage des lames

Conserver les lames à l'abri de la lumière

NB : PENSEZ AU TEMOINS NEGATIFS !!!

Témoins Ab Iir seuls (remplacer l'Ab Ir par de la BSA)

Témoins Autofluo (si possible mais pas obligatoire) remplacer l'Ab Ir et Iir par de la BSA

Tableau 26 : Listes des anticorps étudiés en immunofluorescence

Anticorps	Fournisseur	Référence	Conditions d'utilisation de l'anticorps		Source
DMD	Abcam	ab15277	1/200	BSA	rabbit
MYH1	Abcam	ab91506	1/200	BSA	rabbit
NEUN	Chemicon	MAB377	1/200	BSA	mouse
MAP2	Millipore	AB5622	1/200	BSA	rabbit
SYN1	Millipore	AB1543P	1/200	BSA	rabbit
Beta-tubuline isoforme 3 (TUJ1)	Merck millipore	MAB1637	1/200	BSA	mouse
TIA1 (C-20)	Santa cruz	Sc-1751	1/250	BSA	goat
TDP43	IGBMC	-	1/250	BSA	rabbit
HNRNPL (A-11)	Santa cruz	Sc-46673	1/250	BSA	mouse

HNRNPK [3C2]	Immunoquest	IQ213	1/250	BSA	mouse
FMRP1	IGBMC	-	1/250	BSA	mouse
SRSF3	Santa-cruz	Sc-13510	1/250	BSA	mouse
SRSF2	IGBMC	-	1/250	BSA	mouse
Anti Rabbit AlexaFluor 594	Abcam	ab150076	1/1000	BSA	rabbit
Anti-Mouse 488	Jackson ImmunoResearch	715-545-151	1/1000	BSA	mouse
Anti Goat 555	Abcam	ab150130	1/1000	BSA	Goat

Des lysats de cellules ont été préparés en utilisant un tampon de lyse/lavage d'immunoprécipitation (IP) constitué de Tris 0,025 M, NaCl 0,15 M, EDTA 0,001 M, 1% de NP-40, glycérol à 5%, pH 7,4. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 12 000 tr / min pendant 10 min. Les extraits protéiques ont été dosés en utilisant le kit de dosage BCA Assay et 500 µg de protéine totale a été incubée avec 5 µg d'anticorps purifié mono-diméthyle arginine (ab412) et le volume a été complété à 500ul avec du tampon de lyse/lavage d'IP. Le mélange a été incubée à 4 ° C toute la nuit avec rotation pour former le complexe immun.

Ensuite, le mélange protéine/anticorps a été ajouté à 50 µl de billes d'agarose en résine préalablement rincés 2 fois avec du tampon de lyse/lavage IP et incubé 2 heures à température ambiante (T°Amb) sous agitation lente.

Le complexe étant, à présent fixé sur les billes, nous avons lavé les billes de résine 4 fois avec 200 ul de tampon de lyse/lavage d'IP, puis avec 100 ul de solution saline (NaCl). Le complexe protéique a été décroché des billes par ajout d'un tampon d'élution additionné avec 5 ul de bleu de charge 5X. Le mélange a été chauffé à 100 ° C pendant 5 min puis analysé par WB.

Les mesures de densitométrie en Western Blot ont été faites grâce au logiciel ImageJ en faisant le rapport de l'intensité de la bande (aire sous la courbe) de la protéine d'intérêt sur la bande d de la protéine de référence.

Fiche 18 : Séquençage de l'ARN ou « RNA Sequencing » (RNA-Seq)

1. Préparation des bibliothèques pour le RNA-Seq

Après l'extraction de l'ARN (5µg) et la vérification de la qualité des ARN au bioanalyseur (RIN>8) nous procédons à la préparation des bibliothèques pour RNAseq

Elimination des ARNr

- Ajouter 40µL d'ARN dans un tube contenant 65µL billes magnétiques lavées, Vortexer pour 10 sec et laisser à température ambiante
- Mettre dans un thermocycleur à 50°C pour 5 min
- Mettre sur un portoir magnétique jusqu'à ce que le liquide redevienne clair Transférer le surnageant contenant ARN dans un nouveau tube de 1,5ml et mettre sur glace

Purification RNA (RNeasy MinElute Cleanup Kit)

- Ajouter eau RNase free jusqu'à qsp 100µL
- Ajouter 350µL tampon RLT
- Ajouter 550µL 96%-100% ethanol
- Ajouter la moitié du mix (~500µL) dans une colonne RNeasy MinElute placée dans un tube de collection de 2 ml
- Centrifuger à 8000g pour 15 sec Prendre le tube de collection
- Ajouter 500µL tampon RPE
- Centrifuger à 8000g pour 15 sec
- Prendre le tube de collection
- Ajouter 500 µL 80% ethanol sur la colonne Centrifuger 8000g pour 2 min
- Prendre la colonne et la mettre dans un nouveau tube de 2ml
- Centrifuger avec une vitesse maximale pour 5 min.
- Ajouter la colonne dans un nouveau tube de 1,5ml
- Ajouter de l'eau RNase free dans le milieu de la colonne et centrifuger pour 1 min

Etape 3: Préparation des bibliothèques pour ScriptSeq v2 RNA seq

Fragmentation de l'ARN

- Mélanger: Eau nuclease free, RNA traité avec du RiboZero, la Solution de fragmentation d'ARN et les Amorces cDNA
- Incuber dans un thermocycleur à 85°C pour 5min et Mettre sur la glace

Synthèse cDNA

- Mélanger : cDNA synthesis Premix, 100mM DTT et StarScript AMV reverse transcriptase
- Ajouter cDNA synthesis Master Mix
- Incuber à 25°C pour 5 min ensuite à 42°C pour 20min Mettre à 37°C
- Ajouter Finishing solution
- Incuber à 37°C pour 10min
- Incuber à 95°C pour 3min
- Mettre à 25°C

Synthèse 3'tagged ADN

- Mélanger: Terminal tagging premix, DNA polymerase
- Ajouter Terminal Tagging Master Mix
- Incuber pendant 15min à 25°C
- Incuber pendant 3 min à 95°C
- Laisser à 4°C

Purification cDNA

Choisir Agencourt AMPure purification. Eluer dans 225µL

Amplification par PCR

- Mélanger dans un tube de PCR : 25µl FailSafe PCR Premix E, 1µl Forward PCR primer, 1µl Reverse PCR primer, 22.5µl di-tagged cDNA et 0.5µl Failsafe PCR enzyme

Condition de PCR

Denaturation 95°C 1min

10-15 cycles :

95°C 30sec

55°C 30sec

68°C 3min

Incuber à 68°C pour 7min

Purification des librairies

- AMPure purification

2. Séquençage du transcriptome

Le séquençage à haut débit du transcriptome a été réalisé sur trois réplicats biologiques de chaque lignée cellulaire en utilisant le séquenceur Illumina TruSeq™. Les fragments d'ADN ont été lus sur des séquences de nucléotides de 100 paires de bases en configuration « extrémités appariées ». Les données brutes de séquençage ont ensuite été démultiplexées et compilées dans des fichiers FASTQ standard.

Fiche 19 : Analyses bio-informatiques du RNA-Seq

1. Contrôle qualité des ADNc

Le contrôle de la qualité des séquences de nucléotides a été effectué à l'aide de FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Les séquences et les ADNc de mauvaise qualité qui ont été contaminées par les adaptateurs ont été ajustées à l'aide de cutadapt 1.11 avec les paramètres « -a AGATCGGAAGAG -A AGATCGGAAGAG -m 30 --no-indels -O 5 ».

2. Alignement sur le génome de référence hg38

La cartographie des lectures résultantes a été réalisée par HISAT2 v2.0.4 - (Kim et al. 2015) sur une version du génome de référence hg38 qui prend en compte l'épissage des sites donneur et accepteur et du polymorphisme « normal » du SNP (https://cloud.biohpc.swmed.edu/index.php/s/grch38_snp/téléchargement).

Les isoformes épissées ont été assemblées à partir des transcriptions reconstruites, obtenues avec Stringtie v1.3.3b (Pertea et al. 2015), permettant ainsi l'identification de nouvelles isoformes en plus des transcriptions connues se chevauchant (d'au moins 80% de leur longueur) dans Ensembl. annotations officielles (Homo_sapiens.GRCh38.89.gtf).

3. Normalisation des données

Les données ont été normalisées à l'aide de la méthode de normalisation des moyennes ajustées (TMM) (Robinson and Oshlack 2010), puis transformées en logarithme en base 2 (\log_2 -) et en comptes par million (cpm-), en prenant en compte les meilleures pratiques d'étalonnage et d'estimation. expressions différentielles, telles que décrites précédemment (Law et al. 2014).

Le séquençage de l'ARN apparié des 24 échantillons a généré en moyenne 110,2 millions de séquences nucléotidiques par échantillon. Le taux d'alignement global était de 90,55% (écart-type +/- 1,86%), la qualité moyenne de la cartographie étant lue à 99,97% (score PHRED de 37,2) et la taille moyenne des insertions de 362,5 pb (écart-type +/- 621,4). Environ 10,94% (de 9,7% à 11,4%) des lectures sont mappées aux régions introniques. 55204 transcripts ont été reconstruits au cours de l'étape suivante, ce qui a conduit à un transcriptome de 50818 transcripts uniques et de 16808 gènes uniques après filtrage pour une très faible expression sur les 3 échantillons de contrôle (la valeur moyenne de cpm > 0,5 était considérée comme une preuve d'expression dans le groupe de contrôle).

4. Analyse statistique, gènes différentiellement exprimés (DEG) et annotations fonctionnelles

Les effets Batch entre les 3 replicats d'échantillons ont été corrigés à l'aide de la fonction ComBat disponible dans le package R limma (Ritchie et al. 2015). Une modélisation linéaire avec Bayes empirique a ensuite été appliquée pour évaluer l'expression différentielle au niveau du gène et du transcrit entre les lignées cellulaires de contrôle et chaque lignée cellulaire du patient. Les valeurs p d'expression différentielle ont été obtenues en utilisant un test t de Student modéré et ajustées pour le taux de découverte fausse (FDR) avec la procédure Benjamini-Hochberg. Les gènes exprimés différentiellement (DEG) ont été identifiés avec un FDR <0,05 et un facteur de variation (fold-change) (FC) supérieur à 1,5. L'analyse de l'ontologie des gènes pour les processus biologiques et les fonctions moléculaires significatifs (FDR <0,05) pour les DEG a été réalisée avec la base de données Panther. Les termes Go significatifs a été représentés dans les histogrammes et classés par enrichissement.

5. Validation expérimentale des données de RNA-Seq par RT-qPCR

L'ARN total est isolé du culot cellulaire des types 3 cblC, 4 cblG et 3 contrôles (WT). Nous avons utilisé des plaques personnalisées contenant 28 paires d'amorces lyophilisées, conçues et pré-validées par Biorad pour étudier l'expression des gènes par RT-qPCR. Deux gènes de référence (*AASDH* et *ALAS1*) ont été utilisés pour normaliser le niveau d'expression des gènes testés. Les niveaux d'expression génique ont été quantifiés en utilisant l'appareil StepOnePlus™ (ThermoFischer). Un test statistique de Student a été établi sur les données RT-qPCR. Les fold change ont été calculés en utilisant la méthode $2^{-\text{deltadelta}}$ (CT), transformés en logarithme base 2 et représentés sous forme d'histogramme. Une corrélation de Spearman (ρ) a été calculée pour établir une relation entre les données de RNA-Seq et celles de la RT-qPCR.

Les données du RNASeq ont également été validées par WB et IF pour les gènes *DMD* (ab15277 ; Abcam) et *MYH1* (ab91506 ; Abcam). Les conditions d'utilisation des anticorps en WB se trouvent dans le tableau de listes des anticorps étudiés en WB (Tableau 25).

6. Analyse de l'épissage alternatif et annotation fonctionnelle des gènes épissés différentiellement

Des échantillons en triple exemplaire de RNA-Seq ont également été utilisés pour effectuer une analyse multivariée de l'épissage du transcrit (rMATS) et évaluer les événements d'épissage différentiel entre la lignée cellulaire de contrôle et les groupes cblC ou cblG. Les fichiers BAM d'alignement ont été transmis à rMATS v4.0.2 (Shen et al. 2014). Les événements d'épissage alternatif (AS) correspondant aux cinq types de motifs AS de base ont été analysés: saut d'exon (SE), site épissé alternatif en 5' (A5SS), site épissé alternatif en 3' (A3SS), exon mutuellement exclusif (MXE) et rétention d'intron (RI). Pour chaque événement AS, nous avons utilisé le

mappage de lectures vers les jonctions d'épissure et le mappage de lectures sur le corps de l'exon en tant que sortie pour les fichiers rMATS (fichiers générés par JCEC). Les événements AS différentiels ont été considérés comme significatifs avec un FDR <1% et $|\Delta \text{PSI}| > 5\%$. Les annotations fonctionnelles de gènes significativement épissés de manière différentielle ont été réalisées à l'aide de la base de données Panther. Les processus biologiques et les fonctions moléculaires de ces gènes ont été représentés en histogramme et classés par enrichissement.

7. Validation expérimentale d'événements d'épissage alternatifs par RT-PCR

Nous avons sélectionné cinq gènes épissés différentiellement (*XIAP*, *MBD5*, *BMF*, *EEF1AKMT1* et *PRMT2*) pour valider les résultats du rMATS par RT-PCR. Les amorces PCR ont été conçues en utilisant le logiciel Primer-BLAST (V.3) de façon à les dessiner sur les exons encadrant l'exon épissé (Tableau 26). 1 µg d'ARN a été utilisé pour la rétro-transcription en ADNc. L'ARN a préalablement été dénaturé 5 minutes à 65°C. L'enzyme M-MLV a été utilisée pour la rétro-transcription. La réaction est réalisée dans le Thermo cycler (Bio Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler) 50 min à 37°C puis 15 minutes à 70°C. Les ADNc obtenus ont été mélangés aux réactifs de PCR contenant les amorces cibles et les tubes ont été placés dans le Thermo-cycler pour réaliser la PCR. Les produits PCR ont été générés en utilisant la méthode Touchdown pendant 30-40 cycles, ensuite ils ont été déposés sur gel d'agarose (1,5%) pour être analysés. Les bandes ont été quantifiées en utilisant le logiciel d'image Image J.

Méthode Touchdown :

Etapes	Température (°C)	Temps	
1 Dénaturation initiale	94	2 min	
2 Dénaturation	94	30 sec	
3 Hybridation	60	60 sec	(-1 °C) / cycle 10 X
4 Elongation	72	30 sec	retour à l'étape 2/10X
5 Dénaturation	95	30 sec	
6 Hybridation	50	30 sec	
7 Elongation	72	30 sec	retour à l'étape 6/X
8 Elongation	72	4 min	
9 Maintien	12	infini	

Tableau 27 : Liste des amorces utilisés pour la validation des évènements d'épissage alternatif identifiés par l'analyse rMATS

Gènes	XIAP	MBD5	BMF	EEF1AKMT1	PRMT2
Transcrits	XIAP-202	MBD5-202	BMF-202	<i>EEF1AKMT1</i> -201	PRMT2-203
Type d'évènement	SE	A5SS	SE	SE	SE
exon épissés	2	12	3	3	2
Taille de l'exon (pb)	909	1094	161	81	109
Taille du transcrit (pb)	1095	1664	381	469	395
Taille du transcrit épissé (pb)	186	570	220	388	286
Amorce_sens	GGAGTT GGCATT TCCAGA TT	ATAACCC CATGGCT TGTCTG	CTCAGCC GACTTCA GCTCTT	TCTTGCTGC AGAGTTTCG AG	CTCAGG CTCCTGG AAAGGA C
Amorce_anti-sens	TTGTTCC CAAGGG TCTTCAC	GATTGGC TTTTCCA GCATTC	AAGGTTG TGCAGGA AGAGGA	CCACTGCCA AGCTCTAG GAC	AACTGA GCTGGG TCTCATC G

8. Analyse d'enrichissement de motifs et identification des protéines de liaison à l'ARN (RBP)

Les résultats rMATS ont été téléchargés sur le portail en ligne rMAPS (<http://rmaps.cecsresearch.org/MTool/>) et l'outil Carte de motifs a été utilisé pour tester les enrichissements en motifs d'ARN communs dans les régions d'épissage voisines, selon les 5 évènements AS considérés. Les paramètres par défaut ont été utilisés en dehors du seuil FDR pour les résultats rMATS qui a été abaissé à 1% (paramètre qui n'est pas proposé directement par rMAPS) ; vous devez plutôt modifier les sorties rMATS pour que toutes les valeurs comprises entre 0,05 et 0,01 soient considérées comme des valeurs d'arrière-plan.). Des seuils ont été appliqués aux sorties p-value et zcore rMAPS pour évaluer la signification statistique des motifs de consensus sur-représentés et sous-représentés (motifs de reconnaissance RBP ; valeur p <1e-3 et zscore> évalué égal à 2 fois). À partir de la base de données d'expériences Starbase V3 Clip-Seq, nous avons compilé des listes de cibles RBP pour tous les RBP disponibles, avec une rigueur dau moins 3 si possible. Nous avons uniquement considéré les

cibles qui sont des ARNm avec une protéine codant comme biotype Ensembl (gènes 20244). Pour chaque RBP, l'enrichissement des cibles RBP a été calculé comme suit : % observé de cibles RBP (nombre de cibles dans l'événement AS significatif) /% attendu de la cible (nombre total de cibles RBP / d'ARNm totaux). La liste complète des motifs de reconnaissance des RBP significative est disponible dans l'annexe 3.

9. Localisation cellulaire des RBP

Les cellules ont étéensemencées à raison de 50000 cellules par puit sur des plaques de 12 puits puis incubées 24h à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Ensuite le tapis cellulaire a été rincées 2 fois avec du PBS 1X et l'étude de la localisation cellulaire des RBP a été réalisée en appliquant le protocole de marquage cellulaire de la fiche 17.

10. Modifications post-traductionnelles des RBP

Les protéines totales ont été extraites des culots cellulaires en utilisant le tampon d'extraction NaCl vu précédemment. L'étude des modifications a été effectuée par co-immunoprécipitation de TIA1 (Fiche 18).

Fiche 20 : Analyse protéomique

1. Les protéines totales ont été extraites du culot cellulaire en utilisant le tampon de lyse RIPA.
2. La suspension protéique a été placée dans un bain ultrason pendant 30 min suivi de trois cycles de congélation-décongélation avec de l'azote liquide et un bain marie à 37°C.
3. Les tubes ont été soumis à centrifugation à 20 000g/30 min/4°C
4. Le surnageant protéique a été récupéré puis dosés avec le kit BCA Assay pour l'identification des protéines différentiellement exprimées.

Les extraits protéiques ont été analysés en utilisant un Tribrid de fusion Orbitrap équipé d'une source d'ions nanoélectrospray EASY-Spray et couplé à un système Easy nano-LC Proxeon 1000 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA).

La séparation chromatographique des peptides a été réalisée avec les paramètres suivants: pré-colonne Acclaim PepMap100 C18 (2 cm, 75 µm id, 3 µm, 100 Å), colonne Pepmap-RSLC Proxeon C18 (50 cm, 75 µm id, 2 µm, 100 Å), débit 300 nl / min, gradient passant de 95% de solvant A (eau, 0,1% d'acide formique) à 35% de solvant B (100% acétonitrile, 0,1% d'acide formique) en 120 minutes, suivi d'une régénération de la colonne pendant 50 minutes.

Les peptides ont été analysés dans la cellule Orbitrap, en mode de balayage ionique complet, à une résolution de 120 000 (à m / z 200), avec une plage de masse de m / z 350-1550 et une cible AGC de 4x10⁵. Les fragments ont été obtenus par activation d'une dissociation de pièges C (HCD) à énergie plus élevée avec une énergie de collision de 30% et une fenêtre d'isolation quadripolaire de 1,6 Da. Les données MS / MS ont été acquises dans le piège à ions linéaire en mode vitesse maximale, avec un cycle total de 3 secondes avec une cible AGC de 1x10⁴. Les temps maximaux d'accumulation d'ions ont été définis à 100 ms pour l'acquisition MS et à 35 ms pour l'acquisition MS / MS en mode de parallélisation. Toutes les données MS / MS ont été traitées avec un serveur de recherche interne Mascot (Matrix Science, Boston, MA; version 2.4.1) utilisant Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). La tolérance de masse a été fixée à 6 ppm pour les ions précurseurs et à 0,5 Da pour les fragments. Le nombre maximal de clivages manqués par la trypsine a été limité à deux pour toutes les protéases utilisées. Les données MS/MS ont été recherchées dans la base de données UniProtKB RefSeq Homo sapiens.

Analyse quantitative dans des expériences sans étiquette

Pour les analyses protéomiques quantitatives, les données des expériences protéomiques sont les résultats de trois échantillons indépendants. Les extraits cellulaires ont été préparés comme décrit ci-dessus et la teneur en protéines des échantillons a été mesurée afin de quantifier la quantité de protéines à précipiter avec de l'acétone. Quatre fois le volume d'acétone refroidi (-20 ° C) ont été ajoutés à un volume d'échantillon contenant 50 µg d'extraits de protéines. Les tubes vortexés ont été incubés pendant 60 minutes à -20 ° C puis centrifugés pendant 10 minutes à 13 000-15 000 x g. Le culot de protéines a été chauffé pendant 20 minutes à 95 ° C, puis refroidi sur de la glace pendant 20 minutes avant d'effectuer en trois exemplaires une digestion pendant une nuit à 37 ° C par séquençage de trypsine (12,5 µg/ml ; Promega, Madison, WI, USA) dans 30 µl de NH₄HCO₃ à 25 mmol / L. Acquisition LC-MS / MS avec un gradient de 2 heures. La quantification sans étiquette entre les sujets a été réalisée sur des données brutes avec le logiciel Progenesis-Qi 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, Royaume-Uni) en utilisant la procédure suivante : (i) alignement des chromatogrammes, (ii) normalisation de l'abondance des peptides, (iii) des statistiques analyses des caractéristiques et (iv) identification des peptides à l'aide du serveur Mascot via Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). Une recherche de leurre a été effectuée et le seuil de signification a été fixé à 0,01. Les fichiers résultants ont été importés dans le logiciel Progenesis-LC. Les abondances normalisées de protéines issues de produits de digestion à la trypsine présentant des variations d'abondance normalisées similaires (valeur ANOVA p <0,05) ont été classifiées ensemble par le système de classification AutoClass Bayesian et visualisées avec Javatreview (<http://jtreeview.sourceforge.net/>).

Fiche 21 : Analyse bio-informatique des données du protéome

1. Normalisation et correction des données

Les données brutes ont été normalisées par la méthode VMR-ratio. Cette méthode consiste à diviser les profils d'expression de chaque protéine par la moyenne de toutes les valeurs d'expression existantes pour cette protéine.

2. Analyse statistique, identification des protéines différentiellement exprimées (DEP) et annotation fonctionnelle

Les protéines différentiellement exprimées (DEP) ont été identifiées en appliquant une valeur seuil de la p-value à 0,05 sur l'ensemble des protéines normalisées précédemment. Le niveau d'expression protéique est considéré comme significatif lorsque la p-value est inférieure à 0,05.

La liste des DEP significatif a été soumise au logiciel a été soumise au logiciel permitmatrix pour représenter les heatmap caractéristiques des niveaux d'expressions des DEP en fonction des lignées cellulaires étudiées.

Cette liste de protéines sur ou sous-exprimées dans les lignées cblC et cblG par rapport au contrôle a également été analysée à la base de données STRING pour établir non seulement, des associations fonctionnelles de ces DEP mais également établir des réseaux d'interactions protéine-protéine de ces DEP.

Fiche 22 : Bisulfitation de l'ADN génomique

Un échantillon de 1 µg d'ADN est bisulfité en utilisant le kit de Zymo research :

- Ajouter 5 µl de M-Dilution Buffer à l'échantillon d'ADN et ajuster le volume total à 50 µl avec de l'eau. Mélangez l'échantillon en faisant des aspirations -refoulement.
- Incuber l'échantillon à 37 ° C pendant 15 minutes.
- Après l'incubation, ajouter 100 µl du réactif de conversion CT préparé à chaque échantillon et mélanger.
- Incuber l'échantillon dans l'obscurité à 50 ° C pendant 12 à 16 heures.
- Incuber l'échantillon à 0-4 ° C pendant 10 minutes.
- Ajoutez 400 µl de M-Binding Buffer à une colonne IC Zymo-Spin TM et placez la colonne dans un tube de collecte fourni.
- Chargez l'échantillon dans la colonne IC Zymo-Spin TM contenant le tampon de liaison M. Fermez le capuchon et mélangez en inversant la colonne plusieurs fois.
- Centrifuger à pleine vitesse ($\geq 10,000 \times g$) pendant 30 secondes. Jeter l'écoulement.
- Ajouter 100 µl de M-Wash Buffer à la colonne. Centrifugez à pleine vitesse pendant 30 secondes.
- Ajouter 200 µl de M-Desulfonation Buffer dans la colonne et laisser reposer à température ambiante (20 à 30 ° C) pendant 15 à 20 minutes. Après l'incubation, centrifuger à pleine vitesse pendant 30 secondes.
- Ajouter 200 µl de M-Wash Buffer à la colonne. Centrifugez à pleine vitesse pendant 30 secondes. Ajouter un autre 200 µl de M-Wash Buffer et centrifuger pendant 30 secondes supplémentaires.
- Placez la colonne dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml. Ajouter 10 µl de M-Elution Buffer directement dans la matrice de la colonne. Centrifugez pendant 30 secondes à pleine vitesse pour éluer l'ADN.

600 ng d'ADN bisulfuté est déposé sur la puce 450K Human Methylation Illumina et le séquençage a été fait en utilisant l'appareil MiSeq. L'experimentation a été faite suivant le protocole du fabricant.

Fiche 23 : Méthylome

Préparation de l'ADN et traitement bisulfite

L'ADN a été isolé des fibroblastes de 3 lignées cblC, 4 lignées cblG et 3 lignées cobntrôles en utilisant le kit Mini All Prep DNA/RNA/Protéine (Qiagen). 1 ug d'ADN génomique a été bisulfité à l'aide du kit EZ-96 DNA Methylation en utilisant le protocole du fabricant afin de convertir les cytosines non méthylés en uracile.

Amplification d'ADN génomique complet

L'ADN traité au bisulfite est soumis à une amplification du génome entier en utilisant des amorces hexamères aléatoires et de l'ADN polymérase Phi29 qui a une activité de relecture entraînant des taux d'erreur 100 fois inférieurs à ceux de la Taq polymérase. Les produits sont ensuite fragmentés par voie enzymatique, purifiés par utilisation des dNTP, des amorces et des enzymes avant d'être déposés à la puce Infinium HumanMethylation450 (Illumina).

Hybridation et élongation

Sur la puce, il existe deux types de billes pour chaque site CpG par locus. Chaque locus testé est différencié par différents types de billes. Il existe plus de 200 000 types de billes disponibles. Chacun de ces types de billes est attaché à un oligonucléotide d'ADN mères monocaténaire dont la séquence ne diffère que par l'extrémité libre ; ce type de sonde est connu sous le nom d'oligonucléotide spécifique d'un allèle. L'un des types de billes correspondra au locus de la cytosine méthylée et l'autre au locus de la cytosine non méthylée, qui a été converti en uracile au cours du traitement au bisulfite et ultérieurement amplifié en tant que thymine au cours de l'amplification du génome entier.

Les produits d'ADN amplifié sont dénaturés en simples brins et hybridés sur la puce par reconnaissance spécifique d'un allèle contenant une sonde de méthylation ou une sonde de non-méthylation. L'hybridation est suivie d'une élongation d'une base avec des didésoxynucléotides marqués à l'haptène. Le ddCTP est marqué à la biotine tandis que ddATP, ddUTP et ddGTP sont marqués au 2,4-dinitrophénol (DNP).

Coloration par fluorescence et scan/lecture de la puce

Après l'incorporation de ces ddNTP marqués à l'haptène, des dosages immunohistochimiques multicouches sont réalisés par des cycles répétés de coloration avec une combinaison

d'anticorps afin de différencier les deux types de d'ADN méthylés (ADNm) ou non méthylés (ADNm). Après la coloration, la puce est balayée pour montrer les intensités des types de billes non méthylées et méthylées. Les données brutes sont analysées par le logiciel du fabricant et les rapports d'intensité de fluorescence entre les deux types de billes sont calculés. Un rapport de 0 est égal à la non-méthylation du locus ; un rapport de 1 est égal à la méthylation totale ; une valeur de 0,5 signifie qu'une copie est méthylée et l'autre non, dans le génome humain diploïde.

Identification des cytosines méthylés

L'ADNm a été mesuré sur 435 787 sites (93 830 annotées dans les promoteurs connus) en utilisant le tableau HumanMethylation450 (HM450 ; Illumina) conformément au protocole du fabricant.

Le niveau d'expression de l'ADNm sur un site était exprimé en valeur β , le rapport du signal d'une sonde méthylée par rapport à la somme des sondes méthylées et non méthylées.

Prétraitement et filtrage des données

Les analyses des données ont été effectuées à l'aide du logiciel R (www.r-project.org). Les données de sondes sur les chromosomes X et Y, de sondes trop proches de sites de polymorphisme SNP ont été filtrées à partir du jeu de données.

Fiche 24 : Analyses bio-informatiques du méthylome

A. Analyse du profil global de méthylation de l'ADN

1. Normalisation des données

Les données brutes correspondant aux canaux méthylés/non méthylés ont été extraites des fichiers idat Illumina, normalisées selon la procédure SWAN (subset within array normalization) (Maksimovic et al. 2012) et transformées en B-values (valeurs bêta de méthylation représentant une réalité biologique sous forme de pourcentage de cellules méthylées pour une sonde donnée, variant de 0 pour une absence de méthylation à 1 si la sonde est méthylée sur toutes les cellules étudiées) en utilisant le package R minfi (Aryee et al. 2014). Ces B-values ont été utilisées pour l'interprétation directe et la représentation graphique, tandis que les M-values (représentation plus proche de la réalité mathématique, centrée sur 0) ont été utilisées pour les statistiques et les calculs. Les sondes ont ensuite été filtrées en fonction de leurs positions relatives à partir de SNP connus (ce qui biaise la mesure de méthylation). Pour ce faire, la fonction `rmSNPandCH` du programme R `DMRcate` a été utilisée, avec comme paramètres principaux : `dist = 3`, `mafcut = 0.05`, `rmcrosshyb = TRUE`. Sur les 485 512 sondes non filtrées de la puce Illumina Infinium 450k de départ, 435 786 sondes ont été validées pour la suite des analyses.

Pour chaque sonde, la méthylation différentielle et sa significativité statistique ont été évaluées par des méthodes bayésiennes empiriques après modélisation linéaire des groupes d'échantillons. Ces méthodes sont fournies par le package R `limma` (Ritchie et al. 2015).

2. Analyses statistiques

Les p-values ont été ajustées selon la procédure de Benjamini-Hochberg pour quantifier le taux de faux positifs (FDR). Des analyses ont également été faites pour rechercher les régions différentiellement méthylées (DMR pour differentially methylated regions). Ceci a été accompli à l'aide du package R `DMRcate` (Ritchie et al., 2015), avec les paramètres : `lambda = 1000` et `C = 2`. Le seuil FDR pour qu'une sonde donnée puisse appartenir à une DMR a été fixée à 0,05.

3. Annotation des régions différentiellement méthylés (DMR)

Les données de méthylome ont été analysées à l'aide des annotations disponibles pour la plateforme Illumina Infinium 450k. Celles-ci s'appuient fortement sur l'assemblage hg19 du

génomique humaine. Puisque plusieurs outils comme minfi et DMRcate utilisent toujours ce type de plateforme par défaut, les annotations résultantes ont été transformées selon les positions génomiques de la version hg38. Le « package » R biomaRt (Drost and Paszkowski 2017) a été utilisé quand les symboles des gènes ou quand les positions génomiques devaient être convertis de façon appropriée pour pouvoir utiliser spécifiquement un programme ou pour accomplir l'intégration des données du méthylome et du transcriptome

B. Comparaison du profil de méthylation des fibroblastes cblC et cblG avec des contrôles externes

Compte-tenu du profil global de méthylation des groupes cblC et cblG, nous avons comparé le profil de méthylation des 8 échantillons cblC/cblG avec celui des 62 échantillons contrôles en utilisant un t-test avec ajustement aux tests multiples par les corrections de Bonferroni et de Benjamini-Hochberg (également appelée, false discovery rate). Afin d'optimiser la puissance de l'analyse, compte-tenu du faible effectif dans le groupe cblC/cblG, nous avons ciblé un set de 271 loci différentiellement exprimés dans l'analyse du transcriptome, ce qui correspond à 4062 sondes CpG. Compte-tenu du profil de Co-méthylation des sondes CpG, nous avons optimisé le ratio signal/bruit de fond en utilisant une méthode de smoothing tel que rapporté précédemment (Gueant et al. 2018).

Fiche 25 : Méthylation des protéines histones

La méthylation des protéines histones a été réalisée en immunoprécipitant l'anticorps mono-diméthyl arginine (ab412) suivis de l'analyse de l'interaction protéique entre l'anticorps anti-mono diméthyl-arginine et les anticorps H3K4 (ab7766 ; Abcam) et H3K36 (ab9050 ; Abcam) par western blot (WB). Les membranes contenant les protéines H3K4 et H3K36 ont subi une déshybridation douce pour rompre les interactions entre l'anticorps méthyle et les protéines histones, ensuite les membranes ont été incubées avec l'anticorps H3 total (ab5103 ; Abcam) une nuit à 4°C suivi de l'incubation avec l'anticorps secondaire 1h à température ambiante.

Fiche 26 : Quantification de la méthylation de l'ARN m6A

1. Préparation de l'ARN totale

- Préparer 50 µg d'ARN totale et ajuster à 12 µl avec une solution à 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.
- Chauffer les échantillons à 65°C pendant 2 min pour dénouer les structures secondaires.
- Placer les échantillons immédiatement sur glace.

2. Préparation des solutions et du tampon

- 1X Washing Buffer (**WB**): 14 ml WB + 126 ml d'eau distillée
- Capture Antibody (**CA**) (50 ul/puit): 3 uL **CA** + 3000 uL **WB**
- Detection Antibody (**DA**) (50 ul/puit): 1,5 uL **DA** + 3000 uL **WB**
- Enhancer solution (**ES**) (50 ul/puit) : 0,6 uL **ES** + 3000 uL **WB**
- Positive control (**PC**) à 0,5ng/ul : 4 ul PC + 12 ul 1X **TE**
- Préparation de la gamme :

Numéro de Tubes	Volume PC à 0,5 ng/µl (µl)	Volume 1X TE (µl)	Concentration (ng/µl)
1	1	49	0,01
2	1	24	0,02
3	1	9	0,05
4	1,5	6	0,1
5	3	4,5	0,2
6	6,5	0	0,5

- Mettre toutes les solutions sur glace en attendant leur utilisation

3. Liaison de l'ARN

- Ajouter 80 ul de Binding solution (BS) dans chaque puit
- Ajouter en triplicates : 2 ul de NC, 2 ul de chaque PC dilués et 4 ul d'échantillons d'ARN total à doser (Déposer sur la solution BS et rincer le cône 2 fois). Mélanger la solution en inclinant doucement d'un côté puis de l'autre ou en agitant la plaque plusieurs fois. Assurez-vous que la solution recouvre le fond du puits de manière uniforme
- Recouvrir la plaque avec un parafilm et incuber à 37°C, 90 min
- Enlever la solution BS et laver 3 fois avec 150 ul de **WB**

4. Capture de l'ARNm

- Ajouter 50ul de CA, couvrir avec du papier film et incuber à T°Amb pendant 60 min
- Laver 3 fois avec 150 ul de **WB**
- Ajouter 50ul de DA, couvrir avec du papier film et incuber à T°Amb pendant 30 min
- Laver 4 fois avec 150 ul de **WB**
- Ajouter 50ul de **ES**, couvrir avec du papier film et incuber à T°Amb pendant 30 min
- Laver 5 fois avec 150 ul de **WB**

5. Détection du signal

- Ajouter 100ul de **DS** et incuber à T°Amb pendant 1-10min à l'abri de la lumière (commencer le monitoring, la solution DS doit changer en bleu en présence de m6A
- Ajouter 100ul de **SS** pour stopper la réaction enzymatique et incuber à T°Amb pendant 1-10min la solution doit changer en jaune. L'absorbance doit être lue à 450nm dans les 2-15min.

Fiche 27 : Évaluation du stress cellulaire par mesure des paramètres de la respiration mitochondriale

L'étude de la respiration mitochondriale des fibroblastes de patients cblC et cblG a été réalisée en utilisant l'analyseur Seahorse XFp (Agilent) et l'évaluation du stress mitochondrial par utilisation du test cell Mito stress (Agilent).

A. Ensemencement de cellules adhérentes dans les Mini plaques de culture cellulaire Agilent Seahorse XFp

1. Retirer un paquet de mini plaque de la boîte bleue. Retirer le film du paquet.
2. Remplir chaque chambre du fossé avec 400 μ L d'eau stérile (total 3200 μ L).
3. 180 μ L de milieu de croissance (pas de cellules) dans les puits A et H. Ce sont des puits de correction de fond.
4. Déterminer la concentration cellulaire souhaitée.

Le nombre de cellules peut varier considérablement mais se situe généralement entre 5×10^3 et 4×10^4 cellules par puits. Les cellules sontensemencées dans 180 μ L de milieu de croissance.

5. Recolter les cellules en utilisant les procédures standards. Resuspendre les cellules dans 5 ml de milieu de croissance, comptez, puis diluer à la concentration désirée. Pour les fibroblastes : ensemencement à 12500 cellules/180 μ L (83333 cellules/ml).
6. Homogénéiser et distribuer 180 μ L de la suspension cellulaire aux puits B-G.
7. Incuber les cellules toute la nuit à 37°C, 5% CO₂

B. Hydratation des cartouches Agilent Seahorse XFp Sensor

Matériels

Agilent Seahorse XFp FluxPak containing :

1. Extracellular Flux Cartridges box:
 - a) Sensor cartridge (12x)
 - b) Utility plate (12x)
 - c) Cartridge lid (12x)
2. Cell Culture Miniplates box :
 - a) Agilent Seahorse XFp Miniplate with lid (12x)
3. Agilent Seahorse XF Calibrant (100 mL)

Additional items required (not included):

1. 200 μ L Multi Channel pipette
2. 10 mL Conical tubes
3. Cell culture grade sterile water
4. Non-CO2 incubator at 37 °C
5. Glucose 1M (solution mère à 450g/l (2.49 M)) : dilution dans de l'eau stérile (2 ml d-glucose+3 ml H2O)
6. Pyruvate 100mM
7. L-Glutamine 200mM

Protocole

Jour avant le dosage :

1. Retirer un paquet de la boîte des cartouches de flux extracellulaires. Retirer le film d'étanchéité de la ou des cartouches qui seront utilisée(s).
2. Séparer la plaque (blanc) de la cartouche de capteur Seahorse Agilent (vert). Placer la cartouche du capteur à l'envers sur le plan de travail.
3. Remplir chaque puit de la plaque avec 200 μ L de calibrant
4. Remplir les fossés autour des puits avec 400 μ L de calibrant
5. Remettre la cartouche de capteur XFp (vert) sur la plaque (blanc) contenant du calibrant
6. Placer l'assemblage cartouche/plaque dans un incubateur sans CO2 à 37°C toute la nuit.

C. Lavage des cellules adhérentes dans des mini plaques de culture de cellules Agilent Seahorse XFp

1. Pour une plaque XFp : préparer 10 ml de milieu de dosage : 9.7ml de milieu de dosage + 100 μ l de glucose (1M), 100 μ l de pyruvate (100 mM) et 100 μ l de L-glutamine (200mM). Chauffer au bain marie le milieu de dosage à 37°C et ajuster le PH à 7.4 ± 0.1 avec du NaOH 0.1 N. Filtrer le milieu de dosage avec un filtre 0.2 μ M → garder le milieu à 37°C avant utilisation.
2. Retirer la mini plaque XFp Cell Culture de l'incubateur à 37°C
3. Observer les cellules sous microscope et vérifier l'adhérence, la morphologie, la pureté (contamination), l'apparence (monocouche), l'uniformité des cellules et vérifier l'absence de cellules dans les puits A et H.
4. Laver les cellules avec le milieu de dosage :
 - a. Retirer tout le milieu mais laisser 20 μ L dans chaque puit. Ce volume sert à éviter de dessécher complètement les cellules.

- b. Rincer 2 fois avec 160 μL de milieu de dosage en laissant à chaque fois 20 μL dans le puit.
- c. Ajouter 160 μL de milieu de dosage pour avoir un volume final de 180 μL /puit.
- d. Visualiser les cellules sous microscope pour voir si elles ne se sont pas décollées.
- e. Placer la mini plaque dans l'incubateur à 37°C sans CO₂ pendant 1h avant le dosage.

D. Préparation des solutions stocks et chargements des composants dans la cartouche

Important : utiliser les composés reconstitués le jour même. Ne pas recongeler et Jeter tout le reste. Le kit de test de stress Seahorse XF Cell Mito comprend six feuilles de sachets contenant chacun trois tubes de :

- Oligomycine (bouchon bleu)
- FCCP (bouchon jaune)
- Roténone / antimycine A (bouchon rouge)

Les réactifs du kit sont suffisants pour six cellules Seahorse XF complètes.

1. Retirer un sachet et laisser les composés se réchauffer à température ambiante dans le sachet scellé pendant environ 15 minutes.
2. Ouvrez un sachet en aluminium et retirez les trois tubes contenant l'oligomycine (bouchon bleu), FCCP (bouchon jaune) et roténone/antimycine A (bouchon rouge).
3. Placer les tubes dans un portoir.
4. À l'aide d'une pipette p1000, remettez en suspension le contenu de chaque tube avec le milieu de dosage chauffé et équilibré à pH7.4± 0.1 (volumes décrits dans le tableau ci-dessous).
5. Pipetez doucement en faisant des aspirations-refoulements (~ 10 fois) pour solubiliser les composés.
6. Préparer les dilutions des composants à la concentration indiquée dans le tableau ci-dessous (ajouter le volume indiqué) :

Compound	Volume of assay medium	Final concentration
Oligomycin	252 μL	50 μM
FCCP	288 μL	50 μM
Rotenone/antimycin A	216 μL	25 μM

7. Bien homogénéiser et charger les puits avec les volumes indiqués dans le tableau ci-dessous :

1. Préparer les dilutions des composants à la concentration désirée

Port designation	[Final Well] (μM)	Stock volume (μL)	Media volume (μL)	10X [Port] (μM)	Add to port volume (μL)
Port A Oligomycin	1.0	60	240	10	20
Port B FCCP	0.125	7.5	292.5	1.25	22
	0.25	15	285	2.5	22
	0.5	30	270	5	22
	1.0	60	240	10	22
	2.0	120	180	20	22
Port C Rotenone/ antimycin A	0.5	60	240	5	25

8. Tapoter pour enlever les bulles d'air, enlever le couvercle et procéder au dosage grâce à l'appareil « Agilent Seahorse XFp » en suivant les instructions préconisées par le fournisseur.
9. Extraire les protéines avec le tampon NaCl (25 μL), gratter avec le cône et incubé 30 min sur glace puis doser au BCA assay. Le nombre de cellules encimencées ou la quantité protéique peut servir à la normalisation des résultats.

Fiche 28 : Coloration des cellules par le dihydroéthidium

(Marqueur des ROS cellulaires)

Marquage de cellules vivantes

Une fois internalisée, le dihydroéthidium (DHE) ou hydroéthidine est déshydrogénée en éthidium, qui s'intercale ensuite sur l'ADN. Le bromure d'éthidium marque sélectivement les cellules mortes avec une fluorescence rouge.

Le dihydroéthidium colore le cytoplasme des cellules vivantes en bleue (370nm/émission 420nm) et la chromatine (noyau) des cellules vivantes en rouge (535nm/610nm) en 30-40 min

Solution stock à préparer à 10mM (ajouter 317 µl de DMSO et mélanger par aspiration-refoulement).

Dilution du DHE dans PBS 1X (solution de travail à 10µM) :

1. Cultiver les cellules dans des lamelles avec du milieu DMEM complet et les incuber une nuit à 37°C
2. Ajouter le DHE à une concentration finale de 10 µg/ml (10uM) dilué dans du PBS 1X
3. Fixation pas possible

Laisser incuber 30 min et lire au microscope confocale

Fiche 29 : Analyses statistiques des données

Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test T de Student et les résultats dont la valeur du p est inférieure à 0,05 sont considérés comme significatifs. Les valeurs représentées dans les histogrammes représentent les moyennes+ /- écartype de 3 expériences indépendantes.

Annexes

Annexe 1 : Liste complète des DEG identifiés par l'analyse RNA-Seq

Gene-cblC	Log2(FC)	p-value	FDR	Gene-cblG	Log2 FC	p-value	FDR
<i>APOC1</i>	5,18	1,37E-04	2,05E-02	<i>APCDD1</i>	7,17	3,16E-05	7,94E-03
<i>FAM213A</i>	4,49	2,95E-04	3,23E-02	<i>THBS4</i>	6,89	1,68E-04	2,18E-02
<i>PPARG</i>	4,1	1,90E-07	2,28E-04	<i>DUSP4</i>	5,05	2,03E-07	1,55E-04
<i>DUSP4</i>	4,08	8,53E-06	3,26E-03	<i>SELENOP</i>	4,88	4,90E-05	1,07E-02
<i>DCN</i>	4,01	1,04E-06	7,93E-04	<i>SAMD5</i>	4,82	1,59E-08	2,22E-05
<i>MLPH</i>	3,86	2,01E-04	2,59E-02	<i>FAM213A</i>	4,61	1,09E-05	3,73E-03
<i>COL6A6</i>	3,85	1,53E-04	2,16E-02	<i>PPARG</i>	4,47	6,53E-09	9,98E-06
<i>TRPV2</i>	3,7	7,18E-05	1,37E-02	<i>SALL1</i>	4,15	2,13E-08	2,56E-05
<i>CDON</i>	3,62	1,57E-04	2,16E-02	<i>RAB27B</i>	4,05	4,07E-04	3,89E-02
<i>RCAN2</i>	3,56	3,26E-04	3,37E-02	<i>ABCB4</i>	3,92	7,07E-05	1,29E-02
<i>SAMD5</i>	3,54	5,57E-06	2,55E-03	<i>FAM19A2</i>	3,91	3,89E-07	2,52E-04
<i>LYNX1</i>	3,45	1,01E-05	3,45E-03	<i>DAPK1</i>	3,87	1,00E-07	9,37E-05
<i>TMEM35A</i>	3,44	1,18E-06	8,24E-04	<i>TRPV2</i>	3,82	2,91E-04	3,13E-02
<i>DAPK1</i>	3,39	5,62E-06	2,55E-03	<i>MLPH</i>	3,79	9,30E-05	1,59E-02
<i>SALL1</i>	3,19	2,65E-06	1,44E-03	<i>OAS2</i>	3,78	6,47E-05	1,23E-02

<i>SBSN</i>	3,05	5,10E-04	4,31E-02	<i>DCN</i>	3,74	5,99E-07	3,59E-04
<i>LUM</i>	3,04	4,15E-11	1,50E-07	<i>SLC7A14</i>	3,71	3,11E-05	7,93E-03
<i>KCNJ2</i>	2,97	4,06E-04	3,84E-02	<i>TMEM35A</i>	3,67	3,07E-07	2,07E-04
<i>CAMK1D</i>	2,91	6,50E-05	1,27E-02	<i>SIPAIL2</i>	3,64	4,57E-04	4,07E-02
<i>IL16</i>	2,89	6,69E-07	5,35E-04	<i>CIQTNF1</i>	3,59	5,17E-04	4,40E-02
<i>SNHG5</i>	2,83	6,41E-07	5,35E-04	<i>CDON</i>	3,49	3,91E-05	9,25E-03
<i>TNFRSF21</i>	2,8	4,50E-07	4,45E-04	<i>CCDC102B</i>	3,4	5,13E-04	4,40E-02
<i>FAM20A</i>	2,63	2,46E-04	2,99E-02	<i>PRSS35</i>	3,37	7,04E-05	1,29E-02
<i>TRIM61</i>	2,56	3,04E-09	6,38E-06	<i>COL6A6</i>	3,35	1,23E-04	1,93E-02
<i>CDHR3</i>	2,5	3,21E-05	8,42E-03	<i>INHBB</i>	3,22	6,22E-04	4,95E-02
<i>HUNK</i>	2,45	2,72E-04	3,11E-02	<i>GPRC5B</i>	3,08	3,76E-04	3,70E-02
<i>ADCY4</i>	2,39	5,51E-07	4,88E-04	<i>LYNX1</i>	3,07	3,43E-05	8,47E-03
<i>FAM19A2</i>	2,36	5,35E-04	4,45E-02	<i>RCAN2</i>	2,98	2,67E-04	2,95E-02
<i>CIPC</i>	2,36	6,18E-04	4,90E-02	<i>FAM84A</i>	2,88	3,36E-04	3,44E-02
<i>TP53I11</i>	2,26	6,74E-05	1,30E-02	<i>KCNJ2</i>	2,68	2,32E-04	2,70E-02
<i>ADRA2A</i>	2,23	2,71E-04	3,11E-02	<i>LUM</i>	2,66	3,09E-10	6,50E-07
<i>PLXNB3</i>	2,2	6,10E-04	4,86E-02	<i>MAP2K6</i>	2,63	2,87E-05	7,49E-03

<i>CYP46A1</i>	2,19	6,31E-05	1,25E-02	<i>SEMA6A</i>	2,6	4,55E-04	4,07E-02
<i>RASSF8</i>	2,11	1,11E-07	1,60E-04	<i>TNFRSF21</i>	2,57	1,65E-06	7,70E-04
<i>CYGB</i>	2,06	4,97E-04	4,29E-02	<i>OSBP2</i>	2,55	3,43E-04	3,50E-02
<i>CASC10</i>	2,05	1,73E-06	1,11E-03	<i>SNHG5</i>	2,47	1,08E-06	5,69E-04
<i>RHOA</i>	2,03	3,74E-06	1,85E-03	<i>PLPPR4</i>	2,44	5,17E-04	4,40E-02
<i>MRPS6</i>	1,99	1,02E-05	3,45E-03	<i>TRIM61</i>	2,43	4,94E-09	8,30E-06
<i>IFI44</i>	1,93	1,46E-04	2,11E-02	<i>JAK3</i>	2,43	2,33E-04	2,70E-02
<i>HSD17B7</i>	1,92	1,13E-04	1,88E-02	<i>AL035681.1</i>	2,39	4,82E-04	4,22E-02
<i>BMPER</i>	1,86	1,24E-04	1,98E-02	<i>CAMK1D</i>	2,38	1,52E-04	2,13E-02
<i>RAB36</i>	1,75	3,98E-07	4,18E-04	<i>RHOA</i>	2,35	1,76E-07	1,48E-04
<i>LAMC2</i>	1,72	1,19E-05	3,86E-03	<i>CPZ</i>	2,32	5,44E-05	1,10E-02
<i>ACAT2</i>	1,64	1,03E-05	3,45E-03	<i>KCND1</i>	2,27	1,05E-04	1,75E-02
<i>SRPX2</i>	1,62	2,28E-04	2,84E-02	<i>LIN7A</i>	2,26	2,73E-04	2,98E-02
<i>OGFRL1</i>	1,58	3,35E-05	8,54E-03	<i>CASC10</i>	2,23	1,88E-07	1,51E-04
<i>EPHX1</i>	1,5	7,75E-05	1,46E-02	<i>ADCY4</i>	2,21	1,18E-06	5,82E-04
<i>IQCK</i>	1,49	1,54E-04	2,16E-02	<i>CDHR3</i>	2,15	7,08E-05	1,29E-02
<i>HK2</i>	1,49	4,71E-04	4,14E-02	<i>CYP46A1</i>	2,13	4,98E-05	1,07E-02

<i>AK3</i>	1,45	1,47E-05	4,61E-03	<i>RASSF8</i>	2,12	3,15E-08	3,53E-05
<i>CD40</i>	1,43	4,44E-05	1,00E-02	<i>COL24A1</i>	2,11	1,32E-05	4,28E-03
<i>PM20D2</i>	1,43	7,95E-05	1,47E-02	<i>AC245297.3</i>	2,09	5,62E-04	4,65E-02
<i>EHD3</i>	1,4	9,66E-05	1,70E-02	<i>ADAMTS5</i>	2,07	1,58E-04	2,16E-02
<i>AC019069.1</i>	1,39	4,47E-04	4,00E-02	<i>TP53I11</i>	2,04	1,57E-04	2,16E-02
<i>PLA2R1</i>	1,36	1,96E-04	2,55E-02	<i>SPON2</i>	2,03	5,15E-05	1,09E-02
<i>TMEM65</i>	1,36	4,47E-04	4,00E-02	<i>WNK3</i>	2,02	4,23E-04	3,92E-02
<i>PARD6G</i>	1,35	2,33E-06	1,35E-03	<i>IL16</i>	2,01	5,26E-05	1,09E-02
<i>MTND2P28</i>	1,33	3,05E-05	8,27E-03	<i>RAB36</i>	1,97	4,41E-08	4,36E-05
<i>ACP6</i>	1,29	4,67E-04	4,13E-02	<i>STK26</i>	1,96	9,96E-06	3,49E-03
<i>PAG1</i>	1,29	6,25E-04	4,91E-02	<i>KREMEN1</i>	1,94	1,79E-04	2,28E-02
<i>MLLT3</i>	1,26	1,55E-05	4,61E-03	<i>EHD3</i>	1,93	1,06E-06	5,69E-04
<i>MIR4458</i>	1,26	2,05E-04	2,61E-02	<i>BHMT2</i>	1,89	2,49E-05	6,63E-03
<i>AS3MT</i>	1,25	4,94E-06	2,37E-03	<i>THRB</i>	1,84	6,19E-04	4,95E-02
<i>RNF32</i>	1,24	5,41E-05	1,14E-02	<i>ARMC4</i>	1,82	1,68E-04	2,18E-02
<i>OSBPLIA</i>	1,23	1,32E-04	1,99E-02	<i>SKIDA1</i>	1,82	2,87E-04	3,12E-02
<i>AC241585.2</i>	1,12	5,42E-04	4,46E-02	<i>PRDM1</i>	1,79	4,82E-04	4,22E-02

<i>STRADB</i>	1,11	5,29E-05	1,13E-02	<i>BMPER</i>	1,76	1,03E-04	1,75E-02
<i>HEBP2</i>	1,1	1,51E-05	4,61E-03	<i>IFI44</i>	1,76	1,49E-04	2,12E-02
<i>ECM1</i>	1,1	9,72E-05	1,70E-02	<i>TSHZ1</i>	1,74	2,26E-04	2,68E-02
<i>AC106795.1</i>	1,1	3,06E-04	3,24E-02	<i>ALI39384.2</i>	1,7	2,41E-04	2,76E-02
<i>OGFOD3</i>	1,1	4,10E-04	3,85E-02	<i>SLC9A3-ASI</i>	1,63	3,96E-05	9,25E-03
<i>PYGL</i>	1,08	1,55E-04	2,16E-02	<i>CLUHP3</i>	1,62	1,65E-04	2,18E-02
<i>IRF2BPL</i>	1,08	2,42E-04	2,97E-02	<i>FBLN2</i>	1,61	1,78E-04	2,28E-02
<i>GCLM</i>	1,04	3,84E-04	3,73E-02	<i>MRPS6</i>	1,58	1,29E-04	1,97E-02
<i>B9D1</i>	1,02	5,58E-04	4,51E-02	<i>CD40</i>	1,57	8,41E-06	3,01E-03
<i>NTAN1</i>	0,89	3,67E-05	9,09E-03	<i>HK2</i>	1,56	2,37E-04	2,73E-02
<i>PYROXD2</i>	0,88	3,73E-05	9,09E-03	<i>PYGL</i>	1,55	5,96E-07	3,59E-04
<i>CCDC125</i>	0,87	3,74E-04	3,68E-02	<i>TRNP1</i>	1,55	2,09E-04	2,53E-02
<i>OPTN</i>	0,77	1,55E-05	4,61E-03	<i>STARD9</i>	1,53	1,44E-04	2,10E-02
<i>MT-COI</i>	0,75	2,21E-04	2,77E-02	<i>PLA2R1</i>	1,5	4,08E-05	9,38E-03
<i>RNMT</i>	0,75	4,27E-04	3,92E-02	<i>PM20D2</i>	1,49	2,12E-05	6,23E-03
<i>RALA</i>	0,67	5,03E-04	4,31E-02	<i>COL6A3</i>	1,45	4,47E-04	4,06E-02
<i>TMEM30A</i>	0,61	1,17E-04	1,91E-02	<i>DMGDH</i>	1,43	7,22E-05	1,30E-02

<i>KIFAP3</i>	0,58	3,21E-04	3,35E-02	<i>MLLT3</i>	1,41	1,87E-06	8,26E-04
<i>RNASEH1-AS1</i>	-0,67	3,01E-04	3,24E-02	<i>PARD6G</i>	1,36	7,61E-07	4,26E-04
<i>ANP32E</i>	-0,76	3,27E-04	3,37E-02	<i>LRIG3</i>	1,3	3,32E-04	3,43E-02
<i>PGM2</i>	-0,79	3,71E-04	3,68E-02	<i>HEPH</i>	1,28	6,49E-05	1,23E-02
<i>PWP2</i>	-0,8	2,99E-04	3,24E-02	<i>ACAT2</i>	1,27	1,24E-04	1,93E-02
<i>HYI</i>	-0,85	4,94E-04	4,28E-02	<i>GSTM1</i>	1,21	4,27E-05	9,57E-03
<i>MYADM</i>	-0,94	5,76E-04	4,63E-02	<i>MEI</i>	1,19	1,52E-04	2,13E-02
<i>MTCO1P12</i>	-0,95	2,32E-04	2,87E-02	<i>AK3</i>	1,16	2,70E-04	2,97E-02
<i>OXCT1</i>	-0,98	3,12E-05	8,32E-03	<i>PTPRG</i>	1,14	1,32E-04	1,97E-02
<i>TMSB4X</i>	-1,02	3,77E-04	3,68E-02	<i>MTND2P28</i>	1,14	1,34E-04	1,97E-02
<i>PCGF5</i>	-1,03	1,15E-04	1,89E-02	<i>OGFOD3</i>	1,09	2,28E-04	2,68E-02
<i>FLI1</i>	-1,04	2,80E-04	3,14E-02	<i>LINC01270</i>	1,09	4,89E-04	4,24E-02
<i>CD99P1</i>	-1,06	4,16E-04	3,89E-02	<i>EFNB1</i>	1,08	2,96E-04	3,16E-02
<i>SVIP</i>	-1,11	3,65E-04	3,67E-02	<i>OSBPLIA</i>	1,06	4,24E-04	3,92E-02
<i>CCNF</i>	-1,19	6,25E-04	4,91E-02	<i>ZNF667</i>	1,06	6,17E-04	4,95E-02
<i>FLNB</i>	-1,22	4,25E-04	3,92E-02	<i>DHX58</i>	0,98	1,32E-04	1,97E-02
<i>TRAF5</i>	-1,25	8,66E-05	1,58E-02	<i>HEBP2</i>	0,96	4,19E-05	9,52E-03

<i>AL512408.1</i>	-1,25	2,55E-04	3,05E-02	<i>ZADH2</i>	0,94	1,24E-04	1,93E-02
<i>DNAJA4</i>	-1,26	2,99E-05	8,25E-03	<i>CCDC125</i>	0,94	1,30E-04	1,97E-02
<i>ALCAM</i>	-1,3	3,18E-04	3,34E-02	<i>AS3MT</i>	0,92	1,97E-04	2,46E-02
<i>PLA2G4C</i>	-1,43	3,03E-04	3,24E-02	<i>ECMI</i>	0,91	4,18E-04	3,90E-02
<i>GPAM</i>	-1,47	3,33E-06	1,75E-03	<i>AL596244.1</i>	0,9	3,01E-04	3,20E-02
<i>RGN</i>	-1,49	9,34E-05	1,67E-02	<i>AC012467.2</i>	0,75	2,56E-04	2,91E-02
<i>STK38L</i>	-1,51	1,57E-04	2,16E-02	<i>CDK20</i>	0,72	1,66E-04	2,18E-02
<i>CMAHP</i>	-1,55	3,32E-04	3,39E-02	<i>MT-CO1</i>	0,7	3,46E-04	3,51E-02
<i>MT-TP</i>	-1,57	1,62E-04	2,21E-02	<i>DHRS4-AS1</i>	0,66	6,22E-04	4,95E-02
<i>MYEF2</i>	-1,6	1,50E-04	2,16E-02	<i>NXPE3</i>	0,58	3,70E-04	3,68E-02
<i>TGOLN2</i>	-1,64	4,14E-05	9,65E-03	<i>PWP2</i>	-0,75	3,74E-04	3,70E-02
<i>AP005018.2</i>	-1,73	7,76E-06	3,03E-03	<i>PPP1R3B</i>	-0,79	2,58E-04	2,91E-02
<i>TRIM14</i>	-1,78	5,55E-04	4,51E-02	<i>PMS2P1</i>	-0,79	4,80E-04	4,22E-02
<i>TNFRSF10A</i>	-1,79	3,72E-05	9,09E-03	<i>ZNF281</i>	-0,83	5,28E-04	4,44E-02
<i>MATN3</i>	-1,96	4,23E-04	3,92E-02	<i>TTC3P1</i>	-0,89	1,48E-04	2,12E-02
<i>MYH11</i>	-2	5,44E-04	4,46E-02	<i>HOXD8</i>	-0,92	2,26E-04	2,68E-02
<i>SLC38A4</i>	-2,15	1,29E-04	1,98E-02	<i>OXCT1</i>	-0,93	5,31E-05	1,09E-02

<i>BMPRI1B</i>	-2,17	6,09E-05	1,22E-02	<i>HY1</i>	-0,95	1,19E-04	1,90E-02
<i>AC120036.5</i>	-2,17	1,81E-04	2,41E-02	<i>FOXP1</i>	-0,96	2,63E-04	2,93E-02
<i>ITGA6</i>	-2,26	1,38E-04	2,05E-02	<i>PCGF5</i>	-0,99	2,06E-04	2,51E-02
<i>GSTO2</i>	-2,29	1,43E-04	2,10E-02	<i>HMG2P3</i>	-1,01	1,69E-04	2,18E-02
<i>MTCO2P12</i>	-2,3	9,41E-06	3,38E-03	<i>SMS</i>	-1,04	5,18E-04	4,40E-02
<i>STAT4</i>	-2,3	2,47E-04	2,99E-02	<i>PLP2</i>	-1,06	1,10E-04	1,81E-02
<i>ARHGDI1B</i>	-2,34	3,44E-04	3,48E-02	<i>MTCO1P12</i>	-1,11	2,19E-05	6,24E-03
<i>RCAN1</i>	-2,35	1,79E-04	2,41E-02	<i>FLI1</i>	-1,2	8,29E-05	1,47E-02
<i>PKDCC</i>	-2,41	4,36E-04	3,96E-02	<i>NREP</i>	-1,26	3,03E-04	3,21E-02
<i>CRHR1</i>	-2,42	6,05E-05	1,22E-02	<i>SVIP</i>	-1,29	8,05E-05	1,44E-02
<i>MYH10</i>	-2,5	1,73E-10	4,84E-07	<i>GPAM</i>	-1,3	1,14E-05	3,83E-03
<i>NEK7</i>	-2,6	1,20E-04	1,95E-02	<i>TMSB4X</i>	-1,3	2,15E-05	6,23E-03
<i>GATA2-ASI</i>	-2,73	4,80E-04	4,20E-02	<i>CHST11</i>	-1,34	1,51E-05	4,80E-03
<i>FCRLA</i>	-2,74	4,02E-04	3,81E-02	<i>FRMD5</i>	-1,4	8,90E-05	1,54E-02
<i>GRIK2</i>	-2,75	7,70E-06	3,03E-03	<i>MYEF2</i>	-1,42	4,12E-04	3,89E-02
<i>ID4</i>	-2,77	4,48E-05	1,00E-02	<i>PLA2G4C</i>	-1,44	1,27E-04	1,95E-02
<i>MT-TT</i>	-2,8	4,46E-11	1,50E-07	<i>FHOD3</i>	-1,47	1,17E-04	1,90E-02

<i>WISP1</i>	-2,89	4,54E-05	1,00E-02	<i>CMAHP</i>	-1,55	1,61E-04	2,18E-02
<i>CHST6</i>	-3,06	3,90E-04	3,73E-02	<i>LINC00346</i>	-1,56	6,50E-05	1,23E-02
<i>MTND4LP30</i>	-3,07	1,79E-06	1,11E-03	<i>TNFAIP8L3</i>	-1,62	5,64E-04	4,65E-02
<i>C17orf107</i>	-3,15	3,69E-04	3,68E-02	<i>GFOD1</i>	-1,65	2,60E-04	2,91E-02
<i>PAX9</i>	-3,2	2,63E-04	3,09E-02	<i>TNFRSF10A</i>	-1,68	2,35E-05	6,48E-03
<i>AL133346.1</i>	-3,38	3,87E-04	3,73E-02	<i>CPNE7</i>	-1,68	3,29E-04	3,43E-02
<i>SOX9</i>	-3,38	5,20E-04	4,35E-02	<i>PPP1R13L</i>	-1,68	5,98E-04	4,88E-02
<i>DMD</i>	-3,53	1,95E-04	2,55E-02	<i>GDNF</i>	-1,69	3,12E-04	3,28E-02
<i>CDH10</i>	-3,55	1,89E-04	2,51E-02	<i>STK38L</i>	-1,79	2,90E-05	7,49E-03
<i>LINC02086</i>	-3,64	2,96E-04	3,23E-02	<i>AP005018.2</i>	-1,89	1,14E-06	5,82E-04
<i>TMED10P2</i>	-3,64	4,83E-04	4,21E-02	<i>HOXD9</i>	-2,04	5,22E-05	1,09E-02
<i>ERBB4</i>	-3,71	2,72E-04	3,11E-02	<i>LINC01116</i>	-2,06	5,26E-04	4,44E-02
<i>DUXAP8</i>	-3,83	1,12E-04	1,88E-02	<i>MTND1P23</i>	-2,08	3,61E-06	1,44E-03
<i>AC005082.1</i>	-3,9	8,82E-06	3,29E-03	<i>FMNL1</i>	-2,33	1,20E-05	3,96E-03
<i>LHX8</i>	-3,95	2,67E-04	3,11E-02	<i>TLE2</i>	-2,45	4,54E-04	4,07E-02
<i>AC026355.1</i>	-3,98	5,41E-04	4,46E-02	MT-TP	-2,52	2,14E-07	1,56E-04
<i>AL110504.1</i>	-3,99	1,25E-04	1,98E-02	<i>MYH10</i>	-2,57	6,45E-11	1,81E-07

<i>RBP7</i>	-4,19	1,04E-04	1,79E-02	<i>BMPRI1B</i>	-2,6	1,87E-06	8,26E-04
<i>DUXAP9</i>	-4,19	3,32E-04	3,39E-02	<i>MTCO2P12</i>	-2,79	2,86E-07	2,00E-04
<i>PDLIM3</i>	-4,25	2,79E-04	3,14E-02	<i>AL133346.1</i>	-2,9	1,88E-04	2,37E-02
<i>LAMP3</i>	-4,32	1,46E-04	2,11E-02	<i>MT-TT</i>	-3,1	2,26E-12	9,51E-09
<i>DSG3</i>	-4,46	5,08E-04	4,31E-02	<i>AC017048.3</i>	-3,16	2,02E-04	2,48E-02
<i>DNAH2</i>	-4,83	4,30E-04	3,93E-02	<i>COL4A4</i>	-3,38	2,25E-04	2,68E-02
<i>SRGN</i>	-4,88	2,25E-05	6,52E-03	<i>RBP7</i>	-3,46	3,63E-04	3,63E-02
<i>AC103702.2</i>	-4,95	2,59E-04	3,06E-02	<i>EPHA5</i>	-3,71	4,86E-04	4,23E-02
<i>PITX1</i>	-4,97	2,25E-07	2,52E-04	<i>AC002480.2</i>	-3,83	6,20E-04	4,95E-02
<i>NRK</i>	-5,01	5,90E-04	4,73E-02	<i>AP001999.1</i>	-3,84	1,56E-05	4,85E-03
<i>CCDC144NL</i>	-5,37	8,09E-09	1,51E-05	<i>DUXAP10</i>	-3,89	3,98E-04	3,85E-02
<i>AP001999.1</i>	-5,5	7,37E-06	3,03E-03	<i>LINC00578</i>	-3,96	3,56E-05	8,67E-03
<i>HTRA4</i>	-5,67	5,29E-07	4,88E-04	<i>FAM9C</i>	-4,02	2,81E-06	1,21E-03
<i>HOXB-AS4</i>	-5,79	5,73E-05	1,17E-02	<i>HTRA4</i>	-4,06	1,50E-06	7,21E-04
<i>ISL2</i>	-5,87	1,48E-08	2,49E-05	<i>MYOCD</i>	-4,17	3,50E-04	3,52E-02
<i>RASA4DP</i>	-6,16	3,33E-05	8,54E-03	<i>HCLS1</i>	-4,22	1,24E-07	1,10E-04
<i>SHOX</i>	-6,24	3,50E-06	1,78E-03	<i>NOS3</i>	-4,37	5,82E-04	4,77E-02

<i>FAM9C</i>	-6,43	2,63E-06	1,44E-03	<i>AC026355.1</i>	-4,49	1,62E-04	2,18E-02
<i>FOXE1</i>	-7	1,14E-07	1,60E-04	<i>TLL1</i>	-4,52	1,96E-04	2,46E-02
<i>TLL1</i>	-7,1	2,61E-05	7,41E-03	<i>WIPF3</i>	-4,62	4,10E-04	3,89E-02
<i>EPHA5</i>	-7,72	9,46E-06	3,38E-03	<i>FXYP6</i>	-4,83	2,34E-05	6,48E-03
<i>ADGRG7</i>	-11,95	5,45E-17	9,17E-13	<i>IRF6</i>	-4,84	3,98E-04	3,85E-02
				<i>ISL2</i>	-4,9	1,99E-08	2,56E-05
				<i>INTS4P1</i>	-5,08	5,51E-05	1,10E-02
				<i>CCDC144NL</i>	-5,2	3,98E-09	7,43E-06
				<i>MTND4LP30</i>	-5,25	3,70E-11	1,24E-07
				<i>LDHC</i>	-5,83	4,56E-05	1,01E-02
				<i>PDLIM3</i>	-6,1	3,56E-06	1,44E-03
				<i>SRGN</i>	-6,17	3,42E-06	1,44E-03
				<i>C5orf17</i>	-6,33	1,24E-13	6,97E-10
				<i>FOXE1</i>	-7,18	3,55E-08	3,73E-05
				<i>ADGRG7</i>	-11,48	2,63E-17	4,42E-13

**Annexe 2 : Liste complète des gènes affectés significativement par des évènements
d'épissage alternatif**

Evènements CbIC	Gènes	p-value	FDR	Delta PSI	Evènements CbIG	Gènes	p-value	FDR	Delta PSI
				(WT-CbIC)					(WT-CbIG)
SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,834	A5SS	<i>ULK3</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,733
A3SS	<i>XRCC4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,832	A5SS	<i>FAAP20</i>	3,51E-07	5,08E-05	0,731
MXE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,802	MXE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,725
SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,702	SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,711
A5SS	<i>C8orf59</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,666	SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,702
A5SS	<i>ULK3</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,661	A5SS	<i>TLL3</i>	2,20E-11	9,95E-09	0,693
A3SS	<i>ZNF655</i>	1,06E-10	1,37E-07	0,596	SE	<i>NDUFB2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,649
SE	<i>USP53</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,568	SE	<i>GUSBP11</i>	2,48E-08	5,07E-06	0,615
SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,559	SE	<i>USP28</i>	1,52E-05	1,17E-03	0,611
SE	<i>ALDH3A2</i>	9,66E-06	8,27E-04	0,540	SE	<i>AP000347.1</i>	2,70E-08	5,46E-06	0,610
A5SS	<i>PARP2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,517	SE	<i>ST7L</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,607
A3SS	<i>OCIAD2</i>	4,40E-06	6,70E-04	0,490	A5SS	<i>ALDH3B1</i>	1,21E-14	8,76E-12	0,595
SE	<i>PCTP</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,482	SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,593
A5SS	<i>TLL3</i>	7,22E-10	3,44E-07	0,458	SE	<i>TLL3</i>	5,61E-11	2,47E-08	0,572
SE	<i>FEZ1</i>	8,82E-09	2,46E-06	0,455	A5SS	<i>DPH7</i>	6,23E-09	1,88E-06	0,571
SE	<i>KIAA1551</i>	2,19E-09	7,48E-07	0,452	SE	<i>USP28</i>	2,27E-04	9,54E-03	0,569
SE	<i>USP8</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,446	SE	<i>TEAD2</i>	4,69E-11	2,11E-08	0,558
SE	<i>ECT2</i>	4,55E-06	4,40E-04	0,446	SE	<i>PIIP5K1</i>	1,14E-09	3,57E-07	0,544
MXE	<i>SNHG1</i>	2,88E-05	1,81E-03	0,444	SE	<i>CEMIP</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,523
SE	<i>CFDP1</i>	9,46E-09	2,56E-06	0,440	SE	<i>ST5</i>	5,05E-10	1,70E-07	0,519
MXE	<i>INPP1</i>	7,22E-09	1,16E-06	0,439	SE	<i>USP53</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,517
RI	<i>DMKN</i>	9,63E-06	2,18E-03	0,438	MXE	<i>LINC01515</i>	3,99E-10	1,17E-07	0,506
MXE	<i>PTPN12</i>	3,77E-09	6,61E-07	0,435	SE	<i>ZNF561</i>	6,82E-07	8,94E-05	0,504
A5SS	<i>NEK3</i>	9,75E-07	1,55E-04	0,425	A3SS	<i>OCIAD2</i>	4,39E-06	6,05E-04	0,490
SE	<i>TEAD2</i>	6,37E-06	5,81E-04	0,417	A5SS	<i>TIRAP</i>	1,43E-06	1,57E-04	0,487
SE	<i>ABHD11</i>	1,44E-07	2,45E-05	0,405	A5SS	<i>ZNF180</i>	9,74E-07	1,18E-04	0,484
MXE	<i>LINC01881</i>	6,21E-06	5,12E-04	0,400	SE	<i>KIAA1551</i>	5,10E-09	1,29E-06	0,480
SE	<i>INPP1</i>	1,17E-06	1,42E-04	0,399	MXE	<i>INPP1</i>	2,26E-10	7,24E-08	0,465
MXE	<i>TTC25</i>	2,73E-06	2,51E-04	0,397	A5SS	<i>PARP2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,455
SE	<i>METTL21A</i>	1,92E-10	8,72E-08	0,391	MXE	<i>NUDT17</i>	3,42E-04	9,75E-03	0,444
SE	<i>TBC1D31</i>	2,12E-09	7,32E-07	0,381	MXE	<i>GSN</i>	1,64E-06	1,65E-04	0,438
A3SS	<i>TRMU</i>	1,59E-04	9,58E-03	0,371	SE	<i>CEMIP</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,428
SE	<i>ABHD11</i>	7,80E-07	1,03E-04	0,364	SE	<i>SEPSECS</i>	2,99E-05	1,99E-03	0,423
A5SS	<i>RNF146</i>	1,69E-05	1,52E-03	0,362	SE	<i>IFI44L</i>	1,11E-05	9,11E-04	0,419
A3SS	<i>MUC1</i>	8,97E-10	5,16E-07	0,362	SE	<i>USP8</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,418
SE	<i>C8orf31</i>	1,96E-07	3,20E-05	0,360	SE	<i>ALDH3A2</i>	3,88E-05	2,45E-03	0,418
SE	<i>AC126755.2</i>	6,71E-06	6,03E-04	0,359	A3SS	<i>KMT2A</i>	2,33E-05	2,26E-03	0,416
A3SS	<i>TPT1-AS1</i>	5,07E-07	1,01E-04	0,358	MXE	<i>SH3YL1</i>	1,57E-07	2,22E-05	0,408
MXE	<i>SNHG17</i>	8,23E-06	6,50E-04	0,356	SE	<i>PCTP</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,407
SE	<i>LMO7-AS1</i>	1,23E-05	1,00E-03	0,344	SE	<i>CDH11</i>	1,76E-07	2,79E-05	0,402
SE	<i>PCK2</i>	8,11E-11	4,16E-08	0,341	SE	<i>SNHG14</i>	5,04E-08	9,43E-06	0,397
A3SS	<i>NPRL2</i>	1,76E-07	4,79E-05	0,340	SE	<i>SHMT1</i>	1,33E-14	1,12E-11	0,395
MXE	<i>HDAC11</i>	2,17E-04	8,67E-03	0,340	SE	<i>GSN</i>	1,76E-06	1,98E-04	0,392
SE	<i>ZCWPW1</i>	1,41E-05	1,11E-03	0,337	SE	<i>FXR1</i>	1,77E-07	2,79E-05	0,391
MXE	<i>COL5A1</i>	8,57E-13	4,00E-10	0,326	A3SS	<i>MPHOSPH9</i>	1,17E-06	2,06E-04	0,387
MXE	<i>TMEM87B</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,319	MXE	<i>RPL35A</i>	6,79E-08	1,20E-05	0,386
A5SS	<i>HSF1</i>	1,17E-09	4,88E-07	0,310	SE	<i>LMO7-AS1</i>	6,88E-08	1,22E-05	0,383

A3SS	<i>RBM23</i>	1,13E-09	5,31E-07	0,309	SE	<i>INPP1</i>	2,94E-05	1,97E-03	0,383
SE	<i>TTL3</i>	1,76E-07	2,91E-05	0,308	SE	<i>TTL3</i>	5,27E-09	1,33E-06	0,383
A3SS	<i>COL5A1</i>	2,47E-12	4,26E-09	0,308	A3SS	<i>SYNGAP1</i>	8,15E-05	5,17E-03	0,374
SE	<i>ADGRD1</i>	2,91E-07	4,48E-05	0,307	SE	<i>LINC01515</i>	1,94E-07	2,98E-05	0,369
MXE	<i>PMF1-BGLAP</i>	9,96E-12	3,10E-09	0,303	SE	<i>LINC01184</i>	3,61E-05	2,33E-03	0,365
A3SS	<i>RPAIN</i>	2,04E-07	5,27E-05	0,300	SE	<i>TBC1D5</i>	2,60E-06	2,75E-04	0,365
SE	<i>AC126755.2</i>	1,03E-04	5,54E-03	0,297	SE	<i>ECT2</i>	2,12E-04	9,09E-03	0,362
SE	<i>TMEM230</i>	2,54E-08	5,78E-06	0,295	SE	<i>EED</i>	3,23E-05	2,12E-03	0,359
A5SS	<i>TCF25</i>	1,89E-05	1,64E-03	0,294	A3SS	<i>STXBP4</i>	2,41E-12	1,70E-09	0,356
SE	<i>DCUN1D4</i>	2,83E-05	1,95E-03	0,292	SE	<i>IRF3</i>	1,42E-06	1,67E-04	0,348
MXE	<i>DMKN</i>	3,18E-09	5,80E-07	0,292	SE	<i>LINC00665</i>	5,80E-08	1,07E-05	0,348
SE	<i>ZSCAN32</i>	1,89E-06	2,14E-04	0,290	SE	<i>DUSP10</i>	8,15E-07	1,05E-04	0,338
A5SS	<i>C7orf49</i>	3,32E-06	3,96E-04	0,288	SE	<i>PRR14L</i>	6,55E-08	1,17E-05	0,336
A3SS	<i>CPNE1</i>	1,21E-06	2,09E-04	0,288	MXE	<i>CNOT2</i>	2,14E-06	1,99E-04	0,336
SE	<i>SDR39U1</i>	5,71E-06	5,29E-04	0,282	SE	<i>C2orf74</i>	1,19E-05	9,61E-04	0,335
A3SS	<i>GATAD2A</i>	1,74E-09	7,52E-07	0,281	A3SS	<i>HOXC6</i>	2,22E-16	2,51E-13	0,334
A3SS	<i>DPH7</i>	4,13E-10	2,67E-07	0,281	MXE	<i>BRD8</i>	1,02E-04	3,87E-03	0,333
MXE	<i>ZNF561</i>	5,15E-05	2,88E-03	0,281	MXE	<i>YAF2</i>	4,99E-05	2,23E-03	0,325
MXE	<i>AC108010.1</i>	7,30E-05	3,72E-03	0,279	A5SS	<i>POLR2J3</i>	8,98E-07	1,16E-04	0,323
A5SS	<i>NDUF55</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,277	SE	<i>CCDC102B</i>	7,72E-07	1,01E-04	0,320
RI	<i>MLX</i>	2,75E-09	1,87E-06	0,277	SE	<i>NUDT1</i>	1,92E-04	8,43E-03	0,319
SE	<i>GMD5-AS1</i>	8,09E-05	4,60E-03	0,275	SE	<i>ADAM15</i>	6,37E-10	2,10E-07	0,319
SE	<i>ABHD11</i>	2,60E-07	4,13E-05	0,274	SE	<i>AC007566.1</i>	7,17E-06	6,40E-04	0,318
MXE	<i>DMKN</i>	5,28E-14	3,70E-11	0,274	SE	<i>CS</i>	1,31E-09	3,99E-07	0,313
SE	<i>SHMT1</i>	1,08E-08	2,85E-06	0,273	A3SS	<i>ZNF226</i>	2,81E-11	1,76E-08	0,312
MXE	<i>GPR161</i>	7,85E-11	2,10E-08	0,268	SE	<i>GAA</i>	1,64E-04	7,45E-03	0,310
MXE	<i>DMKN</i>	2,20E-04	8,67E-03	0,265	SE	<i>METTL21A</i>	1,07E-09	3,39E-07	0,310
SE	<i>SNHG8</i>	8,29E-05	4,70E-03	0,264	SE	<i>RUNX1T1</i>	7,84E-06	6,92E-04	0,308
A5SS	<i>SNHG8</i>	4,52E-07	8,86E-05	0,263	SE	<i>TRIM65</i>	1,29E-05	1,02E-03	0,303
SE	<i>NUDT13</i>	1,44E-04	7,08E-03	0,262	MXE	<i>PHLPP2</i>	1,99E-04	6,46E-03	0,303
SE	<i>ST7L</i>	3,96E-05	2,59E-03	0,260	A5SS	<i>AMDHD2</i>	3,67E-12	1,90E-09	0,300
SE	<i>METTL2B</i>	1,02E-05	8,60E-04	0,258	MXE	<i>CNOT2</i>	2,15E-09	5,41E-07	0,298
SE	<i>AC019080.1</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,256	SE	<i>PDPR</i>	4,58E-08	8,77E-06	0,296
SE	<i>WASHC2C</i>	6,95E-09	2,04E-06	0,254	SE	<i>TTC28-AS1</i>	8,10E-07	1,04E-04	0,294
A5SS	<i>AC005324.4</i>	6,63E-05	4,60E-03	0,250	SE	<i>B3GALNT1</i>	2,24E-04	9,46E-03	0,294
SE	<i>MYL6</i>	1,91E-08	4,56E-06	0,249	A5SS	<i>NDUF55</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,293
A3SS	<i>KAT14</i>	1,32E-04	8,78E-03	0,249	MXE	<i>C2orf74</i>	2,29E-05	1,29E-03	0,293
A5SS	<i>MBD5</i>	7,44E-06	8,00E-04	0,247	SE	<i>TMEM175</i>	1,01E-04	5,08E-03	0,289
MXE	<i>ZNF451</i>	7,40E-05	3,72E-03	0,246	A3SS	<i>PLAGL1</i>	1,59E-04	8,25E-03	0,288
SE	<i>NUDT13</i>	1,44E-04	7,08E-03	0,244	SE	<i>UBOX5</i>	3,11E-05	2,05E-03	0,287
SE	<i>MTMR14</i>	1,27E-06	1,52E-04	0,243	SE	<i>GALK2</i>	1,23E-04	5,95E-03	0,284
MXE	<i>PPP1R12C</i>	2,01E-05	1,36E-03	0,232	MXE	<i>USP3</i>	3,84E-07	5,01E-05	0,284
SE	<i>C1QTNF6</i>	3,70E-06	3,76E-04	0,230	MXE	<i>CS</i>	2,65E-07	3,59E-05	0,284
SE	<i>KLHDC1</i>	1,18E-04	6,13E-03	0,229	SE	<i>BAZ2B</i>	4,19E-07	6,02E-05	0,283
SE	<i>SETDB2</i>	1,08E-05	9,06E-04	0,228	A3SS	<i>ZBTB80S</i>	1,99E-06	3,31E-04	0,283
SE	<i>MVD</i>	1,99E-04	9,19E-03	0,228	A5SS	<i>UBE2I</i>	9,82E-07	1,18E-04	0,282
SE	<i>SDR39U1</i>	7,60E-07	1,01E-04	0,228	SE	<i>BMF</i>	1,88E-05	1,36E-03	0,281
MXE	<i>PEX7</i>	2,30E-04	9,02E-03	0,228	MXE	<i>SLC22A17</i>	1,90E-06	1,81E-04	0,281
SE	<i>AC108010.1</i>	2,07E-04	9,47E-03	0,227	SE	<i>GPR155</i>	6,28E-06	5,76E-04	0,280
SE	<i>SH3YL1</i>	3,83E-05	2,53E-03	0,227	SE	<i>SH3YL1</i>	2,75E-09	7,72E-07	0,278
MXE	<i>AC068152.1</i>	2,16E-10	5,49E-08	0,227	A3SS	<i>FLYWCH1</i>	1,99E-08	7,49E-06	0,275
SE	<i>SNHG8</i>	1,04E-07	1,89E-05	0,226	SE	<i>POLL</i>	5,46E-05	3,17E-03	0,274
A3SS	<i>GALT</i>	1,97E-08	6,37E-06	0,224	A5SS	<i>ZNF461</i>	2,10E-04	9,99E-03	0,274
SE	<i>SH3YL1</i>	3,76E-11	2,13E-08	0,221	SE	<i>SH3YL1</i>	1,66E-04	7,53E-03	0,273
SE	<i>SDR39U1</i>	2,09E-06	2,33E-04	0,219	MXE	<i>DMKN</i>	4,99E-09	1,13E-06	0,273
SE	<i>U2AF1L4</i>	1,07E-04	5,65E-03	0,218	SE	<i>TANGO2</i>	1,87E-05	1,36E-03	0,272
A3SS	<i>WASH6P</i>	5,48E-05	4,43E-03	0,218	A3SS	<i>N4BP2</i>	1,29E-13	1,04E-10	0,270
MXE	<i>VSIG10</i>	1,31E-04	5,79E-03	0,217	MXE	<i>DMKN</i>	2,97E-04	8,67E-03	0,270
SE	<i>SLC35G1</i>	4,20E-05	2,70E-03	0,216	MXE	<i>SLC25A33</i>	2,77E-04	8,24E-03	0,270
MXE	<i>PQLC3</i>	1,64E-06	1,71E-04	0,215	RI	<i>COMMD3</i>	4,81E-05	6,66E-03	0,268
A5SS	<i>AACS</i>	1,42E-05	1,31E-03	0,213	A3SS	<i>NLRX1</i>	2,38E-05	2,26E-03	0,267
MXE	<i>DMKN</i>	6,63E-07	7,91E-05	0,212	A5SS	<i>MID1</i>	1,16E-07	1,99E-05	0,265
A3SS	<i>DPH1</i>	1,65E-04	9,69E-03	0,210	RI	<i>RNASEK-C17orf49</i>	3,50E-05	5,53E-03	0,265
SE	<i>DCTD</i>	1,42E-05	1,11E-03	0,207	SE	<i>RNF216P1</i>	4,19E-06	4,09E-04	0,264
SE	<i>ADCY4</i>	1,40E-04	6,88E-03	0,207	SE	<i>MIR100HG</i>	2,41E-06	2,57E-04	0,263
MXE	<i>KCNK2</i>	6,72E-05	3,49E-03	0,207	A3SS	<i>ADGRB2</i>	1,64E-07	4,61E-05	0,263
SE	<i>DZIP1L</i>	2,23E-05	1,61E-03	0,206	SE	<i>COA1</i>	2,18E-08	4,61E-06	0,262
SE	<i>XPNPEP3</i>	3,95E-06	3,98E-04	0,206	SE	<i>PHYHD1</i>	1,48E-04	6,86E-03	0,262
SE	<i>FAM86DP</i>	8,88E-16	1,01E-12	0,205	SE	<i>AC010186.2</i>	1,63E-05	1,23E-03	0,260
MXE	<i>AL117190.1</i>	2,78E-06	2,51E-04	0,205	SE	<i>AC008966.1</i>	2,29E-05	1,59E-03	0,259

SE	CAST	0,00E+00	0,00E+00	0,204	MXE	CLN3	1,91E-04	6,32E-03	0,259
SE	UQCRH	2,28E-05	1,64E-03	0,204	MXE	ZNF587B	5,38E-10	1,52E-07	0,255
SE	CPPED1	9,19E-07	1,16E-04	0,203	A3SS	RBM23	4,08E-07	9,20E-05	0,254
SE	SH3BP2	3,79E-05	2,51E-03	0,200	A5SS	CCNL1	4,49E-05	3,19E-03	0,252
A3SS	ZNF226	1,03E-05	1,37E-03	0,200	MXE	C2CD5	1,81E-04	6,06E-03	0,250
MXE	EEF1AKMT1	1,76E-04	7,36E-03	0,200	RI	TRA2A	6,72E-05	8,75E-03	0,250
MXE	CAST	2,77E-12	1,11E-09	0,198	SE	ZNF761	8,57E-05	4,46E-03	0,249
A5SS	CAPRIN2	1,41E-04	7,69E-03	0,197	A5SS	EWSR1	1,62E-06	1,73E-04	0,249
A3SS	STEAP1B	2,32E-05	2,49E-03	0,197	SE	ABCB4	1,84E-05	1,34E-03	0,248
SE	PEX19	2,25E-05	1,62E-03	0,195	A5SS	NME4	1,36E-05	1,20E-03	0,247
A3SS	CSF1	2,08E-06	3,47E-04	0,195	SE	MIR99AHG	1,79E-05	1,32E-03	0,246
SE	BCAS3	2,08E-06	2,32E-04	0,194	MXE	ELMOD3	1,32E-07	1,90E-05	0,241
SE	EHBP1	2,20E-04	9,94E-03	0,194	SE	LINC00665	9,25E-07	1,17E-04	0,239
A3SS	SELENOP	5,17E-05	4,25E-03	0,194	A5SS	NFAT5	1,80E-06	1,86E-04	0,239
SE	PCDHGC3	4,19E-07	6,04E-05	0,193	RI	RNF167	4,86E-06	1,08E-03	0,239
MXE	ZHX3	2,42E-06	2,26E-04	0,192	SE	APIP	4,29E-11	1,95E-08	0,238
A3SS	B4GALT3	3,15E-05	2,81E-03	0,191	SE	ARRB1	4,47E-05	2,73E-03	0,238
SE	ZNF79	1,06E-06	1,32E-04	0,190	A5SS	FES	1,01E-05	9,37E-04	0,238
SE	DNAL1	3,62E-05	2,43E-03	0,188	SE	CCP110	3,61E-05	2,33E-03	0,237
SE	EEF1AKMT1	1,05E-04	5,57E-03	0,188	A3SS	PHF21A	5,47E-05	4,01E-03	0,237
A5SS	CEP83	3,27E-06	3,96E-04	0,188	SE	SAMD9L	4,96E-05	2,93E-03	0,236
SE	RUBCNL	3,42E-05	2,31E-03	0,187	SE	FAM86DP	0,00E+00	0,00E+00	0,236
SE	GIN1	9,62E-05	5,24E-03	0,184	A5SS	FLOT1	6,02E-05	4,03E-03	0,233
SE	NLGN2	1,09E-04	5,75E-03	0,183	A5SS	TMEM231	2,98E-09	9,81E-07	0,229
MXE	DMKN	4,82E-09	7,95E-07	0,182	SE	MARCH2	9,95E-05	5,03E-03	0,228
SE	DNMT1	1,50E-06	1,76E-04	0,180	SE	SIX5	5,98E-05	3,39E-03	0,224
A3SS	HEPH	3,47E-07	7,94E-05	0,180	SE	PRUNE1	1,89E-04	8,34E-03	0,224
MXE	RFX8	2,40E-04	9,27E-03	0,179	SE	POC1B	2,37E-04	9,86E-03	0,224
MXE	KCNK2	6,55E-05	3,43E-03	0,179	A3SS	DPH7	9,26E-05	5,56E-03	0,223
MXE	CD44	1,23E-09	2,65E-07	0,179	SE	SLC36A1	3,32E-12	1,98E-09	0,222
RI	RPL38	1,89E-05	3,51E-03	0,179	SE	SNHG5	1,10E-04	5,44E-03	0,221
SE	ZNF641	6,16E-05	3,68E-03	0,177	SE	GRAMD3	1,32E-12	8,37E-10	0,221
A5SS	CENPT	8,70E-05	5,68E-03	0,177	A5SS	GSKIP	3,50E-08	7,44E-06	0,219
SE	RNMT	3,18E-06	3,34E-04	0,174	A3SS	ARHGEF1	2,88E-05	2,53E-03	0,219
SE	UGP2	2,55E-05	1,80E-03	0,174	SE	RFX2	1,36E-06	1,62E-04	0,217
SE	NEIL2	7,67E-05	4,40E-03	0,174	A5SS	RACK1	3,20E-07	4,82E-05	0,217
SE	MKL1	1,29E-07	2,25E-05	0,172	A3SS	SEH1L	5,44E-08	1,81E-05	0,216
MXE	FAM133B	1,04E-07	1,38E-05	0,171	SE	NPIP5	4,31E-05	2,67E-03	0,215
SE	SEC31A	1,55E-04	7,52E-03	0,170	SE	CWF19L1	3,56E-06	3,55E-04	0,215
RI	STX16	4,11E-07	1,20E-04	0,169	MXE	PSG9	1,09E-04	4,00E-03	0,214
A5SS	MRPL9	4,45E-05	3,22E-03	0,168	MXE	TMEM87B	9,44E-15	6,65E-12	0,214
SE	CBWD1	5,02E-07	7,07E-05	0,167	SE	AC010186.2	8,37E-05	4,37E-03	0,213
MXE	DMKN	4,40E-05	2,58E-03	0,167	SE	ZSCAN32	4,51E-05	2,74E-03	0,213
MXE	DMKN	8,92E-12	2,94E-09	0,167	A3SS	ANKRD10	9,17E-06	1,03E-03	0,213
SE	PTS	5,11E-15	5,12E-12	0,166	SE	AC007388.1	1,29E-04	6,14E-03	0,212
SE	C1QTNF6	4,74E-05	2,98E-03	0,164	SE	C1QTNF6	2,18E-04	9,29E-03	0,212
A3SS	TOR1AIP1	1,10E-09	5,31E-07	0,163	A3SS	MLX	7,09E-06	8,70E-04	0,212
MXE	COL5A1	1,32E-07	1,71E-05	0,163	SE	RNF14	2,81E-06	2,93E-04	0,211
SE	SNX19	1,02E-05	8,60E-04	0,162	SE	TMEM106A	2,11E-04	9,07E-03	0,211
SE	AC068152.1	8,54E-05	4,79E-03	0,161	SE	SH3YL1	2,18E-09	6,35E-07	0,211
MXE	NTAN1	2,64E-05	1,68E-03	0,159	A5SS	AC005324.4	6,29E-05	4,14E-03	0,211
SE	TLL3	7,93E-06	7,00E-04	0,156	A3SS	GATAD2A	1,48E-04	7,75E-03	0,211
MXE	TGFB111	4,45E-05	2,58E-03	0,156	A3SS	TOR1AIP1	0,00E+00	0,00E+00	0,211
SE	CNP	2,57E-06	2,77E-04	0,155	MXE	SLC38A9	1,75E-04	5,96E-03	0,211
SE	ZNF562	6,74E-05	3,96E-03	0,154	SE	DLG1	5,69E-05	3,27E-03	0,210
SE	IFT88	4,09E-05	2,64E-03	0,153	RI	SGSM3	8,29E-07	3,06E-04	0,210
A3SS	NECAP1	1,24E-05	1,56E-03	0,153	A3SS	SELENBP1	4,83E-05	3,73E-03	0,208
SE	STARD4	6,67E-06	6,03E-04	0,151	A3SS	RAP1B	2,92E-05	2,54E-03	0,208
MXE	HLA-A	5,79E-06	4,92E-04	0,151	A5SS	TRA2A	1,12E-04	6,75E-03	0,206
SE	SLC12A9	3,21E-05	2,18E-03	0,149	A3SS	TGFBR3	8,38E-06	9,65E-04	0,206
MXE	HACL1	2,03E-07	2,52E-05	0,149	MXE	DMKN	3,23E-12	1,34E-09	0,205
SE	SAT1	4,62E-08	9,51E-06	0,148	RI	UFD1	3,66E-06	1,08E-03	0,204
MXE	AC108010.1	1,77E-06	1,81E-04	0,148	MXE	PPP1R12C	9,64E-05	3,71E-03	0,203
SE	RTN4	1,96E-04	9,07E-03	0,146	SE	PIGN	1,38E-04	6,46E-03	0,201
SE	ATP5C1	2,19E-06	2,42E-04	0,146	A5SS	PLEKHH3	1,05E-07	1,90E-05	0,200
SE	CDK10	1,75E-11	1,03E-08	0,145	A5SS	CASP8AP2	1,14E-05	1,03E-03	0,200
A5SS	SETDB1	9,85E-06	9,66E-04	0,145	A3SS	DDB2	1,43E-04	7,57E-03	0,200
MXE	ANKRD36	1,27E-06	1,35E-04	0,145	MXE	ATAD2B	1,65E-04	5,75E-03	0,200
A5SS	FAM185A	3,69E-05	2,80E-03	0,143	SE	USP13	7,63E-06	6,74E-04	0,198
A5SS	UPP1	1,17E-08	3,91E-06	0,141	SE	HKR1	5,54E-05	3,20E-03	0,198

SE	<i>IL17RC</i>	5,20E-06	4,89E-04	0,102	MXE	<i>CNOT2</i>	3,95E-08	7,52E-06	0,148
A5SS	<i>STX16</i>	8,74E-06	9,11E-04	0,102	MXE	<i>TBC1D12</i>	5,96E-06	4,72E-04	0,147
A5SS	<i>MTMR14</i>	2,78E-05	2,21E-03	0,101	SE	<i>SNX19</i>	7,86E-05	4,15E-03	0,146
A3SS	<i>ECI2</i>	7,82E-09	2,70E-06	0,101	A5SS	<i>RNASEK-C17orf49</i>	1,28E-04	7,47E-03	0,146
MXE	<i>ANXA2</i>	6,21E-05	3,35E-03	0,101	A3SS	<i>SETD4</i>	1,79E-04	8,72E-03	0,146
SE	<i>PICALM</i>	1,00E-06	1,26E-04	0,100	A5SS	<i>BZW1</i>	3,11E-07	4,82E-05	0,142
A5SS	<i>PACRGL</i>	4,66E-06	5,36E-04	0,100	MXE	<i>DMKN</i>	3,84E-06	3,30E-04	0,142
SE	<i>USP13</i>	3,68E-05	2,46E-03	0,098	MXE	<i>DMKN</i>	4,02E-05	1,96E-03	0,142
SE	<i>CBWD2</i>	1,11E-05	9,22E-04	0,098	MXE	<i>AUTS2</i>	1,72E-04	5,90E-03	0,142
SE	<i>PMS1</i>	4,32E-05	2,76E-03	0,098	A5SS	<i>TRA2A</i>	1,31E-04	7,53E-03	0,141
MXE	<i>KIF1C</i>	8,49E-05	4,14E-03	0,098	MXE	<i>ARHGAP24</i>	8,24E-06	5,85E-04	0,141
SE	<i>GK</i>	8,61E-05	4,80E-03	0,097	SE	<i>ALPK2</i>	5,70E-05	3,27E-03	0,140
A5SS	<i>SNHG5</i>	1,08E-08	3,91E-06	0,097	MXE	<i>TSPAN5</i>	1,77E-04	6,00E-03	0,140
SE	<i>UBN1</i>	6,92E-06	6,17E-04	0,096	SE	<i>SEC24B</i>	1,70E-04	7,68E-03	0,138
SE	<i>CANT1</i>	4,05E-12	2,73E-09	0,096	SE	<i>IQCB1</i>	1,10E-13	7,86E-11	0,138
A5SS	<i>NT5C</i>	1,91E-05	1,64E-03	0,096	SE	<i>SLC12A9</i>	1,52E-04	7,00E-03	0,136
A3SS	<i>NOP16</i>	3,32E-09	1,32E-06	0,096	SE	<i>MRPS31P4</i>	1,74E-04	7,79E-03	0,136
MXE	<i>UQCRH</i>	2,22E-16	1,78E-13	0,096	SE	<i>IRF3</i>	2,15E-05	1,52E-03	0,136
SE	<i>MIR4435-2HG</i>	8,57E-05	4,80E-03	0,095	SE	<i>CALD1</i>	1,31E-07	2,17E-05	0,136
A3SS	<i>CDK10</i>	8,13E-07	1,51E-04	0,095	SE	<i>CACNA2D1</i>	1,92E-05	1,38E-03	0,136
A5SS	<i>PSMC3IP</i>	3,76E-08	9,65E-06	0,094	SE	<i>DAB1</i>	1,64E-04	7,45E-03	0,135
SE	<i>MTCL1</i>	1,41E-09	4,98E-07	0,093	SE	<i>AC009053.1</i>	1,78E-05	1,31E-03	0,135
MXE	<i>TBC1D12</i>	6,12E-05	3,33E-03	0,093	MXE	<i>FAM45A</i>	3,88E-09	9,42E-07	0,135
RI	<i>CTSA</i>	3,86E-08	1,96E-05	0,093	MXE	<i>TRAPPC10</i>	1,22E-04	4,43E-03	0,135
SE	<i>TACC2</i>	1,16E-05	9,51E-04	0,092	SE	<i>SREBF1</i>	2,41E-05	1,66E-03	0,134
SE	<i>VCPKMT</i>	7,36E-10	2,85E-07	0,092	SE	<i>RHOC</i>	3,61E-09	9,64E-07	0,134
SE	<i>IQCB1</i>	5,06E-06	4,78E-04	0,092	MXE	<i>CCDC66</i>	2,39E-04	7,35E-03	0,134
A3SS	<i>PLD3</i>	1,96E-10	1,84E-07	0,092	SE	<i>NLN</i>	2,32E-06	2,50E-04	0,133
SE	<i>EF1E1-BLOC1S5</i>	9,75E-05	5,29E-03	0,091	SE	<i>LETMD1</i>	9,77E-05	4,94E-03	0,133
SE	<i>UPF3A</i>	1,45E-04	7,10E-03	0,090	SE	<i>C1QTNF6</i>	1,08E-04	5,39E-03	0,133
SE	<i>DMKN</i>	2,25E-05	1,62E-03	0,090	SE	<i>RNMT</i>	1,96E-05	1,40E-03	0,132
A5SS	<i>GIT2</i>	1,02E-05	9,70E-04	0,090	SE	<i>PDPR</i>	1,07E-05	8,87E-04	0,132
SE	<i>POSTN</i>	8,24E-08	1,53E-05	0,089	SE	<i>ALDH3B1</i>	3,17E-05	2,09E-03	0,132
MXE	<i>NMRAL1</i>	3,62E-12	1,35E-09	0,089	A5SS	<i>CDV3</i>	1,60E-07	2,63E-05	0,132
SE	<i>RNF14</i>	6,45E-06	5,87E-04	0,088	SE	<i>TMEM230</i>	4,51E-09	1,17E-06	0,131
A5SS	<i>PARP10</i>	2,76E-06	3,54E-04	0,088	SE	<i>CD59</i>	6,22E-05	3,48E-03	0,131
SE	<i>ARIH2</i>	2,63E-05	1,83E-03	0,087	SE	<i>PTK2</i>	2,19E-04	9,31E-03	0,131
MXE	<i>RBM23</i>	1,74E-09	3,62E-07	0,087	MXE	<i>HLA-A</i>	4,63E-06	3,84E-04	0,131
MXE	<i>RBM23</i>	8,25E-10	2,01E-07	0,087	SE	<i>RAC2</i>	1,03E-04	5,19E-03	0,130
SE	<i>RHOQ</i>	1,69E-08	4,14E-06	0,086	MXE	<i>INMT-MINDY4</i>	1,40E-04	4,98E-03	0,130
SE	<i>AH1</i>	1,73E-05	1,30E-03	0,086	SE	<i>RHOC</i>	3,52E-07	5,17E-05	0,129
SE	<i>PIK3C2A</i>	1,68E-05	1,27E-03	0,085	SE	<i>KIAA1211</i>	1,02E-04	5,12E-03	0,129
SE	<i>CLDND1</i>	3,99E-14	3,58E-11	0,085	A5SS	<i>MBD5</i>	1,39E-04	7,66E-03	0,128
SE	<i>TROVE2</i>	8,66E-05	4,81E-03	0,085	MXE	<i>LASP1</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,128
A5SS	<i>SLC22A17</i>	8,41E-05	5,61E-03	0,085	SE	<i>UBQLN1</i>	3,67E-06	3,65E-04	0,127
A3SS	<i>MOSPD3</i>	2,81E-05	2,69E-03	0,085	A5SS	<i>UPP1</i>	1,16E-06	1,33E-04	0,126
A3SS	<i>IDH3G</i>	3,53E-07	7,94E-05	0,085	SE	<i>AUTS2</i>	5,34E-05	3,12E-03	0,124
MXE	<i>CASK</i>	7,97E-07	9,12E-05	0,085	A3SS	<i>TBC1D31</i>	1,04E-05	1,15E-03	0,124
SE	<i>SETMAR</i>	1,39E-04	6,85E-03	0,084	MXE	<i>ZEB2</i>	4,40E-07	5,63E-05	0,124
SE	<i>RFX8</i>	6,51E-05	3,86E-03	0,084	SE	<i>TNRC6A</i>	1,11E-04	5,47E-03	0,123
SE	<i>PRKD1</i>	6,24E-09	1,87E-06	0,084	A3SS	<i>MORF4L2</i>	2,91E-07	7,47E-05	0,123
SE	<i>PEX14</i>	1,46E-04	7,14E-03	0,084	A3SS	<i>HSF1</i>	2,50E-06	3,97E-04	0,123
A5SS	<i>SRSF5</i>	2,72E-06	3,54E-04	0,084	MXE	<i>FAM45A</i>	5,36E-07	6,51E-05	0,123
SE	<i>RSPH3</i>	1,01E-04	5,46E-03	0,083	SE	<i>COL6A3</i>	5,04E-10	1,70E-07	0,122
SE	<i>ANK2</i>	1,92E-08	4,57E-06	0,083	A3SS	<i>NME7</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,122
SE	<i>PDSS2</i>	4,04E-05	2,62E-03	0,082	A3SS	<i>CLCC1</i>	1,25E-04	7,07E-03	0,122
SE	<i>ALG8</i>	1,50E-08	3,75E-06	0,082	MXE	<i>VPS13B</i>	3,32E-04	9,55E-03	0,122
A5SS	<i>ING4</i>	2,40E-07	4,99E-05	0,082	MXE	<i>EIF4E</i>	2,11E-15	1,86E-12	0,122
A3SS	<i>HACE1</i>	2,49E-05	2,57E-03	0,082	MXE	<i>GUSBP11</i>	2,70E-05	1,47E-03	0,121
SE	<i>KIF13A</i>	5,50E-05	3,36E-03	0,081	SE	<i>NID1</i>	8,13E-06	7,12E-04	0,120
A5SS	<i>RPL7L1</i>	2,99E-08	8,31E-06	0,080	SE	<i>SCFD1</i>	5,09E-07	7,06E-05	0,120
A3SS	<i>MYL5</i>	4,48E-08	1,36E-05	0,080	SE	<i>PRUNE1</i>	3,26E-05	2,14E-03	0,120
MXE	<i>POLR2K</i>	7,79E-06	6,33E-04	0,079	A5SS	<i>UBQLN1</i>	2,91E-05	2,19E-03	0,120
SE	<i>ZFYVE16</i>	3,08E-10	1,34E-07	0,078	A3SS	<i>TRAF4</i>	4,74E-06	6,37E-04	0,120
A3SS	<i>RNF181</i>	4,80E-05	4,01E-03	0,078	SE	<i>FOPNL</i>	5,19E-08	9,65E-06	0,119
A3SS	<i>WRNIP1</i>	1,32E-04	8,78E-03	0,078	MXE	<i>HP1BP3</i>	8,62E-05	3,39E-03	0,119
MXE	<i>CAST</i>	2,12E-06	2,05E-04	0,078	MXE	<i>ATP2B1</i>	1,01E-07	1,63E-05	0,119
MXE	<i>JPT2</i>	5,01E-05	2,83E-03	0,078	SE	<i>PIGQ</i>	3,34E-07	4,94E-05	0,118
SE	<i>NDUFV3</i>	4,38E-05	2,78E-03	0,077	SE	<i>PDSS2</i>	4,80E-05	2,87E-03	0,118
SE	<i>C11orf49</i>	3,87E-05	2,55E-03	0,077	SE	<i>ENKD1</i>	1,98E-04	8,64E-03	0,118

SE	IDH2	4,68E-05	2,96E-03	0,077	SE	PPP1R12A	3,41E-06	3,44E-04	0,118
A5SS	TANGO2	1,23E-04	6,96E-03	0,077	A3SS	SMTN	1,24E-09	6,38E-07	0,118
A3SS	COG2	9,03E-05	6,40E-03	0,077	MXE	ATG13	2,57E-04	7,76E-03	0,118
MXE	ZNF561	7,76E-07	9,06E-05	0,077	SE	ST6GALNAC6	2,05E-04	8,87E-03	0,117
MXE	CD44	4,40E-05	2,58E-03	0,077	MXE	RFWD2	1,38E-04	4,94E-03	0,117
SE	CTTN	9,88E-06	8,39E-04	0,076	MXE	TBC1D2	5,77E-05	2,50E-03	0,117
SE	SLC25A40	8,96E-05	4,96E-03	0,076	SE	PSG4	0,00E+00	0,00E+00	0,116
MXE	FUNDC1	9,59E-06	7,26E-04	0,076	MXE	PTMA	2,84E-12	1,25E-09	0,116
SE	INPP1	1,60E-08	3,96E-06	0,075	MXE	B4GALT6	7,77E-06	5,71E-04	0,116
SE	ENPP2	1,06E-04	5,63E-03	0,074	SE	SNX16	1,30E-04	6,17E-03	0,115
SE	HEPH	1,23E-04	6,33E-03	0,074	MXE	DPH2	2,94E-04	8,63E-03	0,115
SE	MYO1B	9,01E-06	7,80E-04	0,074	SE	AC093752.1	4,40E-05	2,70E-03	0,114
MXE	CRTAP	1,04E-04	4,84E-03	0,074	SE	IL17RC	1,80E-07	2,82E-05	0,114
SE	ARPC1B	1,14E-04	5,97E-03	0,072	MXE	CCNYL1	8,30E-06	5,85E-04	0,114
SE	LINC01184	1,26E-04	6,41E-03	0,072	MXE	CAST	8,79E-05	3,44E-03	0,114
A5SS	C7orf49	8,93E-07	1,55E-04	0,072	SE	ANO6	1,39E-04	6,48E-03	0,113
MXE	EIF3H	5,33E-05	2,96E-03	0,072	SE	SNX17	1,27E-04	6,04E-03	0,113
MXE	HAUS1	1,13E-04	5,23E-03	0,072	SE	PGS1	4,61E-05	2,78E-03	0,112
SE	TMTC1	1,04E-04	5,56E-03	0,071	SE	C19orf47	2,59E-05	1,77E-03	0,112
MXE	RILPL2	5,73E-08	8,23E-06	0,071	SE	MBNL1	1,28E-05	1,01E-03	0,112
SE	TNRC6A	2,98E-10	1,31E-07	0,070	MXE	LETMD1	1,99E-06	1,87E-04	0,112
SE	GEMIN6	1,11E-16	1,41E-13	0,070	MXE	FUNDC1	8,04E-12	3,15E-09	0,112
SE	IKBIP	1,04E-04	5,57E-03	0,070	A5SS	PSMC3IP	1,37E-09	4,95E-07	0,111
MXE	EIF3H	4,06E-05	2,53E-03	0,070	A3SS	BTN3A3	8,08E-05	5,17E-03	0,111
MXE	MAP4K4	9,80E-05	4,62E-03	0,070	A3SS	ARHGAP5	6,34E-05	4,47E-03	0,111
MXE	UBAP2L	8,42E-05	4,14E-03	0,070	A3SS	C3orf67	9,79E-05	5,81E-03	0,110
SE	AACS	7,07E-05	4,12E-03	0,069	SE	ST3GAL4	6,73E-06	6,09E-04	0,109
SE	SPATS2L	9,15E-05	5,04E-03	0,069	MXE	RGL1	7,89E-05	3,22E-03	0,109
A5SS	LARP7	1,23E-04	6,96E-03	0,069	MXE	PGM2	5,37E-06	4,35E-04	0,109
MXE	UBE2D2	2,52E-04	9,56E-03	0,069	A5SS	SNHG5	4,76E-13	2,87E-10	0,108
SE	HNRNPM	1,85E-04	8,67E-03	0,068	A3SS	QTRT1	5,07E-05	3,86E-03	0,108
SE	PLEKHM2	4,57E-08	9,46E-06	0,068	SE	GK	7,51E-06	6,68E-04	0,107
SE	NUTM2B-AS1	1,71E-05	1,28E-03	0,068	SE	NPRL3	1,12E-04	5,50E-03	0,107
SE	SMARCAL1	1,28E-04	6,50E-03	0,068	SE	ARIH2	1,34E-04	6,30E-03	0,107
A3SS	KIF23	7,49E-09	2,70E-06	0,068	SE	FRMD8	9,07E-05	4,65E-03	0,107
SE	PAK1	1,15E-06	1,40E-04	0,067	MXE	USP14	2,46E-05	1,36E-03	0,107
SE	MRPS5	4,71E-06	4,50E-04	0,067	MXE	POLR2B	2,27E-07	3,14E-05	0,107
SE	CAPRIN2	4,51E-06	4,37E-04	0,067	MXE	TRAPPC13	4,00E-05	1,96E-03	0,107
SE	DPM1	3,71E-12	2,54E-09	0,067	MXE	PARN	1,18E-04	4,31E-03	0,106
A3SS	TMEM120A	3,84E-07	7,95E-05	0,067	MXE	KCTD20	1,31E-04	4,72E-03	0,106
A3SS	APBB2	6,41E-06	8,96E-04	0,067	MXE	COL5A1	8,57E-14	4,65E-11	0,106
MXE	WASHC2C	1,91E-04	7,81E-03	0,067	A3SS	MOSPD3	3,10E-07	7,61E-05	0,105
A5SS	EPS15L1	2,09E-05	1,74E-03	0,066	RI	ZNF692	3,88E-05	5,73E-03	0,105
SE	MARCH7	6,73E-06	6,03E-04	0,065	SE	MCM3	1,97E-06	2,17E-04	0,104
MXE	ASCC2	3,21E-09	5,80E-07	0,065	A5SS	MTMR14	2,52E-05	1,98E-03	0,104
MXE	FLOT1	7,94E-06	6,36E-04	0,065	MXE	ST7L	3,52E-04	9,99E-03	0,104
A5SS	TVP23C	9,35E-06	9,45E-04	0,064	SE	ARHGAP12	1,27E-06	1,51E-04	0,103
A3SS	CENPK	6,70E-05	4,95E-03	0,063	SE	SNX16	4,02E-13	2,61E-10	0,103
MXE	CASP8	2,02E-04	8,19E-03	0,063	SE	MYL6	3,42E-09	9,17E-07	0,103
SE	ANKRD49	1,24E-05	1,00E-03	0,062	SE	PLXND1	1,73E-04	7,77E-03	0,103
SE	DFFB	3,62E-05	2,43E-03	0,062	A5SS	NT5C	5,22E-08	1,05E-05	0,103
SE	EIF4G3	1,51E-08	3,77E-06	0,062	SE	LRBA	1,80E-04	8,03E-03	0,102
SE	ARFGAP2	1,96E-06	2,21E-04	0,062	SE	TRAF3IP2-AS1	1,10E-05	9,07E-04	0,102
SE	CPNE3	6,61E-06	6,01E-04	0,062	SE	TROVE2	1,01E-05	8,40E-04	0,102
MXE	NBPF26	8,26E-09	1,29E-06	0,062	SE	OARD1	2,34E-04	9,76E-03	0,102
SE	ASAP1	8,40E-05	4,75E-03	0,061	MXE	RBFOX2	3,96E-05	1,96E-03	0,102
A5SS	HLA-A	0,00E+00	0,00E+00	0,061	SE	GID4	2,27E-04	9,55E-03	0,101
MXE	AC118553.2	8,41E-06	6,54E-04	0,061	SE	ABCD4	1,92E-04	8,45E-03	0,101
MXE	TMEM14B	1,12E-06	1,23E-04	0,061	A5SS	ZC3H18	1,94E-04	9,37E-03	0,101
SE	AKIP1	9,15E-07	1,16E-04	0,060	A5SS	SMIM29	2,14E-05	1,72E-03	0,101
SE	ACADM	1,23E-04	6,32E-03	0,060	A3SS	MPHOSPH9	1,90E-04	9,18E-03	0,101
SE	TCEA1	7,24E-05	4,20E-03	0,060	MXE	DMKN	1,83E-05	1,09E-03	0,101
SE	CDK10	3,17E-07	4,82E-05	0,060	MXE	LARS	1,62E-04	5,70E-03	0,101
SE	GABPB2	3,07E-07	4,71E-05	0,059	MXE	SH3YL1	1,38E-04	4,94E-03	0,101
SE	STARD10	4,68E-06	4,49E-04	0,059	RI	BTN3A1	2,08E-05	3,84E-03	0,101
SE	HMG5	9,12E-05	5,03E-03	0,059	SE	PYM1	1,14E-06	1,40E-04	0,100
A5SS	CENPK	1,04E-04	6,40E-03	0,059	MXE	SCPEP1	1,00E-04	3,82E-03	0,100
SE	DMKN	1,39E-04	6,85E-03	0,058	MXE	PHYH	1,04E-05	6,87E-04	0,100
SE	CNN2	1,13E-04	5,93E-03	0,058	MXE	EPS15	4,10E-05	1,96E-03	0,100
SE	STARD3NL	1,38E-04	6,84E-03	0,058	MXE	CHEK2	8,83E-05	3,44E-03	0,100

SE	CD44	1,37E-04	6,81E-03	0,057	MXE	MYO18A	5,21E-05	2,29E-03	0,100
SE	NUMB	2,37E-05	1,70E-03	0,057	SE	CERS5	1,53E-05	1,17E-03	0,099
SE	PCBP2	1,18E-06	1,43E-04	0,056	MXE	ZDHHC4	1,32E-07	1,90E-05	0,099
SE	PIIP5K2	1,61E-04	7,77E-03	0,056	SE	ADAM23	1,25E-04	6,01E-03	0,098
MXE	DYNLT1	6,14E-06	5,12E-04	0,056	A3SS	ADA	2,59E-05	2,32E-03	0,098
MXE	DMKN	1,17E-09	2,65E-07	0,056	MXE	TOR1AIP1	7,88E-06	5,72E-04	0,098
SE	MAP3K3	1,83E-05	1,36E-03	0,055	MXE	ARMCX3	4,53E-05	2,08E-03	0,098
MXE	SRSF11	4,16E-05	2,54E-03	0,055	SE	RNF14	4,78E-07	6,72E-05	0,097
SE	PXDC1	0,00E+00	0,00E+00	0,054	SE	CEP162	5,50E-05	3,19E-03	0,097
SE	RAI14	1,57E-05	1,20E-03	0,054	SE	GTPBP8	1,61E-04	7,35E-03	0,097
SE	TBCEL	6,64E-05	3,92E-03	0,054	A5SS	RPL41	1,17E-06	1,33E-04	0,097
A5SS	CFL2	2,00E-06	2,89E-04	0,054	A3SS	ACACA	1,35E-04	7,37E-03	0,097
MXE	PPA2	1,16E-13	7,22E-11	0,054	A3SS	ERBB2	6,80E-05	4,62E-03	0,097
SE	APITD1-CORT	1,92E-05	1,42E-03	0,053	A3SS	SORBS3	1,28E-04	7,15E-03	0,097
SE	WASHC3	6,78E-12	4,23E-09	0,053	MXE	ELL2	2,98E-04	8,67E-03	0,097
A3SS	KNTC1	4,53E-05	3,84E-03	0,053	SE	MIR100HG	1,25E-05	9,92E-04	0,096
A3SS	PAAF1	5,74E-06	8,46E-04	0,053	MXE	COL6A3	1,90E-06	1,81E-04	0,096
A3SS	TMEM147	1,61E-04	9,59E-03	0,053	MXE	ZUFSP	2,52E-04	7,64E-03	0,096
MXE	TPM2	3,78E-13	2,12E-10	0,053	SE	WDR11	5,70E-05	3,27E-03	0,095
MXE	CD151	1,23E-09	2,65E-07	0,053	A3SS	ACSL4	3,10E-05	2,61E-03	0,095
MXE	CD44	6,70E-08	9,17E-06	0,053	SE	PEX1	2,33E-04	9,73E-03	0,094
SE	LINC-PINT	4,00E-05	2,60E-03	0,052	MXE	ERMARD	2,67E-04	8,05E-03	0,094
SE	PSTPIP2	2,49E-05	1,77E-03	0,052	MXE	SNX2	4,77E-05	2,17E-03	0,094
SE	ADD1	5,82E-11	3,10E-08	0,052	MXE	MUC1	7,12E-09	1,52E-06	0,094
A5SS	SKIL	1,13E-04	6,71E-03	0,052	MXE	ITGB1	4,41E-05	2,05E-03	0,094
A5SS	B4GALT4	6,65E-06	7,39E-04	0,052	A3SS	SLC25A39	2,06E-04	9,84E-03	0,093
A5SS	HNRNPC	1,10E-04	6,65E-03	0,052	MXE	LETMD1	1,07E-06	1,17E-04	0,093
MXE	FRA10AC1	1,93E-06	1,93E-04	0,052	MXE	DMKN	1,31E-07	1,90E-05	0,093
MXE	ANXA2	1,24E-05	8,87E-04	0,052	MXE	CAPRIN2	7,76E-05	3,18E-03	0,093
SE	HSPH1	3,54E-06	3,62E-04	0,051	SE	DLG1	1,68E-05	1,26E-03	0,092
SE	ATPAF1	1,14E-06	1,40E-04	0,051	SE	TIMMDC1	1,84E-07	2,87E-05	0,092
A3SS	ZNF512	5,74E-05	4,55E-03	0,051	A5SS	RFX5	1,86E-04	9,15E-03	0,092
MXE	MICA	2,47E-04	9,42E-03	0,051	MXE	TBL1XR1	1,89E-05	1,11E-03	0,092
MXE	APP	3,22E-06	2,87E-04	0,051	MXE	PPP2R5C	1,75E-06	1,73E-04	0,092
SE	FAS	8,39E-11	4,20E-08	0,050	MXE	SNRPN	2,05E-05	1,19E-03	0,092
A5SS	FAM173B	4,95E-05	3,51E-03	0,050	MXE	ARHGEF12	6,64E-06	5,20E-04	0,092
MXE	APOPT1	5,24E-07	6,38E-05	0,050	MXE	KRI1	1,06E-05	6,90E-04	0,092
MXE	LRRC75A-AS1	1,42E-12	6,14E-10	0,050	SE	CAST	5,68E-09	1,41E-06	0,091
SE	SMYD3	2,59E-07	4,13E-05	-0,050	SE	PQLC3	4,12E-08	8,05E-06	0,091
SE	TMCO3	1,30E-05	1,04E-03	-0,050	SE	FHAD1	1,86E-04	8,24E-03	0,091
SE	PFDN1	8,52E-09	2,40E-06	-0,050	SE	KRI1	2,02E-04	8,79E-03	0,091
SE	ETFA	9,10E-06	7,86E-04	-0,050	SE	SLC12A6	2,32E-04	9,69E-03	0,091
SE	FUT8	3,98E-05	2,59E-03	-0,051	SE	CAPRIN2	9,41E-09	2,20E-06	0,090
SE	PPP4C	1,31E-06	1,56E-04	-0,051	A3SS	LRRC75A-AS1	5,39E-05	4,00E-03	0,090
SE	MLLT1	1,22E-04	6,29E-03	-0,051	MXE	SF1	1,19E-06	1,24E-04	0,090
SE	RABL3	2,04E-05	1,50E-03	-0,052	MXE	SNRPN	1,74E-05	1,04E-03	0,090
SE	CAST	1,43E-05	1,12E-03	-0,052	MXE	UGDH	3,55E-05	1,84E-03	0,090
SE	GUK1	4,10E-06	4,08E-04	-0,052	A5SS	ING4	2,22E-08	5,73E-06	0,089
SE	RABGGTB	4,82E-06	4,57E-04	-0,053	SE	RHOC	1,82E-06	2,04E-04	0,088
SE	RBM25	6,35E-05	3,78E-03	-0,053	MXE	GNPMB	7,35E-07	8,22E-05	0,088
SE	DCAF11	7,53E-06	6,67E-04	-0,053	MXE	PYROXD1	4,35E-05	2,05E-03	0,088
SE	C12orf10	3,97E-05	2,59E-03	-0,053	SE	ZFYVE16	1,13E-10	4,56E-08	0,087
SE	MAP9	6,23E-06	5,70E-04	-0,053	SE	GLT8D1	6,74E-06	6,09E-04	0,087
SE	C18orf8	5,51E-05	3,36E-03	-0,053	A3SS	POMZP3	8,21E-07	1,49E-04	0,087
SE	BLOC1S6	9,34E-08	1,70E-05	-0,054	MXE	SH3KBP1	2,09E-04	6,63E-03	0,087
SE	ELN	8,19E-08	1,53E-05	-0,054	SE	AP000769.1	1,75E-05	1,30E-03	0,086
SE	TMEM135	2,07E-04	9,47E-03	-0,054	MXE	ITGA11	2,55E-12	1,20E-09	0,086
SE	DPH7	4,02E-06	4,03E-04	-0,054	MXE	ITGB1	6,39E-05	2,70E-03	0,086
SE	ADPGK	1,31E-04	6,59E-03	-0,054	SE	LINC00339	3,40E-06	3,43E-04	0,085
SE	LYRM1	8,80E-05	4,89E-03	-0,054	SE	BBS4	7,62E-05	4,06E-03	0,085
SE	DNAJB14	1,60E-05	1,22E-03	-0,054	SE	FLOT1	1,95E-04	8,55E-03	0,085
SE	YEATS2	1,50E-05	1,16E-03	-0,055	MXE	DHTKD1	2,33E-04	7,27E-03	0,085
SE	CSPP1	5,53E-05	3,38E-03	-0,055	MXE	PRPF3	8,03E-05	3,22E-03	0,085
SE	DOCK5	1,01E-08	2,70E-06	-0,055	SE	SIRT6	2,14E-05	1,52E-03	0,084
SE	MRPS28	8,27E-06	7,29E-04	-0,055	SE	KLC1	1,91E-04	8,41E-03	0,084
SE	AZIN1	3,88E-07	5,71E-05	-0,056	A3SS	IDH3G	3,97E-07	9,20E-05	0,084
SE	TNC	5,83E-12	3,75E-09	-0,056	MXE	CCDC18-AS1	1,49E-10	5,01E-08	0,084
SE	L3MBTL2	1,24E-04	6,36E-03	-0,056	MXE	CD46	2,97E-05	1,58E-03	0,084
SE	PREPL	3,34E-06	3,47E-04	-0,056	MXE	PTMA	7,95E-06	5,72E-04	0,084
SE	HAUS1	1,62E-04	7,82E-03	-0,056	SE	SETD5	6,18E-09	1,48E-06	0,083

SE	<i>DMKN</i>	1,67E-05	1,27E-03	-0,057	A5SS	<i>SMG7</i>	3,99E-06	3,91E-04	0,083
SE	<i>USE1</i>	6,72E-05	3,95E-03	-0,057	MXE	<i>CDKN3</i>	9,57E-08	1,61E-05	0,083
SE	<i>DIS3L</i>	1,34E-04	6,66E-03	-0,057	MXE	<i>HACD1</i>	2,51E-04	7,64E-03	0,083
SE	<i>PPIL4</i>	7,05E-10	2,76E-07	-0,057	MXE	<i>ACADM</i>	5,60E-05	2,44E-03	0,083
SE	<i>LSM2</i>	1,26E-05	1,02E-03	-0,058	SE	<i>CBWD1</i>	5,70E-05	3,27E-03	0,082
SE	<i>COG4</i>	2,21E-05	1,60E-03	-0,058	A3SS	<i>ALG12</i>	3,68E-05	2,96E-03	0,082
SE	<i>PTPN12</i>	8,08E-07	1,06E-04	-0,058	MXE	<i>COL12A1</i>	5,82E-06	4,66E-04	0,082
SE	<i>IL11RA</i>	1,74E-04	8,25E-03	-0,059	MXE	<i>RAB13</i>	1,10E-05	7,14E-04	0,082
SE	<i>LGMN</i>	5,58E-06	5,20E-04	-0,059	SE	<i>TMTC1</i>	1,06E-04	5,31E-03	0,081
SE	<i>TFIP11</i>	6,19E-06	5,69E-04	-0,059	SE	<i>CCT6P3</i>	2,24E-07	3,42E-05	0,081
SE	<i>MACF1</i>	1,11E-07	1,99E-05	-0,059	SE	<i>USP13</i>	2,47E-05	1,69E-03	0,081
SE	<i>BFAR</i>	4,57E-12	3,03E-09	-0,059	SE	<i>DMKN</i>	1,68E-04	7,59E-03	0,080
SE	<i>FKBP7</i>	6,21E-10	2,50E-07	-0,059	SE	<i>ANK2</i>	1,90E-08	4,08E-06	0,080
SE	<i>BFAR</i>	1,11E-07	1,99E-05	-0,060	SE	<i>MMAB</i>	1,23E-11	6,53E-09	0,080
SE	<i>C8orf59</i>	5,03E-08	1,02E-05	-0,061	SE	<i>ARID4B</i>	2,39E-04	9,92E-03	0,080
SE	<i>CCDC25</i>	1,26E-04	6,41E-03	-0,061	SE	<i>ASPSCR1</i>	2,09E-04	9,02E-03	0,080
SE	<i>DIS3L</i>	5,91E-05	3,56E-03	-0,061	SE	<i>HNRNP11</i>	6,22E-05	3,48E-03	0,079
SE	<i>NT5C3B</i>	7,05E-08	1,36E-05	-0,061	SE	<i>XPNPEP1</i>	9,09E-06	7,76E-04	0,079
SE	<i>AC144548.2</i>	1,38E-05	1,09E-03	-0,062	MXE	<i>DYNLT1</i>	5,33E-15	4,17E-12	0,079
SE	<i>NUTF2</i>	6,02E-08	1,18E-05	-0,062	MXE	<i>RALB</i>	5,54E-07	6,51E-05	0,079
SE	<i>SETD2</i>	1,03E-04	5,55E-03	-0,063	MXE	<i>CRTAP</i>	7,48E-05	3,08E-03	0,079
SE	<i>HEBP2</i>	8,47E-05	4,77E-03	-0,063	SE	<i>DNAL1</i>	4,34E-06	4,22E-04	0,078
SE	<i>METTL1</i>	1,80E-05	1,35E-03	-0,063	SE	<i>PARD3</i>	2,38E-04	9,88E-03	0,078
SE	<i>SNHG5</i>	4,69E-10	1,94E-07	-0,063	A3SS	<i>PPP6R2</i>	6,42E-07	1,29E-04	0,078
SE	<i>TNC</i>	1,49E-06	1,75E-04	-0,063	MXE	<i>DTWD1</i>	9,11E-06	6,18E-04	0,078
SE	<i>NLRP1</i>	7,33E-05	4,25E-03	-0,063	SE	<i>TAF8</i>	1,74E-04	7,79E-03	0,077
SE	<i>37500</i>	1,62E-04	7,81E-03	-0,064	SE	<i>MYO1B</i>	1,74E-06	1,97E-04	0,077
SE	<i>SH3BGR</i>	1,03E-05	8,65E-04	-0,064	SE	<i>INPP1</i>	1,99E-10	7,61E-08	0,077
SE	<i>CENPK</i>	3,16E-06	3,32E-04	-0,064	SE	<i>ERC1</i>	1,15E-04	5,62E-03	0,077
SE	<i>TFPT</i>	1,01E-09	3,72E-07	-0,064	MXE	<i>JPT2</i>	9,87E-06	6,63E-04	0,077
SE	<i>ARHGAP24</i>	1,20E-07	2,12E-05	-0,065	MXE	<i>XPO7</i>	3,14E-06	2,76E-04	0,077
SE	<i>STK32B</i>	4,10E-05	2,64E-03	-0,065	MXE	<i>FERMT2</i>	5,05E-05	2,24E-03	0,077
SE	<i>RABEPK</i>	1,18E-05	9,68E-04	-0,066	MXE	<i>MTMR2</i>	1,04E-04	3,90E-03	0,077
SE	<i>INIP</i>	7,98E-05	4,55E-03	-0,066	SE	<i>CAP1</i>	1,18E-06	1,43E-04	0,076
SE	<i>FAM98B</i>	2,13E-14	2,00E-11	-0,066	MXE	<i>TPM1</i>	1,99E-14	1,27E-11	0,076
SE	<i>SPIDR</i>	1,19E-04	6,17E-03	-0,067	MXE	<i>SETDB2</i>	3,34E-04	9,58E-03	0,076
SE	<i>DPP7</i>	2,20E-08	5,16E-06	-0,067	MXE	<i>COL12A1</i>	1,70E-04	5,90E-03	0,076
SE	<i>NOL8</i>	8,93E-07	1,14E-04	-0,067	SE	<i>WIPF2</i>	1,01E-04	5,08E-03	0,075
SE	<i>RPS24</i>	3,39E-06	3,48E-04	-0,067	A3SS	<i>MORF4L2</i>	4,39E-06	6,05E-04	0,075
SE	<i>STK19</i>	4,51E-06	4,37E-04	-0,067	A3SS	<i>ERMARD</i>	2,41E-05	2,26E-03	0,075
SE	<i>P4HA2</i>	8,02E-08	1,51E-05	-0,069	MXE	<i>MARK3</i>	2,35E-04	7,27E-03	0,075
SE	<i>LINCO1881</i>	1,67E-05	1,26E-03	-0,069	MXE	<i>PAFAH1B1</i>	1,31E-05	8,11E-04	0,074
SE	<i>WASHC3</i>	7,13E-05	4,14E-03	-0,069	MXE	<i>KPNA3</i>	2,54E-05	1,39E-03	0,074
SE	<i>TRIM26</i>	2,59E-06	2,78E-04	-0,069	SE	<i>PCBP2</i>	1,32E-04	6,23E-03	0,073
SE	<i>MORC3</i>	7,89E-09	2,28E-06	-0,069	SE	<i>MICAL1</i>	6,49E-05	3,60E-03	0,073
SE	<i>LIAS</i>	4,43E-06	4,32E-04	-0,070	A3SS	<i>NOP16</i>	1,42E-07	4,44E-05	0,073
SE	<i>MAIP1</i>	2,83E-05	1,95E-03	-0,070	A3SS	<i>NAGK</i>	5,77E-06	7,39E-04	0,073
SE	<i>C4orf33</i>	1,80E-05	1,35E-03	-0,070	MXE	<i>ADH5</i>	1,16E-05	7,41E-04	0,073
SE	<i>CDK11B</i>	3,26E-13	2,51E-10	-0,070	MXE	<i>ALDH1L2</i>	2,34E-04	7,27E-03	0,073
SE	<i>INF2</i>	2,05E-05	1,50E-03	-0,071	MXE	<i>RAP1B</i>	8,72E-06	6,03E-04	0,073
SE	<i>SPIDR</i>	7,70E-05	4,42E-03	-0,072	MXE	<i>UBE3C</i>	1,79E-04	6,04E-03	0,073
SE	<i>TMX2</i>	7,83E-05	4,48E-03	-0,072	SE	<i>CUEDC1</i>	2,21E-05	1,56E-03	0,072
SE	<i>SNHG5</i>	8,95E-09	2,47E-06	-0,072	SE	<i>PAK1</i>	6,27E-10	2,08E-07	0,072
SE	<i>SCFD1</i>	6,86E-10	2,74E-07	-0,072	SE	<i>CIZ1</i>	1,44E-04	6,69E-03	0,072
SE	<i>PKIG</i>	7,38E-05	4,27E-03	-0,072	A5SS	<i>NTMT1</i>	7,89E-05	4,92E-03	0,072
SE	<i>FN1</i>	1,06E-06	1,31E-04	-0,073	MXE	<i>COL6A3</i>	1,11E-07	1,75E-05	0,072
SE	<i>PCNT</i>	2,17E-04	9,82E-03	-0,073	MXE	<i>USP45</i>	1,97E-04	6,43E-03	0,072
SE	<i>IL17RC</i>	3,09E-05	2,12E-03	-0,074	MXE	<i>ZWILCH</i>	5,04E-07	6,35E-05	0,072
SE	<i>LRRC75A-AS1</i>	1,37E-08	3,54E-06	-0,074	SE	<i>SLC35D2</i>	3,34E-06	3,39E-04	0,071
SE	<i>TIMM50</i>	6,37E-05	3,78E-03	-0,074	SE	<i>TRIM26</i>	5,13E-05	3,01E-03	0,071
SE	<i>NOL8</i>	4,08E-07	5,91E-05	-0,074	SE	<i>UBE2B</i>	3,03E-05	2,01E-03	0,071
SE	<i>CDK10</i>	1,02E-06	1,28E-04	-0,074	SE	<i>ROBO3</i>	1,41E-04	6,57E-03	0,071
SE	<i>EMG1</i>	1,71E-09	5,99E-07	-0,075	MXE	<i>METTL6</i>	1,51E-04	5,36E-03	0,071
SE	<i>DMKN</i>	9,76E-14	8,24E-11	-0,075	MXE	<i>P4HB</i>	6,80E-05	2,84E-03	0,071
SE	<i>IQCB1</i>	4,00E-05	2,60E-03	-0,075	SE	<i>NAP1L4</i>	3,18E-05	2,09E-03	0,070
SE	<i>WDR37</i>	8,49E-06	7,45E-04	-0,075	SE	<i>SPG20</i>	1,22E-05	9,76E-04	0,070
SE	<i>LRRC75A-AS1</i>	3,47E-09	1,11E-06	-0,076	MXE	<i>CASK</i>	7,25E-07	8,22E-05	0,070
SE	<i>SLC30A5</i>	1,45E-05	1,13E-03	-0,077	MXE	<i>DYNCL12</i>	1,73E-04	5,93E-03	0,070
SE	<i>SP110</i>	4,69E-05	2,96E-03	-0,077	MXE	<i>DDB1</i>	4,28E-05	2,03E-03	0,070
SE	<i>UBA2</i>	2,68E-08	6,00E-06	-0,077	MXE	<i>WASHC2C</i>	2,95E-08	5,78E-06	0,070

SE	<i>TJAP1</i>	7,97E-09	2,29E-06	-0,078	MXE	<i>COPS2</i>	2,86E-05	1,53E-03	0,070
SE	<i>AURKB</i>	4,73E-05	2,98E-03	-0,078	SE	<i>NUDT6</i>	2,59E-06	2,74E-04	0,069
SE	<i>PLGRKT</i>	2,45E-06	2,66E-04	-0,079	SE	<i>ASAP1</i>	1,89E-06	2,10E-04	0,069
SE	<i>PGAP2</i>	1,98E-04	9,18E-03	-0,079	SE	<i>EPB41L1</i>	1,84E-04	8,17E-03	0,069
SE	<i>FLOT1</i>	5,55E-15	5,43E-12	-0,079	A5SS	<i>EPS15L1</i>	1,87E-04	9,15E-03	0,069
SE	<i>MRPS28</i>	1,31E-05	1,05E-03	-0,079	A5SS	<i>PARP10</i>	1,35E-04	7,65E-03	0,069
SE	<i>EIF2D</i>	8,23E-07	1,07E-04	-0,080	A3SS	<i>APBB2</i>	1,46E-05	1,53E-03	0,069
SE	<i>POCS</i>	3,36E-06	3,47E-04	-0,081	MXE	<i>EIF4E</i>	8,35E-05	3,31E-03	0,069
SE	<i>ENTPD6</i>	2,53E-05	1,80E-03	-0,081	SE	<i>RETREG3</i>	1,26E-04	6,03E-03	0,068
SE	<i>ACAN</i>	2,70E-11	1,57E-08	-0,081	SE	<i>PPIP5K2</i>	7,07E-06	6,34E-04	0,068
SE	<i>ATXN2L</i>	6,04E-08	1,18E-05	-0,081	SE	<i>CPNE3</i>	1,19E-05	9,59E-04	0,068
SE	<i>IP6K2</i>	1,70E-04	8,13E-03	-0,082	A5SS	<i>C7orf49</i>	1,88E-05	1,62E-03	0,068
SE	<i>POLR3B</i>	3,63E-06	3,69E-04	-0,083	A3SS	<i>TMEM41B</i>	1,74E-05	1,75E-03	0,068
SE	<i>SNHG5</i>	1,49E-08	3,75E-06	-0,083	A3SS	<i>WASHC4</i>	5,77E-07	1,21E-04	0,068
SE	<i>AURKB</i>	5,42E-05	3,33E-03	-0,083	MXE	<i>SRSF11</i>	1,19E-06	1,24E-04	0,068
SE	<i>ERCC1</i>	1,22E-09	4,39E-07	-0,084	MXE	<i>FGFR1</i>	9,04E-05	3,50E-03	0,068
SE	<i>PREPL</i>	7,07E-06	6,30E-04	-0,086	SE	<i>PRR16</i>	1,07E-10	4,39E-08	0,067
SE	<i>ACSF3</i>	9,25E-06	7,97E-04	-0,087	SE	<i>HNRNPH1</i>	3,80E-09	1,00E-06	0,067
SE	<i>GSN</i>	1,57E-06	1,82E-04	-0,087	A3SS	<i>TARBP2</i>	5,01E-06	6,57E-04	0,067
SE	<i>ZC3HC1</i>	2,76E-05	1,91E-03	-0,087	MXE	<i>TSPAN3</i>	5,26E-05	2,30E-03	0,067
SE	<i>TCTN3</i>	8,53E-09	2,40E-06	-0,088	SE	<i>TFDP1</i>	1,90E-05	1,37E-03	0,066
SE	<i>RPS2</i>	5,36E-05	3,30E-03	-0,088	SE	<i>TWF1</i>	4,63E-08	8,81E-06	0,066
SE	<i>AP2M1</i>	5,06E-07	7,08E-05	-0,088	SE	<i>TMEM14B</i>	1,67E-06	1,91E-04	0,066
SE	<i>SNHG6</i>	3,02E-09	9,99E-07	-0,088	MXE	<i>SERPINE1</i>	3,15E-05	1,66E-03	0,066
SE	<i>MGST1</i>	3,75E-07	5,56E-05	-0,089	MXE	<i>SLMAP</i>	2,02E-05	1,18E-03	0,066
SE	<i>CDC25C</i>	3,28E-07	4,97E-05	-0,089	SE	<i>R3HDM2</i>	8,72E-05	4,52E-03	0,065
SE	<i>TOLLIP</i>	3,74E-05	2,49E-03	-0,089	SE	<i>GFM2</i>	3,49E-07	5,13E-05	0,065
SE	<i>CD44</i>	6,64E-05	3,92E-03	-0,089	A3SS	<i>KIF23</i>	6,61E-05	4,55E-03	0,065
SE	<i>FLOT1</i>	3,31E-09	1,08E-06	-0,089	MXE	<i>GNB1</i>	6,73E-06	5,21E-04	0,065
SE	<i>DDHD2</i>	9,76E-06	8,34E-04	-0,090	MXE	<i>ZZZ3</i>	2,76E-04	8,24E-03	0,065
SE	<i>AC093668.1</i>	2,17E-05	1,58E-03	-0,090	SE	<i>DGKZ</i>	2,40E-05	1,66E-03	0,064
SE	<i>RTKN</i>	3,45E-05	2,33E-03	-0,090	SE	<i>ZNF217</i>	6,28E-06	5,76E-04	0,064
SE	<i>DIS3L</i>	1,21E-05	9,89E-04	-0,090	SE	<i>POC1B</i>	1,28E-04	6,10E-03	0,064
SE	<i>NDUFA6</i>	6,53E-05	3,87E-03	-0,090	SE	<i>ZBTB80S</i>	4,18E-06	4,09E-04	0,064
SE	<i>RASA3</i>	1,74E-07	2,89E-05	-0,091	MXE	<i>FAM133B</i>	1,01E-07	1,63E-05	0,064
SE	<i>AL121594.3</i>	4,72E-06	4,50E-04	-0,091	SE	<i>TRIM32</i>	1,25E-04	6,01E-03	0,063
SE	<i>GZF1</i>	1,40E-07	2,40E-05	-0,091	SE	<i>CA5BP1</i>	1,25E-04	6,00E-03	0,063
SE	<i>FBXL4</i>	8,20E-08	1,53E-05	-0,091	SE	<i>DHX40</i>	3,76E-05	2,39E-03	0,063
SE	<i>DCN</i>	4,53E-09	1,41E-06	-0,091	A3SS	<i>MYL5</i>	1,44E-04	7,57E-03	0,063
SE	<i>CLSPN</i>	5,06E-07	7,08E-05	-0,091	A3SS	<i>CDK10</i>	3,61E-06	5,22E-04	0,063
SE	<i>TRABD</i>	5,09E-05	3,15E-03	-0,092	MXE	<i>RSU1</i>	4,19E-08	7,77E-06	0,063
SE	<i>MFHAS1</i>	1,83E-06	2,08E-04	-0,092	MXE	<i>FLAD1</i>	5,93E-05	2,55E-03	0,063
SE	<i>SLMAP</i>	1,22E-05	9,94E-04	-0,092	MXE	<i>COL3A1</i>	1,72E-04	5,90E-03	0,063
SE	<i>HLCS</i>	1,56E-04	7,59E-03	-0,092	SE	<i>TFDP2</i>	7,90E-05	4,16E-03	0,062
SE	<i>ULK2</i>	3,76E-06	3,81E-04	-0,093	A3SS	<i>MAN2A2</i>	3,10E-06	4,73E-04	0,062
SE	<i>SNX11</i>	9,27E-07	1,17E-04	-0,093	MXE	<i>CCDC90B</i>	3,08E-04	8,89E-03	0,062
SE	<i>N4BP2L2</i>	1,31E-04	6,59E-03	-0,094	SE	<i>ETFA</i>	3,18E-09	8,72E-07	0,061
SE	<i>APP</i>	2,89E-09	9,65E-07	-0,094	SE	<i>SLC25A40</i>	8,23E-05	4,31E-03	0,061
SE	<i>NSFL1C</i>	1,56E-06	1,81E-04	-0,095	A5SS	<i>NPRL2</i>	1,71E-04	8,77E-03	0,061
SE	<i>PLCB4</i>	8,94E-05	4,95E-03	-0,095	SE	<i>GEMIN6</i>	2,50E-13	1,69E-10	0,060
SE	<i>ABHD11</i>	1,15E-04	6,02E-03	-0,095	SE	<i>DHRX</i>	1,12E-04	5,51E-03	0,060
SE	<i>NMRAL1</i>	2,75E-06	2,94E-04	-0,095	SE	<i>NDUFB2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,060
SE	<i>APOPT1</i>	2,32E-06	2,54E-04	-0,096	SE	<i>ZDHHC20</i>	1,51E-06	1,75E-04	0,060
SE	<i>RUFY3</i>	7,55E-08	1,45E-05	-0,096	SE	<i>MAP2K1</i>	3,72E-05	2,38E-03	0,060
SE	<i>DFNA5</i>	4,38E-08	9,21E-06	-0,096	A5SS	<i>RPL7L1</i>	4,61E-07	6,42E-05	0,060
SE	<i>GCFC2</i>	1,56E-04	7,58E-03	-0,096	A3SS	<i>MORF4L2</i>	6,39E-06	8,01E-04	0,060
SE	<i>C8orf59</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,097	A3SS	<i>HLA-C</i>	6,66E-16	6,26E-13	0,060
SE	<i>AC093157.1</i>	1,81E-04	8,51E-03	-0,097	MXE	<i>AC004922.1</i>	8,59E-08	1,48E-05	0,060
SE	<i>BBS1</i>	1,16E-04	6,06E-03	-0,097	SE	<i>MARCH7</i>	2,66E-07	3,97E-05	0,059
SE	<i>KIAA0586</i>	4,75E-08	9,70E-06	-0,097	A3SS	<i>SPDL1</i>	4,28E-07	9,29E-05	0,059
SE	<i>DMKN</i>	6,77E-07	9,06E-05	-0,098	A3SS	<i>PLD3</i>	1,64E-04	8,32E-03	0,059
SE	<i>PMS2P1</i>	6,73E-06	6,03E-04	-0,099	A3SS	<i>AIG1</i>	6,45E-05	4,49E-03	0,059
SE	<i>SPPL2A</i>	5,31E-05	3,27E-03	-0,100	MXE	<i>KDELC1</i>	1,13E-06	1,20E-04	0,059
SE	<i>NOL8</i>	5,24E-07	7,28E-05	-0,100	MXE	<i>ETFA</i>	8,25E-14	4,65E-11	0,059
SE	<i>MDC1</i>	4,93E-07	6,99E-05	-0,101	MXE	<i>CASP8</i>	1,40E-05	8,54E-04	0,059
SE	<i>ZNF253</i>	1,04E-04	5,55E-03	-0,101	SE	<i>CLDND1</i>	5,66E-06	5,31E-04	0,058
SE	<i>FAM228B</i>	1,16E-04	6,03E-03	-0,102	SE	<i>WDR41</i>	1,18E-05	9,59E-04	0,058
SE	<i>DHFR</i>	3,73E-08	8,00E-06	-0,102	SE	<i>GTPBP1</i>	1,77E-05	1,31E-03	0,058
SE	<i>TAF1D</i>	1,07E-08	2,84E-06	-0,103	SE	<i>LRRC37A3</i>	1,36E-04	6,38E-03	0,057
SE	<i>PTPRS</i>	3,09E-08	6,76E-06	-0,103	SE	<i>TANK</i>	9,25E-05	4,73E-03	0,057
SE	<i>ZNF561</i>	1,11E-06	1,37E-04	-0,104	SE	<i>SLC25A13</i>	2,36E-04	9,81E-03	0,057

SE	<i>IL11RA</i>	6,83E-05	3,99E-03	-0,104	SE	<i>OTUD3</i>	2,12E-04	9,08E-03	0,057
SE	<i>LINC01578</i>	1,38E-06	1,64E-04	-0,104	A5SS	<i>STRADA</i>	1,72E-04	8,77E-03	0,057
SE	<i>PDCD6</i>	1,25E-08	3,25E-06	-0,104	A3SS	<i>MORF4L2</i>	3,02E-05	2,58E-03	0,057
SE	<i>SLC35B2</i>	1,47E-10	6,80E-08	-0,105	A3SS	<i>HACE1</i>	1,61E-04	8,25E-03	0,057
SE	<i>SNX15</i>	4,03E-06	4,03E-04	-0,106	A3SS	<i>TMEM147</i>	8,34E-06	9,65E-04	0,057
SE	<i>C1orf50</i>	3,16E-05	2,16E-03	-0,106	MXE	<i>ACSF2</i>	7,40E-05	3,07E-03	0,057
SE	<i>DMTF1</i>	1,57E-06	1,82E-04	-0,106	SE	<i>NDUFB2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,056
SE	<i>ANP32E</i>	3,30E-07	4,99E-05	-0,107	A3SS	<i>THBS3</i>	1,17E-04	6,80E-03	0,056
SE	<i>PLAGL1</i>	2,82E-07	4,36E-05	-0,108	MXE	<i>SH3KBP1</i>	1,28E-05	8,08E-04	0,056
SE	<i>MBD5</i>	1,67E-04	8,02E-03	-0,110	MXE	<i>AUP1</i>	4,09E-05	1,96E-03	0,056
SE	<i>PRR16</i>	2,72E-07	4,28E-05	-0,112	MXE	<i>APP</i>	2,01E-09	5,25E-07	0,056
SE	<i>TPM2</i>	1,73E-04	8,22E-03	-0,112	MXE	<i>PPP1R12A</i>	2,67E-08	5,39E-06	0,056
SE	<i>MELK</i>	8,47E-06	7,44E-04	-0,112	MXE	<i>MUC1</i>	1,07E-04	3,95E-03	0,055
SE	<i>SAAL1</i>	2,55E-05	1,80E-03	-0,112	SE	<i>EXOSC3</i>	6,63E-06	6,02E-04	0,054
SE	<i>SKA2</i>	1,37E-11	8,29E-09	-0,113	SE	<i>EI24</i>	8,06E-10	2,60E-07	0,054
SE	<i>ADAMTSL4</i>	1,58E-04	7,64E-03	-0,113	SE	<i>SLC25A14</i>	9,12E-06	7,76E-04	0,054
SE	<i>TIMELESS</i>	4,74E-08	9,70E-06	-0,113	SE	<i>ST3GAL3</i>	9,16E-05	4,69E-03	0,054
SE	<i>C11orf70</i>	2,94E-05	2,02E-03	-0,113	MXE	<i>CD99</i>	2,44E-04	7,49E-03	0,054
SE	<i>BBS1</i>	1,31E-04	6,59E-03	-0,114	MXE	<i>NARS2</i>	2,51E-05	1,38E-03	0,054
SE	<i>IFI27L1</i>	7,14E-07	9,49E-05	-0,116	RI	<i>RBM8A</i>	8,04E-05	9,88E-03	0,054
SE	<i>RABEPK</i>	5,63E-06	5,24E-04	-0,117	SE	<i>ITGB1</i>	4,48E-05	2,73E-03	0,053
SE	<i>DMKN</i>	2,61E-12	1,84E-09	-0,117	A5SS	<i>KIAA1109</i>	8,05E-08	1,53E-05	0,053
SE	<i>C5orf42</i>	6,53E-08	1,27E-05	-0,118	MXE	<i>SCP2</i>	3,08E-07	4,10E-05	0,053
SE	<i>CASP8</i>	1,34E-04	6,67E-03	-0,119	MXE	<i>TFDP2</i>	3,65E-05	1,86E-03	0,053
SE	<i>SENP3</i>	1,29E-05	1,04E-03	-0,119	SE	<i>SNX21</i>	8,94E-05	4,61E-03	0,052
SE	<i>AASDH</i>	9,73E-05	5,28E-03	-0,120	SE	<i>GPX8</i>	9,39E-05	4,78E-03	0,052
SE	<i>PALB2</i>	4,95E-07	7,00E-05	-0,120	SE	<i>CD9</i>	1,32E-05	1,03E-03	0,052
SE	<i>SCAP</i>	5,46E-08	1,09E-05	-0,120	MXE	<i>CCNY</i>	1,30E-05	8,11E-04	0,052
SE	<i>NMRAL1</i>	1,11E-05	9,22E-04	-0,120	MXE	<i>TRIM37</i>	1,63E-04	5,71E-03	0,052
SE	<i>TUSC3</i>	2,07E-06	2,32E-04	-0,121	RI	<i>IL32</i>	1,94E-05	3,84E-03	0,052
SE	<i>POU6F1</i>	3,10E-07	4,74E-05	-0,122	SE	<i>PRPSAP2</i>	9,02E-05	4,64E-03	0,051
SE	<i>APOPT1</i>	1,52E-05	1,18E-03	-0,123	SE	<i>UBQLN1</i>	1,70E-06	1,94E-04	0,051
SE	<i>L3MBTL2</i>	4,31E-06	4,24E-04	-0,124	SE	<i>XPNPEP1</i>	4,19E-05	2,61E-03	0,051
SE	<i>GALT</i>	2,50E-07	4,02E-05	-0,125	SE	<i>NEPRO</i>	1,99E-04	8,69E-03	0,051
SE	<i>RASSF8</i>	2,67E-05	1,85E-03	-0,125	SE	<i>PLXND1</i>	3,35E-07	4,94E-05	0,051
SE	<i>RNF135</i>	1,97E-07	3,20E-05	-0,126	MXE	<i>SUPT7L</i>	1,87E-04	6,23E-03	0,051
SE	<i>IDI1</i>	1,45E-06	1,72E-04	-0,127	SE	<i>MTFR1</i>	6,49E-07	8,60E-05	0,050
SE	<i>IKKBK</i>	3,20E-05	2,18E-03	-0,127	SE	<i>LSM12</i>	2,55E-07	3,82E-05	0,050
SE	<i>TMX2</i>	1,94E-05	1,43E-03	-0,128	SE	<i>PRSS12</i>	7,69E-10	2,50E-07	0,050
SE	<i>MAP3K10</i>	1,73E-04	8,22E-03	-0,128	SE	<i>ZNF131</i>	1,32E-04	6,25E-03	0,050
SE	<i>AKR1E2</i>	8,34E-05	4,72E-03	-0,128	SE	<i>DSCC1</i>	8,46E-05	4,42E-03	0,050
SE	<i>FKBP7</i>	1,71E-06	1,97E-04	-0,129	A3SS	<i>MLST8</i>	1,25E-04	7,07E-03	0,050
SE	<i>ARMCX2</i>	6,48E-07	8,75E-05	-0,130	A3SS	<i>HNRNPUL1</i>	7,79E-05	5,17E-03	0,050
SE	<i>WASHC2C</i>	9,46E-05	5,19E-03	-0,131	A3SS	<i>RPS6KB2</i>	1,05E-04	6,17E-03	0,050
SE	<i>KIAA0586</i>	1,59E-05	1,22E-03	-0,131	A3SS	<i>ZC3H14</i>	6,37E-09	3,00E-06	0,050
SE	<i>MRPS10</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,132	MXE	<i>ASCC2</i>	2,06E-04	6,60E-03	0,050
SE	<i>CASP8</i>	1,76E-04	8,31E-03	-0,132	SE	<i>UGP2</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,050
SE	<i>NMRAL1</i>	1,34E-05	1,06E-03	-0,132	SE	<i>ZDHHC3</i>	8,22E-05	4,31E-03	-0,050
SE	<i>GCSH</i>	3,12E-08	6,79E-06	-0,133	SE	<i>CENPE</i>	1,83E-04	8,12E-03	-0,050
SE	<i>FBLN2</i>	8,38E-07	1,09E-04	-0,134	SE	<i>C2CD5</i>	1,96E-04	8,58E-03	-0,050
SE	<i>ZNF451</i>	6,80E-05	3,98E-03	-0,134	SE	<i>NLRP1</i>	7,69E-05	4,09E-03	-0,050
SE	<i>COL16A1</i>	5,94E-08	1,17E-05	-0,135	SE	<i>NUTF2</i>	4,59E-08	8,77E-06	-0,051
SE	<i>NPRL3</i>	2,78E-09	9,36E-07	-0,135	SE	<i>EMX2OS</i>	1,03E-05	8,57E-04	-0,051
SE	<i>SNX27</i>	4,19E-06	4,15E-04	-0,136	SE	<i>UBE2F</i>	6,15E-09	1,48E-06	-0,052
SE	<i>GTPBP10</i>	9,40E-05	5,16E-03	-0,138	SE	<i>P4HA2</i>	2,80E-10	1,03E-07	-0,052
SE	<i>TMX2</i>	2,55E-05	1,80E-03	-0,138	SE	<i>ANKRD27</i>	4,98E-05	2,94E-03	-0,052
SE	<i>LMBR1L</i>	1,17E-04	6,07E-03	-0,138	SE	<i>UFD1</i>	3,90E-07	5,66E-05	-0,052
SE	<i>PMS1</i>	5,30E-05	3,27E-03	-0,138	SE	<i>MINDY3</i>	4,49E-08	8,67E-06	-0,052
SE	<i>EXO5</i>	4,50E-07	6,40E-05	-0,138	SE	<i>SEC22B</i>	5,45E-09	1,37E-06	-0,052
SE	<i>UAP1</i>	2,07E-04	9,47E-03	-0,139	SE	<i>FHOD3</i>	7,47E-05	3,99E-03	-0,052
SE	<i>COX20</i>	6,52E-09	1,92E-06	-0,141	SE	<i>POLK</i>	1,34E-04	6,30E-03	-0,052
SE	<i>ANKS3</i>	1,78E-04	8,38E-03	-0,141	SE	<i>LRRC75A-AS1</i>	1,50E-08	3,33E-06	-0,053
SE	<i>CSF1</i>	2,82E-07	4,36E-05	-0,142	SE	<i>POSTN</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,053
SE	<i>POLK</i>	3,79E-07	5,58E-05	-0,142	SE	<i>CLOCK</i>	7,89E-05	4,16E-03	-0,053
SE	<i>NUPL2</i>	7,84E-09	2,28E-06	-0,142	SE	<i>METTL1</i>	1,63E-06	1,87E-04	-0,053
SE	<i>ECHDC2</i>	5,95E-05	3,58E-03	-0,142	SE	<i>PKIG</i>	1,57E-08	3,44E-06	-0,053
SE	<i>MRPS18C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,143	SE	<i>C18orf8</i>	3,76E-06	3,71E-04	-0,053
SE	<i>MRPS18C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,144	SE	<i>IP6K2</i>	4,59E-09	1,19E-06	-0,053
SE	<i>INPP5F</i>	1,47E-06	1,73E-04	-0,144	SE	<i>CLTA</i>	1,09E-04	5,41E-03	-0,054
SE	<i>DENND6A</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,146	SE	<i>TMCO3</i>	2,64E-11	1,29E-08	-0,054
SE	<i>VRK1</i>	1,83E-08	4,44E-06	-0,146	SE	<i>RASAL2</i>	8,39E-11	3,54E-08	-0,054

SE	CACFD1	1,15E-04	6,01E-03	-0,147	SE	ULK4	1,17E-07	1,99E-05	-0,054
SE	NR1H3	1,94E-04	9,01E-03	-0,147	SE	UBE3B	5,61E-05	3,23E-03	-0,055
SE	DMKN	4,65E-06	4,47E-04	-0,148	SE	SMC5	2,99E-06	3,08E-04	-0,055
SE	MICAL1	7,27E-08	1,40E-05	-0,148	SE	ANKRD6	4,14E-05	2,59E-03	-0,055
SE	ANKS3	2,10E-04	9,56E-03	-0,150	SE	C18orf8	1,05E-06	1,31E-04	-0,055
SE	ULK4	8,26E-11	4,18E-08	-0,151	SE	ULK4	3,45E-06	3,46E-04	-0,055
SE	USP13	1,13E-06	1,39E-04	-0,152	SE	XPNPEP1	8,09E-06	7,10E-04	-0,055
SE	MAP4K2	2,56E-06	2,76E-04	-0,152	SE	LUC7L	1,52E-05	1,17E-03	-0,056
SE	CEP164	1,39E-06	1,64E-04	-0,153	SE	AZIN1	5,46E-07	7,47E-05	-0,056
SE	PRMT2	1,87E-04	8,79E-03	-0,154	SE	TJAP1	2,24E-05	1,57E-03	-0,056
SE	MFSO8	8,58E-05	4,80E-03	-0,155	SE	WARS	2,27E-10	8,62E-08	-0,056
SE	RSU1	0,00E+00	0,00E+00	-0,156	SE	WARS	4,09E-11	1,87E-08	-0,056
SE	ARMCX2	1,37E-05	1,09E-03	-0,156	SE	BFAR	5,66E-12	3,18E-09	-0,056
SE	GGCT	3,83E-05	2,53E-03	-0,156	SE	OARD1	7,14E-05	3,86E-03	-0,056
SE	TP73-AS1	8,16E-05	4,63E-03	-0,158	SE	SDHAP1	5,72E-06	5,34E-04	-0,057
SE	C8orf59	0,00E+00	0,00E+00	-0,159	SE	MYEF2	2,60E-05	1,77E-03	-0,057
SE	DMKN	1,55E-06	1,80E-04	-0,160	SE	LSM2	6,62E-05	3,65E-03	-0,057
SE	PDLIM2	1,60E-07	2,69E-05	-0,160	SE	HIKESHI	4,05E-06	3,98E-04	-0,057
SE	MEM256-PLSCR	2,50E-05	1,78E-03	-0,161	SE	COMMD10	4,31E-05	2,67E-03	-0,057
SE	DMKN	2,11E-04	9,59E-03	-0,161	SE	TNRC6A	2,22E-05	1,56E-03	-0,058
SE	CDK10	1,85E-05	1,37E-03	-0,161	SE	MFHAS1	4,58E-05	2,77E-03	-0,058
SE	PUS1	5,30E-06	4,98E-04	-0,162	SE	RAB3IP	4,85E-05	2,88E-03	-0,058
SE	RBM14-RBM4	7,75E-06	6,86E-04	-0,163	SE	GSN	1,73E-05	1,29E-03	-0,058
SE	TAZ	3,89E-05	2,56E-03	-0,163	SE	FAM98B	5,87E-12	3,26E-09	-0,058
SE	GUF1	6,26E-09	1,87E-06	-0,164	SE	CCDC58	3,78E-08	7,48E-06	-0,058
SE	RAB3IL1	6,05E-07	8,21E-05	-0,165	SE	DIS3L	8,61E-05	4,47E-03	-0,058
SE	GALT	3,43E-08	7,39E-06	-0,165	SE	MCRIP1	1,32E-11	6,91E-09	-0,058
SE	DNAH14	3,37E-06	3,47E-04	-0,166	SE	FKBP7	1,64E-09	4,95E-07	-0,058
SE	CPNE7	1,12E-06	1,38E-04	-0,166	SE	BLOC1S6	2,87E-09	7,96E-07	-0,059
SE	NSFL1C	1,74E-06	1,99E-04	-0,167	SE	ING4	1,22E-09	3,75E-07	-0,059
SE	ULK4	8,84E-09	2,46E-06	-0,167	SE	NT5C3B	4,14E-09	1,08E-06	-0,059
SE	NDUFA5	1,69E-05	1,27E-03	-0,167	SE	ANO10	1,57E-05	1,19E-03	-0,060
SE	PHF14	4,26E-05	2,73E-03	-0,167	SE	DIS3L	4,64E-05	2,80E-03	-0,060
SE	MCM8	2,04E-04	9,37E-03	-0,168	SE	OXSRI	2,84E-08	5,73E-06	-0,060
SE	ANAPC16	8,30E-10	3,16E-07	-0,169	SE	DMKN	7,60E-06	6,73E-04	-0,061
SE	PRDM5	5,42E-05	3,33E-03	-0,170	SE	ZNF766	1,88E-07	2,93E-05	-0,061
SE	AKR1E2	4,71E-06	4,50E-04	-0,170	SE	RIN3	1,07E-04	5,34E-03	-0,061
SE	ZNF561	4,43E-06	4,32E-04	-0,171	SE	LGMN	1,05E-04	5,26E-03	-0,062
SE	TRPT1	1,63E-05	1,24E-03	-0,171	SE	TBC1D22A	1,07E-05	8,87E-04	-0,062
SE	ARHGDI1	1,39E-08	3,57E-06	-0,173	SE	SEPHS1	4,59E-05	2,78E-03	-0,062
SE	GTPBP8	2,57E-08	5,82E-06	-0,173	SE	WARS	1,78E-10	6,88E-08	-0,062
SE	ARHGEF19	8,56E-07	1,11E-04	-0,175	SE	BFAR	1,55E-10	6,04E-08	-0,062
SE	ZNF766	6,00E-15	5,74E-12	-0,176	SE	EEF1G	1,07E-09	3,39E-07	-0,062
SE	ELMOD3	1,47E-05	1,14E-03	-0,177	SE	CD46	1,72E-05	1,28E-03	-0,063
SE	CDK10	2,51E-08	5,74E-06	-0,180	SE	ATXN2L	8,91E-05	4,61E-03	-0,063
SE	SHOC2	2,90E-05	2,00E-03	-0,181	SE	PCGF3	7,23E-05	3,89E-03	-0,064
SE	PCBP1-AS1	1,50E-06	1,76E-04	-0,181	SE	MRPS18C	8,92E-05	4,61E-03	-0,064
SE	NUMA1	2,02E-04	9,28E-03	-0,181	SE	RAD51C	6,25E-06	5,76E-04	-0,065
SE	ABCD4	1,32E-04	6,60E-03	-0,182	SE	POSTN	8,88E-06	7,62E-04	-0,065
SE	NT5C3B	1,46E-08	3,71E-06	-0,182	SE	DDX50	1,72E-04	7,73E-03	-0,065
SE	ELOC	5,77E-06	5,33E-04	-0,183	SE	C17orf62	1,34E-04	6,32E-03	-0,065
SE	MTERF4	1,34E-05	1,07E-03	-0,186	SE	CNTN3	2,36E-06	2,54E-04	-0,065
SE	UQCC1	1,18E-06	1,43E-04	-0,188	SE	TMEM55A	8,34E-05	4,36E-03	-0,065
SE	MRPL55	1,61E-05	1,22E-03	-0,189	SE	MANBAL	2,37E-05	1,64E-03	-0,065
SE	USP45	3,59E-07	5,37E-05	-0,191	SE	NAGLU	5,41E-05	3,15E-03	-0,066
SE	DMKN	5,10E-09	1,57E-06	-0,191	SE	IFT81	9,54E-05	4,84E-03	-0,066
SE	VCPKMT	6,37E-09	1,89E-06	-0,192	SE	ARHGAP24	2,73E-11	1,31E-08	-0,067
SE	SLMAP	7,95E-07	1,04E-04	-0,192	SE	AFMID	2,59E-05	1,77E-03	-0,067
SE	KIAA0141	1,05E-04	5,59E-03	-0,197	SE	CCDC92	4,79E-09	1,23E-06	-0,067
SE	SLC52A2	8,59E-06	7,52E-04	-0,199	SE	HNRNPDL	7,48E-05	3,99E-03	-0,067
SE	IL11RA	1,89E-04	8,85E-03	-0,200	SE	SCFD1	3,30E-10	1,16E-07	-0,067
SE	PPF1BP1	1,42E-07	2,42E-05	-0,202	SE	RPS2	4,71E-07	6,64E-05	-0,067
SE	MYNN	1,29E-07	2,25E-05	-0,202	SE	WARS	2,57E-10	9,53E-08	-0,067
SE	TNC	5,79E-08	1,15E-05	-0,202	SE	DTWD1	2,10E-06	2,30E-04	-0,067
SE	USMG5	9,18E-14	7,91E-11	-0,202	SE	P4HA2	1,12E-04	5,50E-03	-0,068
SE	ALS2CR12	1,18E-04	6,12E-03	-0,208	SE	POP4	2,40E-10	9,06E-08	-0,068
SE	PCBP1-AS1	4,33E-07	6,18E-05	-0,213	SE	SNHG5	4,13E-14	3,09E-11	-0,068
SE	ACO06001.2	3,64E-07	5,41E-05	-0,218	SE	SNU13	1,99E-05	1,42E-03	-0,068
SE	MLF1	2,55E-05	1,80E-03	-0,219	SE	RHOBTB1	1,83E-04	8,13E-03	-0,068
SE	RPAIN	8,53E-05	4,79E-03	-0,219	SE	AZIN1	1,11E-05	9,09E-04	-0,069

SE	<i>SFXN4</i>	1,27E-10	6,00E-08	-0,227	SE	<i>NVL</i>	5,59E-07	7,61E-05	-0,069
SE	<i>HNRNPA2B1</i>	4,87E-05	3,04E-03	-0,229	SE	<i>OPN3</i>	5,45E-07	7,47E-05	-0,069
SE	<i>ABI3BP</i>	4,23E-06	4,18E-04	-0,233	SE	<i>NOL8</i>	1,21E-08	2,72E-06	-0,069
SE	<i>C9orf3</i>	5,44E-07	7,51E-05	-0,233	SE	<i>FUT8</i>	1,17E-06	1,43E-04	-0,070
SE	<i>SDCCAG3</i>	9,08E-07	1,16E-04	-0,233	SE	<i>AUP1</i>	5,54E-06	5,21E-04	-0,070
SE	<i>MAP4K4</i>	1,67E-04	8,02E-03	-0,236	SE	<i>CENPK</i>	2,73E-09	7,70E-07	-0,070
SE	<i>CEBPZOS</i>	5,29E-08	1,06E-05	-0,237	SE	<i>ZNF146</i>	2,05E-04	8,88E-03	-0,070
SE	<i>STAG3L3</i>	1,34E-04	6,66E-03	-0,237	SE	<i>L3MBTL2</i>	1,13E-04	5,53E-03	-0,070
SE	<i>MARK1</i>	1,99E-04	9,19E-03	-0,242	SE	<i>EMG1</i>	5,10E-08	9,50E-06	-0,071
SE	<i>UAP1L1</i>	2,37E-08	5,48E-06	-0,244	SE	<i>COL6A3</i>	1,44E-11	7,51E-09	-0,071
SE	<i>CD44</i>	2,96E-06	3,13E-04	-0,246	SE	<i>MGST1</i>	1,26E-04	6,03E-03	-0,071
SE	<i>SDCCAG3</i>	4,05E-05	2,62E-03	-0,247	SE	<i>MIR100HG</i>	4,83E-12	2,78E-09	-0,071
SE	<i>PDCD6</i>	5,57E-11	3,00E-08	-0,249	SE	<i>RFC5</i>	1,87E-05	1,36E-03	-0,071
SE	<i>CPTP</i>	3,33E-16	3,98E-13	-0,249	SE	<i>PRR16</i>	1,14E-06	1,39E-04	-0,072
SE	<i>ZNF561</i>	1,75E-04	8,29E-03	-0,250	SE	<i>TAF1D</i>	8,49E-08	1,48E-05	-0,072
SE	<i>TMEM119</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,253	SE	<i>KIAA0586</i>	1,94E-05	1,39E-03	-0,072
SE	<i>PPT2</i>	3,24E-05	2,19E-03	-0,255	SE	<i>PPIL4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,072
SE	<i>RGS14</i>	1,32E-04	6,64E-03	-0,261	SE	<i>FER</i>	6,91E-05	3,76E-03	-0,073
SE	<i>SNHG1</i>	3,04E-12	2,11E-09	-0,261	SE	<i>TAZ</i>	1,14E-04	5,55E-03	-0,073
SE	<i>RBM14-RBM4</i>	1,81E-05	1,35E-03	-0,262	SE	<i>DFNA5</i>	2,70E-05	1,83E-03	-0,073
SE	<i>PACRGL</i>	6,16E-06	5,67E-04	-0,263	SE	<i>ERCC1</i>	1,45E-04	6,70E-03	-0,073
SE	<i>LINC00339</i>	6,11E-05	3,66E-03	-0,266	SE	<i>UEVLD</i>	3,48E-05	2,27E-03	-0,074
SE	<i>XIAP</i>	1,91E-07	3,14E-05	-0,270	SE	<i>POLR3B</i>	9,00E-06	7,70E-04	-0,074
SE	<i>AC068152.1</i>	3,27E-09	1,07E-06	-0,274	SE	<i>STAR5</i>	1,44E-04	6,69E-03	-0,074
SE	<i>MLF1</i>	1,05E-06	1,31E-04	-0,276	SE	<i>RNF14</i>	3,99E-05	2,50E-03	-0,074
SE	<i>PODN</i>	1,91E-04	8,91E-03	-0,279	SE	<i>PLSCR4</i>	4,07E-11	1,87E-08	-0,074
SE	<i>YAF2</i>	2,40E-06	2,62E-04	-0,280	SE	<i>MAGI2-AS3</i>	1,75E-04	7,82E-03	-0,074
SE	<i>NR2C2AP</i>	7,31E-11	3,84E-08	-0,282	SE	<i>APOPT1</i>	7,20E-05	3,88E-03	-0,075
SE	<i>FES</i>	7,88E-07	1,04E-04	-0,285	SE	<i>TRIM26</i>	1,16E-06	1,41E-04	-0,075
SE	<i>C5orf42</i>	1,11E-13	9,22E-11	-0,288	SE	<i>MAIP1</i>	6,03E-06	5,60E-04	-0,075
SE	<i>ABI3BP</i>	8,00E-08	1,51E-05	-0,289	SE	<i>LENG8</i>	4,92E-06	4,70E-04	-0,075
SE	<i>AL117190.1</i>	1,57E-05	1,20E-03	-0,289	SE	<i>PPM1A</i>	1,19E-04	5,77E-03	-0,076
SE	<i>RMND1</i>	1,46E-08	3,71E-06	-0,297	SE	<i>SDHAP1</i>	1,31E-05	1,03E-03	-0,076
SE	<i>NCALD</i>	3,59E-05	2,41E-03	-0,299	SE	<i>MPPE1</i>	3,03E-11	1,42E-08	-0,076
SE	<i>AGTR1</i>	1,71E-04	8,16E-03	-0,299	SE	<i>DPP8</i>	1,12E-04	5,50E-03	-0,076
SE	<i>UCHL5</i>	2,12E-06	2,35E-04	-0,301	SE	<i>SLC35B2</i>	5,94E-05	3,37E-03	-0,076
SE	<i>ZNF444</i>	2,75E-07	4,30E-05	-0,303	SE	<i>ARHGEF10</i>	2,08E-08	4,41E-06	-0,076
SE	<i>PFDN5</i>	1,70E-04	8,14E-03	-0,304	SE	<i>C8orf59</i>	1,47E-14	1,17E-11	-0,077
SE	<i>RFX2</i>	7,83E-08	1,49E-05	-0,307	SE	<i>RNF111</i>	2,18E-04	9,28E-03	-0,077
SE	<i>UBXN2B</i>	5,79E-05	3,50E-03	-0,311	SE	<i>NOL8</i>	2,56E-09	7,31E-07	-0,077
SE	<i>U2AF1L4</i>	2,44E-14	2,24E-11	-0,311	SE	<i>THAP9-AS1</i>	2,34E-05	1,62E-03	-0,078
SE	<i>GALT</i>	4,50E-08	9,40E-06	-0,311	SE	<i>MDC1</i>	5,43E-07	7,47E-05	-0,078
SE	<i>NQO2</i>	1,05E-04	5,57E-03	-0,312	SE	<i>PIEZO1</i>	3,71E-09	9,80E-07	-0,079
SE	<i>ATP1B3</i>	2,06E-05	1,51E-03	-0,314	SE	<i>TFIP11</i>	1,24E-06	1,49E-04	-0,079
SE	<i>NPHP3</i>	1,07E-07	1,92E-05	-0,321	SE	<i>STK19</i>	8,14E-05	4,27E-03	-0,079
SE	<i>CCDC18</i>	5,20E-11	2,83E-08	-0,323	SE	<i>MORC3</i>	1,63E-14	1,28E-11	-0,079
SE	<i>ZNF44</i>	8,53E-05	4,79E-03	-0,324	SE	<i>PLGRKT</i>	1,48E-06	1,73E-04	-0,080
SE	<i>ZNF611</i>	1,48E-04	7,21E-03	-0,326	SE	<i>ALG13</i>	4,77E-06	4,58E-04	-0,080
SE	<i>SNUPN</i>	1,39E-04	6,85E-03	-0,329	SE	<i>TCTN3</i>	1,54E-07	2,50E-05	-0,080
SE	<i>MLF1</i>	8,83E-07	1,13E-04	-0,330	SE	<i>MRPS10</i>	5,71E-09	1,41E-06	-0,080
SE	<i>PARP12</i>	1,47E-12	1,07E-09	-0,330	SE	<i>PALB2</i>	1,40E-05	1,09E-03	-0,080
SE	<i>ZNF568</i>	4,33E-07	6,18E-05	-0,331	SE	<i>LMO7</i>	3,80E-08	7,48E-06	-0,080
SE	<i>CHEK2</i>	5,29E-12	3,45E-09	-0,332	SE	<i>RPS6KA4</i>	1,53E-05	1,17E-03	-0,080
SE	<i>AFG3L1P</i>	4,89E-05	3,05E-03	-0,333	SE	<i>COL12A1</i>	1,25E-06	1,50E-04	-0,082
SE	<i>TMEM161B-AS1</i>	5,64E-05	3,42E-03	-0,340	SE	<i>SNHG5</i>	1,23E-13	8,58E-11	-0,082
SE	<i>MTHFSD</i>	2,60E-05	1,83E-03	-0,351	SE	<i>RAD51AP1</i>	6,65E-11	2,86E-08	-0,082
SE	<i>SENP7</i>	8,75E-10	3,25E-07	-0,352	SE	<i>PHF20</i>	2,11E-04	9,08E-03	-0,083
SE	<i>C1orf112</i>	6,00E-12	3,80E-09	-0,352	SE	<i>OPA1</i>	2,26E-04	9,52E-03	-0,083
SE	<i>AC079298.3</i>	1,73E-07	2,89E-05	-0,367	SE	<i>AC135178.2</i>	2,14E-04	9,15E-03	-0,083
SE	<i>FKBP1B</i>	1,26E-06	1,51E-04	-0,375	SE	<i>DDHD2</i>	2,22E-04	9,40E-03	-0,084
SE	<i>WASHC2A</i>	1,37E-08	3,54E-06	-0,378	SE	<i>KATNA1</i>	6,77E-05	3,73E-03	-0,084
SE	<i>SH3YL1</i>	1,55E-15	1,72E-12	-0,379	SE	<i>FLOT1</i>	7,19E-09	1,72E-06	-0,084
SE	<i>RBMXL1</i>	4,05E-06	4,04E-04	-0,381	SE	<i>PIEZO2</i>	7,93E-07	1,03E-04	-0,085
SE	<i>ZNF655</i>	3,50E-10	1,51E-07	-0,385	SE	<i>IFT46</i>	5,86E-05	3,33E-03	-0,085
SE	<i>OAT</i>	2,31E-05	1,65E-03	-0,394	SE	<i>SNHG6</i>	1,63E-11	8,23E-09	-0,085
SE	<i>HDAC11</i>	4,52E-08	9,41E-06	-0,394	SE	<i>FLOT1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,085
SE	<i>TVP23C</i>	2,03E-05	1,49E-03	-0,395	SE	<i>RRBP1</i>	3,97E-07	5,74E-05	-0,086
SE	<i>C5orf42</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,404	SE	<i>NEK1</i>	3,64E-05	2,33E-03	-0,086
SE	<i>TMEM119</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,408	SE	<i>N4BP2L2</i>	1,29E-04	6,16E-03	-0,086
SE	<i>LINC01137</i>	1,08E-12	8,00E-10	-0,410	SE	<i>HACL1</i>	3,62E-05	2,33E-03	-0,087

SE	<i>PMF1</i>	3,12E-11	1,79E-08	-0,420	SE	<i>LINC00968</i>	1,12E-04	5,50E-03	-0,087
SE	<i>MECP2</i>	7,12E-07	9,49E-05	-0,422	SE	<i>DONSON</i>	2,42E-04	1,00E-02	-0,087
SE	<i>DHRS4-AS1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,432	SE	<i>PPFIBP1</i>	2,63E-10	9,69E-08	-0,088
SE	<i>THOC5</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,454	SE	<i>XG</i>	4,66E-08	8,83E-06	-0,088
SE	<i>ATP5SL</i>	1,47E-07	2,50E-05	-0,454	SE	<i>ANAPC16</i>	7,83E-05	4,14E-03	-0,088
SE	<i>CDKN2B-AS1</i>	7,43E-05	4,29E-03	-0,457	SE	<i>GATD1</i>	2,40E-05	1,66E-03	-0,089
SE	<i>DEPDC4</i>	5,03E-10	2,06E-07	-0,466	SE	<i>PGM3</i>	2,29E-07	3,49E-05	-0,089
SE	<i>CROCCP2</i>	1,94E-09	6,75E-07	-0,479	SE	<i>NPHP3</i>	3,76E-05	2,40E-03	-0,089
SE	<i>RPGRIP1L</i>	1,11E-16	1,41E-13	-0,488	SE	<i>MIR100HG</i>	1,27E-09	3,90E-07	-0,089
SE	<i>MRPL55</i>	6,70E-05	3,95E-03	-0,491	SE	<i>RASA3</i>	1,31E-07	2,17E-05	-0,090
SE	<i>RUBCNL</i>	1,79E-04	8,45E-03	-0,506	SE	<i>ACSF3</i>	9,20E-07	1,16E-04	-0,090
SE	<i>CROCCP2</i>	8,52E-10	3,19E-07	-0,523	SE	<i>FGGY</i>	3,69E-05	2,37E-03	-0,090
SE	<i>SNX11</i>	1,11E-05	9,22E-04	-0,524	SE	<i>SMARCD1</i>	1,14E-07	1,94E-05	-0,090
SE	<i>ZNF45</i>	6,32E-07	8,57E-05	-0,530	SE	<i>RNH1</i>	2,95E-06	3,06E-04	-0,090
SE	<i>DMKN</i>	4,83E-11	2,66E-08	-0,564	SE	<i>KAT2B</i>	4,97E-08	9,35E-06	-0,091
SE	<i>CROCCP2</i>	8,40E-10	3,17E-07	-0,587	SE	<i>PQLC3</i>	6,77E-08	1,20E-05	-0,091
SE	<i>ECHDC2</i>	3,53E-09	1,12E-06	-0,622	SE	<i>CLSPN</i>	4,88E-07	6,83E-05	-0,091
SE	<i>DMKN</i>	4,29E-14	3,77E-11	-0,669	SE	<i>MRPL23</i>	3,83E-05	2,43E-03	-0,092
SE	<i>ZNF561</i>	4,26E-10	1,82E-07	-0,685	SE	<i>SNX15</i>	1,24E-05	9,88E-04	-0,092
SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,814	SE	<i>LMBR1</i>	3,23E-06	3,29E-04	-0,093
SE	<i>TVP23C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,861	SE	<i>SMARCA2</i>	1,94E-08	4,12E-06	-0,093
					SE	<i>ALKBH3</i>	1,36E-04	6,37E-03	-0,093
					SE	<i>PSMG4</i>	4,59E-12	2,70E-09	-0,094
					SE	<i>SNHG5</i>	3,11E-13	2,05E-10	-0,094
					SE	<i>ARMCX2</i>	4,65E-05	2,80E-03	-0,094
					SE	<i>NUPL2</i>	7,44E-05	3,98E-03	-0,094
					SE	<i>RIN3</i>	5,39E-06	5,10E-04	-0,094
					SE	<i>PDCD6</i>	1,15E-08	2,61E-06	-0,095
					SE	<i>MARK2</i>	1,67E-07	2,68E-05	-0,096
					SE	<i>HLC5</i>	1,61E-07	2,58E-05	-0,096
					SE	<i>NDUFAF6</i>	5,78E-05	3,30E-03	-0,096
					SE	<i>POU6F1</i>	1,56E-04	7,17E-03	-0,096
					SE	<i>NMRAL1</i>	2,88E-06	3,00E-04	-0,096
					SE	<i>MAPK6</i>	6,91E-05	3,76E-03	-0,097
					SE	<i>INTS4</i>	1,91E-05	1,38E-03	-0,097
					SE	<i>RABEP2</i>	6,31E-08	1,14E-05	-0,098
					SE	<i>INTS4</i>	3,01E-07	4,47E-05	-0,098
					SE	<i>BDP1</i>	1,11E-06	1,37E-04	-0,099
					SE	<i>PMS2P1</i>	6,40E-06	5,86E-04	-0,099
					SE	<i>IKBKB</i>	2,33E-04	9,73E-03	-0,100
					SE	<i>NAA20</i>	1,88E-06	2,10E-04	-0,100
					SE	<i>ZC3HC1</i>	9,73E-06	8,20E-04	-0,100
					SE	<i>DHFR</i>	3,89E-08	7,63E-06	-0,100
					SE	<i>ELOC</i>	2,49E-07	3,75E-05	-0,101
					SE	<i>SKA2</i>	4,55E-07	6,47E-05	-0,103
					SE	<i>TEX9</i>	1,69E-07	2,70E-05	-0,103
					SE	<i>MFF</i>	2,17E-06	2,36E-04	-0,103
					SE	<i>TIMELESS</i>	4,70E-08	8,86E-06	-0,103
					SE	<i>STAG3L2</i>	1,17E-04	5,69E-03	-0,103
					SE	<i>NPRL2</i>	2,04E-04	8,86E-03	-0,103
					SE	<i>C11orf49</i>	1,19E-05	9,59E-04	-0,104
					SE	<i>USP13</i>	1,74E-06	1,97E-04	-0,104
					SE	<i>LINC01278</i>	5,67E-06	5,31E-04	-0,104
					SE	<i>NOL8</i>	4,54E-10	1,56E-07	-0,105
					SE	<i>ZNF202</i>	6,96E-05	3,79E-03	-0,105
					SE	<i>RPL10</i>	1,96E-09	5,82E-07	-0,105
					SE	<i>LMBR1</i>	2,11E-06	2,30E-04	-0,106
					SE	<i>TJAP1</i>	6,72E-06	6,09E-04	-0,106
					SE	<i>ATP9B</i>	4,80E-05	2,87E-03	-0,106
					SE	<i>AMMECR1</i>	1,87E-06	2,08E-04	-0,106
					SE	<i>CSorf42</i>	4,40E-07	6,28E-05	-0,106
					SE	<i>STXBP4</i>	9,70E-06	8,19E-04	-0,107
					SE	<i>SEMA4F</i>	1,07E-05	8,87E-04	-0,107
					SE	<i>TRABD</i>	4,32E-05	2,67E-03	-0,108
					SE	<i>APOPT1</i>	1,47E-05	1,14E-03	-0,108
					SE	<i>TMEM18</i>	4,38E-05	2,69E-03	-0,108
					SE	<i>IL15</i>	2,00E-04	8,72E-03	-0,108
					SE	<i>GALT</i>	8,47E-06	7,37E-04	-0,108
					SE	<i>FIP1L1</i>	1,99E-05	1,42E-03	-0,109
					SE	<i>MBD5</i>	1,65E-04	7,48E-03	-0,110

					SE	<i>BMPR2</i>	2,54E-06	2,70E-04	-0,110
					SE	<i>AL121594,3</i>	1,92E-07	2,96E-05	-0,111
					SE	<i>ACSF2</i>	2,37E-09	6,86E-07	-0,111
					SE	<i>CTBP2</i>	3,88E-05	2,45E-03	-0,112
					SE	<i>METTLL26</i>	2,20E-04	9,33E-03	-0,112
					SE	<i>LINC01024</i>	1,81E-05	1,32E-03	-0,112
					SE	<i>ABI3BP</i>	1,33E-06	1,58E-04	-0,113
					SE	<i>FAM210A</i>	2,17E-06	2,36E-04	-0,113
					SE	<i>C5orf22</i>	6,29E-07	8,35E-05	-0,113
					SE	<i>DMKN</i>	9,21E-05	4,71E-03	-0,113
					SE	<i>RPAIN</i>	6,52E-06	5,95E-04	-0,113
					SE	<i>P4HA2</i>	1,12E-04	5,50E-03	-0,115
					SE	<i>FAT1</i>	7,14E-05	3,86E-03	-0,115
					SE	<i>ELOC</i>	1,57E-05	1,19E-03	-0,116
					SE	<i>DRAM1</i>	1,36E-04	6,37E-03	-0,117
					SE	<i>BANF1</i>	2,20E-14	1,67E-11	-0,117
					SE	<i>ARMCX2</i>	1,95E-04	8,55E-03	-0,117
					SE	<i>GPS1</i>	2,99E-05	1,99E-03	-0,118
					SE	<i>CASP8</i>	1,32E-04	6,25E-03	-0,118
					SE	<i>MINDY1</i>	6,68E-07	8,82E-05	-0,118
					SE	<i>GCSH</i>	6,97E-06	6,26E-04	-0,118
					SE	<i>LETMD1</i>	9,14E-06	7,76E-04	-0,119
					SE	<i>PSMG4</i>	1,69E-08	3,68E-06	-0,121
					SE	<i>MRPS18C</i>	1,11E-16	1,12E-13	-0,121
					SE	<i>MFF</i>	7,11E-05	3,85E-03	-0,121
					SE	<i>VDR</i>	5,60E-05	3,23E-03	-0,122
					SE	<i>EXOG</i>	3,90E-05	2,45E-03	-0,122
					SE	<i>GEMIN2</i>	9,97E-06	8,35E-04	-0,123
					SE	<i>GPS1</i>	8,73E-06	7,53E-04	-0,123
					SE	<i>AKAP11</i>	2,40E-04	9,94E-03	-0,123
					SE	<i>EHBP1L1</i>	1,59E-06	1,83E-04	-0,124
					SE	<i>WAC-AS1</i>	1,13E-06	1,38E-04	-0,124
					SE	<i>NSFL1C</i>	2,12E-11	1,05E-08	-0,124
					SE	<i>GABARAPL1</i>	1,98E-04	8,64E-03	-0,124
					SE	<i>ZNF451</i>	7,42E-06	6,61E-04	-0,124
					SE	<i>P4HA2</i>	4,41E-05	2,70E-03	-0,125
					SE	<i>CLINT1</i>	2,92E-06	3,03E-04	-0,125
					SE	<i>KIAA1211</i>	3,56E-05	2,30E-03	-0,125
					SE	<i>MRPS18C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,125
					SE	<i>VKORC1L1</i>	2,61E-06	2,75E-04	-0,125
					SE	<i>TMEM263</i>	1,03E-04	5,20E-03	-0,125
					SE	<i>GCFC2</i>	7,39E-08	1,30E-05	-0,125
					SE	<i>GTPBP10</i>	7,60E-09	1,80E-06	-0,126
					SE	<i>SLC25A36</i>	1,24E-05	9,88E-04	-0,126
					SE	<i>C2orf74</i>	4,89E-11	2,18E-08	-0,127
					SE	<i>PML</i>	6,23E-06	5,75E-04	-0,128
					SE	<i>ANKS3</i>	7,96E-07	1,03E-04	-0,128
					SE	<i>DENND6A</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,129
					SE	<i>INO80C</i>	1,91E-05	1,38E-03	-0,130
					SE	<i>ZNF654</i>	2,61E-06	2,75E-04	-0,130
					SE	<i>CDC25C</i>	1,36E-07	2,24E-05	-0,130
					SE	<i>NMRAL1</i>	1,25E-06	1,50E-04	-0,130
					SE	<i>TMEM159</i>	9,39E-05	4,78E-03	-0,130
					SE	<i>ARHGEF19</i>	4,59E-07	6,48E-05	-0,131
					SE	<i>CASP8</i>	1,74E-04	7,80E-03	-0,131
					SE	<i>CSNK2A1</i>	2,18E-04	9,28E-03	-0,131
					SE	<i>DDB2</i>	1,23E-13	8,58E-11	-0,131
					SE	<i>MAP4K2</i>	1,45E-07	2,38E-05	-0,131
					SE	<i>GUF1</i>	4,45E-05	2,72E-03	-0,134
					SE	<i>ITSN2</i>	1,47E-05	1,14E-03	-0,134
					SE	<i>UPF3A</i>	3,14E-10	1,12E-07	-0,135
					SE	<i>SNX11</i>	1,28E-14	1,09E-11	-0,135
					SE	<i>RWDD3</i>	1,94E-06	2,14E-04	-0,135
					SE	<i>TLL3</i>	2,90E-05	1,95E-03	-0,136
					SE	<i>PTCD2</i>	1,76E-05	1,31E-03	-0,139
					SE	<i>TP73-AS1</i>	1,76E-04	7,84E-03	-0,139
					SE	<i>UQCC1</i>	4,45E-05	2,72E-03	-0,140
					SE	<i>AUP1</i>	3,59E-08	7,13E-06	-0,140
					SE	<i>VRK1</i>	1,75E-08	3,78E-06	-0,140
					SE	<i>KIAA0586</i>	2,72E-09	7,70E-07	-0,140
					SE	<i>C6orf203</i>	5,66E-12	3,18E-09	-0,140

					SE	<i>MLX</i>	2,49E-07	3,75E-05	-0,141
					SE	<i>B4GALT6</i>	1,59E-07	2,56E-05	-0,141
					SE	<i>NMRAL1</i>	1,11E-06	1,37E-04	-0,142
					SE	<i>DGUOK</i>	1,08E-05	8,91E-04	-0,143
					SE	<i>SLMAP</i>	1,45E-14	1,17E-11	-0,143
					SE	<i>POLK</i>	1,15E-08	2,61E-06	-0,144
					SE	<i>EIF4E2</i>	1,93E-05	1,39E-03	-0,145
					SE	<i>GALT</i>	4,87E-06	4,66E-04	-0,145
					SE	<i>WDR35</i>	6,72E-07	8,85E-05	-0,146
					SE	<i>AC069544.2</i>	2,22E-06	2,40E-04	-0,146
					SE	<i>EXO5</i>	1,72E-08	3,72E-06	-0,146
					SE	<i>TRPT1</i>	1,50E-05	1,15E-03	-0,147
					SE	<i>AASDH</i>	6,04E-05	3,41E-03	-0,148
					SE	<i>L3MBTL2</i>	1,99E-06	2,19E-04	-0,148
					SE	<i>LETMD1</i>	1,76E-05	1,31E-03	-0,149
					SE	<i>TDG</i>	1,71E-06	1,94E-04	-0,150
					SE	<i>ARHGDI1</i>	5,83E-07	7,83E-05	-0,150
					SE	<i>ST6GALNAC4</i>	8,93E-06	7,65E-04	-0,150
					SE	<i>FAM210A</i>	1,19E-05	9,61E-04	-0,151
					SE	<i>SNHG14</i>	1,33E-07	2,21E-05	-0,151
					SE	<i>NSFL1C</i>	1,62E-06	1,87E-04	-0,151
					SE	<i>PDLIM2</i>	3,66E-07	5,35E-05	-0,152
					SE	<i>FES</i>	1,60E-04	7,33E-03	-0,152
					SE	<i>CENPL</i>	2,08E-04	9,01E-03	-0,152
					SE	<i>WARS</i>	3,50E-05	2,27E-03	-0,152
					SE	<i>LINC01024</i>	8,51E-06	7,39E-04	-0,153
					SE	<i>RSU1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,154
					SE	<i>MCM8</i>	1,67E-04	7,56E-03	-0,154
					SE	<i>GTPBP8</i>	4,99E-07	6,95E-05	-0,154
					SE	<i>CES2</i>	1,71E-05	1,28E-03	-0,155
					SE	<i>AMDHD2</i>	1,08E-08	2,48E-06	-0,155
					SE	<i>REEP4</i>	4,81E-05	2,87E-03	-0,155
					SE	<i>TCF7L2</i>	1,24E-05	9,88E-04	-0,155
					SE	<i>ZNF33B</i>	1,14E-05	9,32E-04	-0,155
					SE	<i>USP45</i>	1,28E-05	1,01E-03	-0,157
					SE	<i>ZNF793</i>	1,86E-06	2,08E-04	-0,158
					SE	<i>COX20</i>	5,87E-09	1,43E-06	-0,159
					SE	<i>ZNF766</i>	6,77E-12	3,72E-09	-0,159
					SE	<i>ZNF146</i>	3,68E-07	5,36E-05	-0,159
					SE	<i>MBNL1</i>	8,30E-07	1,06E-04	-0,159
					SE	<i>GTPBP10</i>	1,95E-09	5,82E-07	-0,160
					SE	<i>ANK2</i>	1,69E-06	1,93E-04	-0,160
					SE	<i>ANKS3</i>	5,62E-07	7,63E-05	-0,160
					SE	<i>MRS2</i>	1,65E-05	1,24E-03	-0,160
					SE	<i>ARSA</i>	2,32E-04	9,70E-03	-0,161
					SE	<i>SLC25A40</i>	1,38E-05	1,08E-03	-0,161
					SE	<i>DMKN</i>	7,81E-05	4,14E-03	-0,162
					SE	<i>MBOAT7</i>	1,35E-04	6,35E-03	-0,162
					SE	<i>GIGYF2</i>	1,55E-04	7,13E-03	-0,164
					SE	<i>NDUFAF5</i>	4,33E-05	2,67E-03	-0,165
					SE	<i>ATP5H</i>	9,69E-05	4,91E-03	-0,166
					SE	<i>ABCD4</i>	1,82E-04	8,12E-03	-0,166
					SE	<i>USMG5</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,166
					SE	<i>MPHOSPH9</i>	1,98E-06	2,18E-04	-0,167
					SE	<i>CPTP</i>	3,17E-06	3,25E-04	-0,168
					SE	<i>PRDM8</i>	1,67E-05	1,25E-03	-0,170
					SE	<i>XRRA1</i>	3,98E-06	3,92E-04	-0,171
					SE	<i>UAP1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,171
					SE	<i>HDAC11</i>	8,97E-05	4,62E-03	-0,171
					SE	<i>RUNX1T1</i>	4,60E-05	2,78E-03	-0,172
					SE	<i>UBE2F</i>	1,42E-10	5,60E-08	-0,172
					SE	<i>SHOC2</i>	1,82E-05	1,33E-03	-0,172
					SE	<i>SCAP</i>	5,39E-10	1,80E-07	-0,172
					SE	<i>ABI3BP</i>	1,11E-16	1,12E-13	-0,173
					SE	<i>ANKS3</i>	7,17E-08	1,27E-05	-0,174
					SE	<i>SH3YL1</i>	3,17E-12	1,91E-09	-0,176
					SE	<i>MLH3</i>	8,82E-06	7,59E-04	-0,177
					SE	<i>IKKB</i>	5,88E-07	7,87E-05	-0,179
					SE	<i>LIAS</i>	1,73E-04	7,79E-03	-0,179
					SE	<i>TROVE2</i>	4,79E-05	2,87E-03	-0,179

					SE	<i>RFX2</i>	1,00E-05	8,38E-04	-0,180
					SE	<i>CBWD6</i>	1,96E-04	8,58E-03	-0,180
					SE	<i>ENTPD3-AS1</i>	5,65E-07	7,64E-05	-0,182
					SE	<i>IFI27L1</i>	2,52E-10	9,44E-08	-0,182
					SE	<i>PUS1</i>	6,11E-06	5,67E-04	-0,183
					SE	<i>RSRP1</i>	2,30E-05	1,60E-03	-0,184
					SE	<i>PRIMPOL</i>	4,39E-07	6,28E-05	-0,185
					SE	<i>NT5C3B</i>	1,28E-08	2,84E-06	-0,185
					SE	<i>FKBP1B</i>	8,37E-06	7,31E-04	-0,186
					SE	<i>FRG1BP</i>	1,25E-10	5,00E-08	-0,186
					SE	<i>AC005324.4</i>	2,16E-04	9,23E-03	-0,187
					SE	<i>PLSCR4</i>	7,05E-05	3,83E-03	-0,187
					SE	<i>PKIG</i>	1,39E-05	1,09E-03	-0,187
					SE	<i>C2CD5</i>	1,80E-07	2,82E-05	-0,188
					SE	<i>NFASC</i>	3,07E-05	2,03E-03	-0,189
					SE	<i>PRDM15</i>	9,05E-05	4,65E-03	-0,190
					SE	<i>MBD2</i>	6,38E-08	1,15E-05	-0,191
					SE	<i>TMEM119</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,192
					SE	<i>GON4L</i>	2,17E-04	9,26E-03	-0,192
					SE	<i>QPRT</i>	2,09E-04	9,02E-03	-0,192
					SE	<i>SNUPN</i>	1,30E-04	6,17E-03	-0,194
					SE	<i>MPPE1</i>	2,86E-08	5,74E-06	-0,196
					SE	<i>DNAJC27</i>	1,06E-04	5,29E-03	-0,196
					SE	<i>ANAPC16</i>	5,04E-14	3,72E-11	-0,196
					SE	<i>CCDC85A</i>	2,71E-11	1,31E-08	-0,197
					SE	<i>DROSHA</i>	5,75E-05	3,29E-03	-0,197
					SE	<i>SLFN11</i>	5,04E-05	2,97E-03	-0,199
					SE	<i>SLC7A6</i>	6,30E-05	3,51E-03	-0,199
					SE	<i>POSTN</i>	9,99E-16	9,68E-13	-0,200
					SE	<i>METTL23</i>	9,32E-05	4,76E-03	-0,200
					SE	<i>POMZP3</i>	7,08E-10	2,32E-07	-0,202
					SE	<i>POSTN</i>	2,17E-06	2,36E-04	-0,203
					SE	<i>FAAP20</i>	2,18E-04	9,29E-03	-0,204
					SE	<i>ZZZ3</i>	8,67E-06	7,49E-04	-0,205
					SE	<i>PRDM5</i>	6,41E-06	5,86E-04	-0,205
					SE	<i>MINDY1</i>	1,91E-04	8,40E-03	-0,205
					SE	<i>ARHGGEF25</i>	5,96E-05	3,38E-03	-0,206
					SE	<i>C5orf42</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,207
					SE	<i>ELMOD3</i>	1,04E-08	2,42E-06	-0,207
					SE	<i>GLMP</i>	1,52E-04	7,00E-03	-0,208
					SE	<i>KIFC3</i>	3,44E-05	2,24E-03	-0,213
					SE	<i>UAP1L1</i>	4,60E-08	8,77E-06	-0,213
					SE	<i>RMND1</i>	7,76E-08	1,36E-05	-0,214
					SE	<i>ABI3BP</i>	4,53E-06	4,38E-04	-0,215
					SE	<i>SLC38A7</i>	1,26E-08	2,82E-06	-0,216
					SE	<i>CDK10</i>	3,27E-10	1,15E-07	-0,216
					SE	<i>MAMLD1</i>	3,47E-05	2,26E-03	-0,217
					SE	<i>RBM14-RBM4</i>	1,49E-10	5,83E-08	-0,220
					SE	<i>PDCD6</i>	1,23E-10	4,96E-08	-0,220
					SE	<i>ZNF83</i>	1,42E-06	1,67E-04	-0,220
					SE	<i>PAXIP1-AS2</i>	1,73E-06	1,96E-04	-0,220
					SE	<i>SDCCAG3</i>	1,77E-07	2,79E-05	-0,221
					SE	<i>PRUNE1</i>	2,60E-05	1,77E-03	-0,222
					SE	<i>NR2C2AP</i>	2,30E-04	9,65E-03	-0,224
					SE	<i>ZNF83</i>	3,15E-06	3,23E-04	-0,224
					SE	<i>SLC38A9</i>	5,27E-05	3,09E-03	-0,224
					SE	<i>UAP1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,227
					SE	<i>GCFC2</i>	1,36E-05	1,07E-03	-0,228
					SE	<i>YTHDF2</i>	5,57E-05	3,21E-03	-0,229
					SE	<i>RPAIN</i>	7,99E-06	7,03E-04	-0,231
					SE	<i>RAB31L1</i>	1,67E-15	1,58E-12	-0,232
					SE	<i>IQCB1</i>	1,27E-04	6,04E-03	-0,232
					SE	<i>SDCCAG3</i>	2,08E-06	2,28E-04	-0,234
					SE	<i>CCZ1B</i>	4,50E-05	2,74E-03	-0,236
					SE	<i>CD46</i>	4,11E-15	3,76E-12	-0,239
					SE	<i>ARHGAP5</i>	2,16E-07	3,31E-05	-0,243
					SE	<i>MINDY1</i>	1,38E-04	6,43E-03	-0,246
					SE	<i>DDX60L</i>	3,45E-06	3,46E-04	-0,251
					SE	<i>RPAIN</i>	1,09E-06	1,35E-04	-0,251
					SE	<i>GDNF</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,251
					SE	<i>TNC</i>	8,69E-11	3,64E-08	-0,251

					SE	<i>TRO</i>	2,42E-08	4,99E-06	-0,252
					SE	<i>C1orf112</i>	1,52E-08	3,35E-06	-0,260
					SE	<i>SNHG1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,264
					SE	<i>AC068768.1</i>	2,96E-05	1,98E-03	-0,265
					SE	<i>NCALD</i>	5,02E-10	1,70E-07	-0,266
					SE	<i>ABI3BP</i>	4,35E-08	8,44E-06	-0,267
					SE	<i>PODN</i>	4,89E-05	2,90E-03	-0,268
					SE	<i>AMACR</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,272
					SE	<i>MRPL30</i>	2,79E-05	1,88E-03	-0,272
					SE	<i>AC132008.2</i>	6,59E-08	1,18E-05	-0,275
					SE	<i>CDK10</i>	3,77E-05	2,40E-03	-0,275
					SE	<i>ODF2L</i>	1,04E-04	5,20E-03	-0,277
					SE	<i>AFG3L1P</i>	6,08E-05	3,43E-03	-0,277
					SE	<i>FAM151B</i>	4,04E-05	2,53E-03	-0,279
					SE	<i>TRAPPC6A</i>	7,26E-05	3,91E-03	-0,280
					SE	<i>GALT</i>	1,61E-05	1,22E-03	-0,280
					SE	<i>AFG3L1P</i>	5,44E-05	3,16E-03	-0,280
					SE	<i>GDPD5</i>	5,30E-05	3,10E-03	-0,283
					SE	<i>CROCCP2</i>	2,43E-08	5,00E-06	-0,283
					SE	<i>PARP12</i>	1,07E-10	4,39E-08	-0,287
					SE	<i>PRUNE1</i>	2,54E-06	2,70E-04	-0,289
					SE	<i>ZNF226</i>	2,36E-08	4,91E-06	-0,290
					SE	<i>HDAC11</i>	2,28E-05	1,59E-03	-0,292
					SE	<i>VPS53</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,294
					SE	<i>EFS</i>	1,33E-05	1,04E-03	-0,296
					SE	<i>GLI4</i>	1,71E-05	1,28E-03	-0,296
					SE	<i>SENP7</i>	2,94E-11	1,40E-08	-0,300
					SE	<i>AFG3L1P</i>	5,76E-05	3,29E-03	-0,301
					SE	<i>PPT2</i>	7,91E-06	6,97E-04	-0,303
					SE	<i>CHEK2</i>	6,26E-05	3,49E-03	-0,305
					SE	<i>STAG3L3</i>	1,21E-09	3,75E-07	-0,306
					SE	<i>WDR78</i>	5,04E-09	1,28E-06	-0,306
					SE	<i>BHLHB9</i>	1,83E-04	8,13E-03	-0,306
					SE	<i>AFG3L1P</i>	8,07E-05	4,24E-03	-0,306
					SE	<i>MIR100HG</i>	7,68E-05	4,09E-03	-0,307
					SE	<i>STK19</i>	4,74E-05	2,85E-03	-0,309
					SE	<i>GDNF</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,310
					SE	<i>AC016582.3</i>	5,56E-09	1,39E-06	-0,311
					SE	<i>AMN1</i>	2,35E-04	9,78E-03	-0,314
					SE	<i>TMEM119</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,319
					SE	<i>ZCWPW1</i>	4,78E-09	1,23E-06	-0,321
					SE	<i>FLOT1</i>	5,23E-05	3,07E-03	-0,324
					SE	<i>GNB1L</i>	1,45E-05	1,12E-03	-0,334
					SE	<i>ZNF215</i>	2,56E-07	3,84E-05	-0,338
					SE	<i>C5orf42</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,338
					SE	<i>CARF</i>	5,53E-07	7,55E-05	-0,340
					SE	<i>PDXDC1</i>	6,19E-05	3,48E-03	-0,350
					SE	<i>LIMCH1</i>	1,54E-07	2,50E-05	-0,352
					SE	<i>ZNF138</i>	9,21E-06	7,80E-04	-0,358
					SE	<i>SVIP</i>	3,43E-06	3,45E-04	-0,359
					SE	<i>CEP57L1</i>	1,23E-04	5,93E-03	-0,359
					SE	<i>RBM14-RBM4</i>	7,69E-14	5,59E-11	-0,369
					SE	<i>LINC01137</i>	2,81E-09	7,84E-07	-0,370
					SE	<i>THOC5</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,371
					SE	<i>AC068152.1</i>	3,33E-16	3,29E-13	-0,377
					SE	<i>LETMD1</i>	4,57E-05	2,77E-03	-0,377
					SE	<i>AL365277.1</i>	3,87E-06	3,82E-04	-0,377
					SE	<i>INPP1</i>	2,61E-12	1,59E-09	-0,381
					SE	<i>RWDD3</i>	1,64E-09	4,95E-07	-0,384
					SE	<i>AGTR1</i>	1,06E-04	5,28E-03	-0,385
					SE	<i>PDIA3</i>	2,12E-04	9,08E-03	-0,386
					SE	<i>ARMC4</i>	2,24E-05	1,57E-03	-0,387
					SE	<i>NRSN2</i>	1,96E-04	8,58E-03	-0,389
					SE	<i>HLCS</i>	1,96E-05	1,40E-03	-0,389
					SE	<i>ZNF283</i>	4,08E-07	5,88E-05	-0,390
					SE	<i>KLRA1P</i>	6,02E-09	1,46E-06	-0,393
					SE	<i>CROCCP2</i>	2,70E-05	1,83E-03	-0,394
					SE	<i>AC079298.3</i>	1,28E-07	2,16E-05	-0,395
					SE	<i>MECP2</i>	8,38E-07	1,07E-04	-0,404
					SE	<i>DAB2</i>	4,01E-11	1,87E-08	-0,411
					SE	<i>SH3YL1</i>	7,92E-07	1,03E-04	-0,416

					SE	<i>OSBPL1A</i>	9,89E-06	8,31E-04	-0,426
					SE	<i>DHRS4-AS1</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,432
					SE	<i>AC092279.1</i>	8,47E-06	7,37E-04	-0,433
					SE	<i>KIAA1614</i>	1,59E-05	1,20E-03	-0,435
					SE	<i>DMKN</i>	1,09E-08	2,50E-06	-0,437
					SE	<i>MIS12</i>	2,96E-13	1,98E-10	-0,439
					SE	<i>FYN</i>	3,14E-10	1,12E-07	-0,445
					SE	<i>ZNF138</i>	5,02E-06	4,78E-04	-0,445
					SE	<i>ZNF45</i>	1,81E-05	1,33E-03	-0,448
					SE	<i>SNRPN</i>	7,14E-06	6,39E-04	-0,455
					SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	4,70E-12	2,73E-09	-0,457
					SE	<i>CROCCP2</i>	1,45E-05	1,13E-03	-0,463
					SE	<i>WASHC2A</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,466
					SE	<i>GTF2IRD2B</i>	2,36E-08	4,91E-06	-0,485
					SE	<i>SENP7</i>	9,35E-12	5,08E-09	-0,505
					SE	<i>CROCCP2</i>	6,17E-06	5,71E-04	-0,515
					SE	<i>CCDC74B</i>	6,81E-05	3,74E-03	-0,531
					SE	<i>CCDC74B</i>	6,12E-05	3,45E-03	-0,561
					SE	<i>APO00347.2</i>	4,74E-06	4,57E-04	-0,610
					SE	<i>LIMS2</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,651
					SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,699
					SE	<i>TVP23C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,761
					SE	<i>GHR</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,812
					A3SS	<i>XRCC4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-1,000

**Annexe 3 : Liste complète des motifs reconnus par les RBP, facteurs régulateurs
de l'épissage alternatif (Analyse rMAPS)**

Evènements AS CbIC	Motif scan	RBP	Enrichissement	log p val
MXE	[ACG][AC]A[ACT][AT]CA	IGF2BP2	35,71	3,10
A3SS	TT[GT][AG]TTT	HuR	19,65	4,98
MXE	AAAAAA[AG]	PABPC4	19,60	4,65
SE	[AG]GAAGAAC	SF2-ASF	15,00	3,30
A5SS	AGAGA[AG][AG]	SRSF10	11,90	3,45
A3SS	TT[AT]GTTT	HuR	11,20	3,34
A3SS	GGAGGA	SRSF1	9,37	3,44
A5SS	[AT]TAATT[AG]	A1CF	9,20	3,20
MXE	AAAAAA[AG]	PABPC4	7,50	3,50
SE	GATGA[AT]	RBM47	5,42	4,44
MXE	AGGAT[AGT][AG]	G3BP2	5,25	3,36
MXE	AGGAT[AGT][AG]	G3BP2	4,67	3,30
A5SS	A[AG]AG[AG][AG][AG]	SRSF10	4,24	5,80
MXE	A[AG]AAAA[AC]	PABPC1	4,07	3,78
MXE	A[AC]A[CT]A[AC]A	HNRNPL	4,02	3,44
MXE	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	4,01	4,09
MXE	GGAG[AT][AGT]	SRSF2	4,01	4,17
A3SS	[GT]G[AG][AT]G[GC][AC]	SRSF9	4,01	6,55
SE	[AG][AT]TCAAG	SNRNP70	4,00	3,51
A5SS	[GT]T[AG][AG]T[GT][GT]	SFPQ	3,94	4,38
SE	GACAGA	CNOT4	3,93	4,00
MXE	GGAG[AT][AGT]	SRSF2	3,92	4,17
SE	TAGT[AT][AG]G	MSI1	3,91	3,19
SE	[AT]GGAC[AG]A	9G8	3,86	3,46
SE	[AC]ATCTT[AG]	MATR3	3,86	3,42
MXE	TAG[GT][AT][AT][AG]	DAZAP1	3,73	3,16
MXE	[AT]C[AT][AT]C	SRp20	3,65	6,22
MXE	A[AG]AAAA[AC]	PABPC1	3,64	3,00
A3SS	[AG]AT[GC]A[AT][AGT]	RBM46	3,54	3,64
SE	[AG]AAAAC[AC]	PABPC3	3,50	2,80
MXE	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	3,33	3,20
SE	TTTTTT[GT]	HuR	3,25	5,41
A3SS	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	3,24	3,17
A3SS	CC[CT][CT]CC[ACT]	PCBP2	3,08	4,11
SE	[GT]ATATA[GC]	RBMS1	3,00	3,62
MXE	TAG[GT][AT][AT][AG]	DAZAP1	3,00	3,16
SE	AAAAAA[AG]	PABPC4	3,00	4,86
SE	AGAAA[AGT]T	PABPC5	3,00	4,40

SE	TGTGT[GT][GT]	BRUNOL5	3,00	3,97
MXE	A[AC]A[CT]A[AC]A	HNRNPL	2,97	3,40
SE	GAATG[AGT]	TARDBP	2,93	6,14
SE	[ACT]TTTTT[GT]	HNRNPCL1	2,86	6,41
MXE	[ACG][AC]A[ACT][AT]CA	IGF2BP2	2,81	4,23
SE	[ACT][AG][GT]ACAG	ENOX1	2,79	3,03
SE	TGTG[AGT][GT]G	BRUNOL6	2,69	3,21
SE	[AC]TATA[GT][AC]	RBMS3	2,65	2,80
SE	CTC[GT]TC[CT]	SRp20	2,63	3,22
SE	TTTTTT[CGT]	RALY	2,60	5,61
SE	[ACT]TTTTT[GT]	HNRNPC	2,54	6,41
SE	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	2,43	4,14
A3SS	[AT]C[AT][AT]C	SRp20	2,43	3,44
SE	TT[AT]GTTT	HuR	2,40	4,98
SE	TTTTTT	CPEB4	2,33	5,12
SE	[AC]TATA[GT][AC]	RBMS3	2,33	3,08
SE	A[AG]AAAA[AC]	SART3	2,33	4,65
SE	[AT]TTTTT[CGT]	TIA1	2,23	4,03
SE	[AG]CA[ACT]ACA	HNRPLL	2,20	4,14
SE	TGGTGG	ESRP1	2,07	3,56
SE	[CGT]GTT[GC][GT]T	ZNF638	2,03	3,02
SE	TT[AGT]TTTT	HuR	2,01	3,80
MXE	[AT]C[AT][AT]C	SRp20	2,00	4,70
SE	A[AC]A[CT]A[AC]A	HNRNPL	2,00	4,90
SE	A[AC]A[ACT][AT]CA	IGF2BP3	2,00	3,60
SE	TAAAA[ACG][ACG]	KHDRBS1	2,00	3,39
A3SS	TTT[AG][GT]TT	HuR	1,69	3,95
SE	CC[CT][CT]CC[ACT]	PCBP2	0,20	4,65

Evènements AS CbIG	Motif scan	RBPs	Enrichissement	log p val
RI	GGA[GC]G[AG][ACG]	SRSF1	67,30	3,91
MXE	[AT]TTTTT[CGT]	TIA1	28,00	3,94
MXE	[AT]TTTTT[CGT]	TIA1	20,00	2,95
A5SS	[GT]GACA[AG]G	FMR1	16,40	4,20
A5SS	[AG][AT]TCAAG	SNRNP70	16,20	3,68
A3SS	AGGAT[AGT][AG]	G3BP2	7,65	3,10
A3SS	TGGTGG	ESRP1	7,65	3,05
SE	[CT]GGAGG[AG]	LIN28A	6,60	6,63
A3SS	GATGA[AT]	RBM47	6,20	3,16
SE	[GC][GC]GCGC[GC]	PPRC1	5,00	4,54
A5SS	A[AG]AAAA[AC]	PABPC1	4,32	3,67
A5SS	A[AG]AAAA[AC]	SART3	4,32	3,67
SE	[GC]AAGG[AG]G	RBM5	4,14	4,55
A5SS	[AT]G[AT]GTG[AGT]	RBM24	4,01	3,12
A5SS	[AGT]GAC[AG][AG][AG]	FXR2	4,01	3,08
A3SS	CC[AT][AT][ACT]CC	PCBP1	3,96	2,90
A5SS	[CT][CT][AT]C[AT][GC]G	SRp55	3,96	2,93
SE	[GT]ATATA[GC]	RBMS1	3,82	4,11
A3SS	[AG]AT[GC]A[AT][AGT]	RBM46	3,78	3,23
SE	CC[AT][AT][ACT]CC	PCBP1	3,74	4,01
SE	GACAGA	CNOT4	3,69	2,98
SE	TGTGT[GT][GT]	BRUNOL5	3,60	5,99
SE	[AG]CA[ACT]ACA	HNRPLL	3,60	3,74
SE	CCA[AT][AC]CC	HNRNPK	3,55	3,07
MXE	C[CT]TTCC	PCBP1	3,48	3,25
MXE	C[CT]TTCC	PCBP1	3,48	3,25
SE	G[AG][ACT]TTAA	ZCRB1	3,30	3,46
SE	[AG][AT]TCAAG	SNRNP70	3,30	2,99
SE	[AT]GGAC[AG]A	9G8	3,29	3,39
SE	[AC]ATCTT[AG]	MATR3	3,15	3,54
SE	[GT]GTGT[GT][GT]	BRUNOL4	3,00	4,53
SE	AGAAA[AGT]T	PABPC5	2,94	3,55
SE	GGA[GC]G[AG][ACG]	SRSF1	2,80	5,73
SE	AAAAAA[AG]	PABPC4	2,67	4,75
SE	[CGT]GTT[GC][GT]T	ZNF638	2,50	3,77
SE	[AT]TAC[AT]T[GT]	RBM41	2,43	3,01
SE	[ACT][AG][GT]ACAG	ENOX1	2,40	4,39
MXE	TTT[CT]CC	PCBP3	2,32	2,99
MXE	TTT[CT]CC	PCBP3	2,32	2,99
SE	AGAGA[AG][AG]	SRSF10	2,30	3,52
A3SS	CC[CT][CT]CC[ACT]	PCBP2	2,28	2,95
A3SS	[CT][AG]C[AG][GT][AC]	SRp40	2,24	5,16
SE	TGGTGG	ESRP1	2,20	3,13
A3SS	[GT]T[AG][AG]T[GT][GT]	SFPQ	2,03	3,17
MXE	A[AG]AG[AG][AG][AG]	SRSF10	2,00	3,43
SE	[GT][GT]GTGT[GT]	RBM38	2,00	3,86
MXE	A[AG]AG[AG][AG][AG]	SRSF10	1,97	3,43
MXE	[ACT][CT]TTT[CT]T	PTBP1	1,53	4,14
MXE	[ACT][CT]TTT[CT]T	PTBP1	1,53	4,00

**Annexe 4 : Liste complète des protéines différentiellement exprimées
significativement (P<0,05)**

CbIC				CbIG			
Protéine	ID uniprot	PValue	foldChange	Protéine	ID uniprot	PValue	foldChange
PIGG	Q5H8A4	2,96E-02	36,3	ST3GAL1	Q11201	2,34E-03	29,3
ZADH2	Q8N4Q0	3,68E-02	32,2	ZADH2	Q8N4Q0	2,24E-02	27,6
ST3GAL1	Q11201	2,82E-02	29,9	PIGG	Q5H8A4	1,61E-02	24,0
SLC41A3	Q96GZ6	4,63E-02	15,0	SLC41A3	Q96GZ6	4,66E-03	22,1
ROR1	Q01973	1,43E-02	12,4	TMEM222	Q9HOR3	1,20E-03	9,3
DSEL	Q8IZU8	1,37E-02	10,5	GALNT7	Q86SF2	7,45E-03	8,8
STEAP4	Q687X5	3,43E-02	9,8	STEAP4	Q687X5	3,43E-02	7,4
TSPAN4	O14817	1,13E-02	8,6	ANKRD17	O75179	2,65E-02	7,1
ANKRD17	O75179	1,74E-02	7,7	ROR1	Q01973	3,23E-02	6,8
C12orf57	Q99622	9,21E-03	7,0	PAM	P19021	1,94E-04	5,9
APAF1	O14727	5,59E-03	6,3	TSPAN4	O14817	1,30E-02	5,1
C6orf120	Q7Z4R8	5,16E-03	5,7	DSEL	Q8IZU8	2,06E-02	4,9
PAM	P19021	4,09E-04	5,4	C12orf57	Q99622	3,57E-02	4,5
GALNT7	Q86SF2	3,75E-02	5,4	TRIP4	Q15650	4,62E-03	4,5
GFM2	Q969S9	5,22E-03	5,1	GFM2	Q969S9	7,37E-03	4,4
TRIP4	Q15650	5,16E-03	5,0	SNF8	Q96H20	9,69E-03	4,0
TMEM222	Q9HOR3	1,57E-02	5,0	PLA2G4A	P47712	9,80E-03	3,6
ENSA	O43768	4,16E-03	4,9	C6orf120	Q7Z4R8	1,50E-02	3,6
HNRNPL	P14866	5,99E-03	4,3	ENSA	O43768	9,22E-03	3,5
STEAP3	Q658P3	8,81E-03	3,5	CRIP2	P52943	3,19E-02	3,4
SNF8	Q96H20	1,55E-02	3,5	HNRNPL	P14866	1,28E-02	3,3
INTS1	Q8N201	2,21E-02	3,5	SH3PXD2B	A1X283	1,50E-02	3,1
CRIP2	P52943	3,14E-02	3,4	SLC2A6	Q9UGQ3	4,61E-02	2,8
UBE2D1	P51668	3,43E-02	3,2	APAF1	O14727	4,63E-02	2,7
SH3PXD2B	A1X283	1,73E-02	3,2	IRF2BP2	Q7Z5L9	3,67E-02	2,7
SLC2A6	Q9UGQ3	2,54E-02	3,1	STEAP3	Q658P3	2,16E-02	2,5
PSMB7	Q99436	3,30E-02	2,8	TRAPPC12	Q8WVT3	2,54E-02	2,5
TRAPPC12	Q8WVT3	1,93E-02	2,8	ALG9	Q9H6U8	2,18E-02	2,5
PLA2G4A	P47712	3,46E-02	2,7	UBE2D1	P51668	4,67E-02	2,4
ALG9	Q9H6U8	2,45E-02	2,7	NOMO2	Q5JPE7	3,28E-02	2,1
IRF2BP2	Q7Z5L9	4,97E-02	2,6	SLC39A7	Q92504	3,41E-02	2,1
SLC39A7	Q92504	2,67E-02	2,5	PSMB7	Q99436	4,27E-02	2,1
CARM1	Q86X55	2,86E-02	2,5	CARM1	Q86X55	4,54E-02	2,0
NOMO2	Q5JPE7	2,88E-02	2,4	NDUFA8	P51970	4,96E-02	2,0
NDUFA8	P51970	3,97E-02	2,1	CERS2	Q96G23	4,04E-02	-2,1
EXOSC2	Q13868	1,58E-02	-2,5	PPP1R12C	Q9BZL4	3,96E-02	-3,0
CERS2	Q96G23	3,07E-02	-2,5	EXOSC2	Q13868	3,09E-03	-3,2
ZKSCAN5	Q9Y2L8	3,43E-02	-3,0	OSM	P13725	7,48E-03	-3,8
PPP1R12C	Q9BZL4	4,45E-02	-3,2	USP4	Q13107	1,68E-02	-5,9
OSM	P13725	4,56E-02	-3,4	MGLL	Q99685	9,62E-03	-6,1
ILKAP	Q9H0C8	1,62E-02	-4,0	STARD13	Q9Y3M8	3,61E-02	-6,9
GGT5	P36269	1,98E-02	-5,9	UBR2	Q8I WV8	9,84E-03	-10,6
USP4	Q13107	4,21E-03	-7,4	INTS1	Q8N201	3,72E-05	-15,4
SLC16A1	P53985	4,21E-02	-9,3	SLC16A1	P53985	1,18E-02	-15,8
STARD13	Q9Y3M8	3,18E-02	-10,4	ARHGEF18	Q6ZS25	3,70E-02	-16,3
MGLL	Q99685	3,01E-03	-10,7	ILKAP	Q9H0C8	5,54E-03	-17,1
UBR2	Q8I WV8	1,19E-02	-10,9	GGT5	P36269	1,98E-03	-18,7
ARHGEF18	Q6ZS25	4,05E-02	-13,6	RALGPS2	Q86X27	3,36E-02	-21,0
RALGPS2	Q86X27	9,97E-03	-44,7	CDC26	Q8NHZ8	4,69E-02	-31,3
THTPA	Q9BU02	4,59E-02	-49,0	THTPA	Q9BU02	4,63E-02	-34,1
MEIS1	O00470	6,97E-06	-57,7	ZKSCAN5	Q9Y2L8	3,07E-03	-41,5
CDC26	Q8NHZ8	2,97E-02	-66,2	MEIS1	O00470	2,83E-06	-67,5
DAAM2	Q86T65	1,45E-02	-67,7	DAAM2	Q86T65	1,02E-02	-67,7

**Annexe 5 : Liste des cibles de HuR et HNRNPL identifiées parmi la liste des DEG
et de DEP**

HNRNPL			
CbIC		CbIG	
DEG	DEP	DEG	DEP
TP53I11	ENSA	IL16	ENSA
ACP6	RBBP9	EFNB1	ZRANB2
RNMT	PDS5A	OXCT1	AHCYL1
OXCT1	ATP11C	OAS2	SRD5A3
PCGF5	MBD2	TP53I11	HECTD3
TGOLN2	CHM	PCGF5	SLC16A7
TRIM14	SLC46A3	CHST11	BTN3A3
IL16	CCAR1		ITM2B
ARHGDI8	RBBP4		GIT2
	SPTBN1		ACIN1
	EIF1AD		PRPF38B

HUR				HUR			
CbIC		CbIG		CbIC		CbIG	
DEG	DEP	DEG	DEP	DEG	DEP	DEG	DEP
FAM213A	MEIS1	ZADH2	ST3GAL1	PAX9	NOLC1	SRGN	AGL
PPARG	PAM	DUSP4	ZADH2	SOX9	TMEM87A		PSMG3
DUSP4	PSME4	SAMD5	PIGG	DMD	THOC2		USP47
SAMD5	RIOK3	FAM19A2	SLC41A3	MYB	EHHADH		ACIN1
DAPK1	GEMIN5	DAPK1	TMEM222	SRGN	CARM1		FBXL18
SALL1	ENSA	KCNJ2	GALNT7	HTRA4	PIGG		TP53BP2
KCNJ2	SV2A	SEMA6A	ANKRD17	ISL2	CERS2		ANGEL2
CAMK1D	C6orf120	CAMK1D	ROR1		CCAR1		HS2ST1
TNFRSF21	APAF1	RHOA	PAM		SUPT4H1		EARS2
CDHR3	HNRNPL	CASC10	C12orf57		PDZD8		B4GALT7
HUNK	MLEC	RASSF8	PLA2G4A		UBE2D1		MGST1
CIPC	STEAP3	RAB36	C6orf120		ZKSCAN5		KIAA1217
FAM19A2	FUBP3	KREMEN1	ENSA		PLA2G4A		POGZ
TP53I11	RBBP9	MLLT3	HNRNPL		BIRC6		PRPF38B
ADRA2A	RALGPS2	LRIG3	APAF1		ZADH2		ACBD6
RASSF8	DBR1	ACAT2	IRF2BP2		LSM7		CDC45
CASC10	SLC39A11	AK3	STEAP3		GALNT7		SLC35F6
RHOA	HDAC5	PTPRG	ALG9		PRPF39		C5orf51
HSD17B7	PPP1R11	EFNB1	UBE2D1		SGCE		PPP1R15A
RAB36	BLOC1S3	MT-CO1	SLC39A7		RRAGC		MAN1A2
ACAT2	ROR1	ZNF281	CARM1		RBBP4		AIG1
SRPX2	SYT11	OXCT1	NDUFA8		N4BP1		MRPS16
OGFRL1	TMEM222	FOXP1	CERS2		ATE1		PNMA1
HK2	EXOSC2	SVIP	EXOSC2		MMGT1		
IQCK	PD55A	MYEF2	UBR2		NDUFA8		
AK3	HEATR1	STK38L	SLC16A1		ARHGEF18		
PM20D2	CPT2	RAB27B	ARHGEF18		SLC16A1		
TMEM65	PHLDA2	PYGL	RALGPS2		SPTBN1		
PAR6G	VPS29	SELENOP	ZKSCAN5		ADD3		
ACP6	AK6	FAM213A	MEIS1		CANX		
PAG1	CSPP1	PPARG	GCC2		MOXD1		
MLLT3	SMPDL3A	SALL1	MED24		LPIN1		
AS3MT	WDR92	GPRC5B	RAB27B		UBASH3B		
OSBPL1A	SLC39A7	MAP2K6	PIGU		L2HGDH		
HEBP2	ATP1A1	CDHR3	ZRANB2		MRPL17		
PYGL	ANXA5	TP53I11	GPHN		NFKBIA		
IRF2BPL	ATP11C	STK26	MMAA		PRKRA		
GCLM	TRAPPC2	TSHZ1	TM9SF1		EIF1AD		
B9D1	VPS37A	HK2	CTH		EIF4B		
CCDC125	PHYHD1	TRNP1	SLIT2		DHX40		
OPTN	EXOC6B	PM20D2	AHCYL1		ERLIN2		
MT-CO1	MIA3	PAR6G	JAM3		SRGAP1		
RNMT	KRR1	ME1	PGM5		IRF2BP2		
RALA	REPS1	OSBPL1A	CCDC43				
TMEM30A	SLC41A3	HEBP2	KIF1B				
KIFAP3	HMGB3	CCDC125	SRRT				
ANP32E	C3orf58	AS3MT	SRD5A3				
PGM2	ARL2BP	NXPE3	RTN3				
MYADM	MBD2	PPP1R3B	FTH1				
OXCT1	NHSL1	HOXD8	CERCAM				
TMSB4X	FAM103A1	PCGF5	DBT				
PCGF5	HEATR5A	SMS	SPATA18				
FLI1	C12orf57	FLI1	CHMP5				
SVIP	CSTF2	GPAM	HMGB2				
CCNF	UBR2	TMSB4X	PYGL				
TRAF5	GNL3	CHST11	DNPH1				
ALCAM	SLC2A10	FRMD5	SLC16A7				
GPAM	CUL4B	GFOD1	PEPD				
STK38L	ANKRD17	HOXD9	H6PD				
MYEF2	QPCTL	MYH10	GANAB				
TGOLN2	SEMA3C	BMPR1B	LMAN2				
BMPR1B	CANT1	COL4A4	NDUFB5				
ITGA6	FRMD8	HTRA4	ITM2B				
RCAN1	ALG9	MYOCD	GIT2				
MYH10	DNAJC21	WIPF3	CUL4A				
NEK7	CHM	ISL2	SCCPDH				
ID4	ST3GAL1	LDHC	NDUFS3				

Annexe 6 : Article scientifique N°1

Transcriptomic analysis of fibroblasts from patients with cb1C and cb1G inherited defects of cobalamin metabolism reveals global dysregulation of alternative splicing

Charif Rashka¹, Sébastien Hergalant¹, Abderrahim Oussalah^{1,2}, Jean-Michel Camadro³, Yuri Motorin⁴, Ziad Hassan¹, Matthias R. Baumgartner⁵, David S. Rosenblatt⁶, François Feillet^{1,2}, Jean-Louis Guéant^{1,2}, David Coelho^{1,2}

- 1 Inserm UMRS 1256 NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure, University of Lorraine, Nancy, F-54000, France.
- 2 National Center of Inborn Errors of Metabolism, University Regional Hospital Center of Nancy, Nancy, F-54000, France.
- 3 Université Denis Diderot – Paris 7, CNRS, UMR 7592, Paris, F-75205, France
- 4 Université de Lorraine, CNRS, UMR 7365, IMoPA, F-54000 Nancy, France
- 5 radiz–Rare Disease Initiative Zürich, Clinical Research Priority Program for Rare Diseases, University of Zürich, Switzerland
- 6 Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada

Jean-Louis Guéant : <https://orcid.org/0000-0002-5067-042X>

François Feillet : <https://orcid.org/0000-0002-6814-0806>

Corresponding author: David Coelho

david.coelho@inserm.fr

<https://orcid.org/0000-0001-7010-5789>

Abstract

Vitamin B12 or cobalamin (cbl) metabolism can be affected by genetic defects leading to defective activity of either methylmalonyl-CoA mutase or methionine synthase or both enzymes. Patients usually present with a wide spectrum of pathologies suggesting that various cellular processes could be affected by modifications in gene expression. We have previously demonstrated that these genetic defects are associated with subcellular mislocalization of RNA binding proteins and subsequent altered nucleo-cytoplasmic shuttling of mRNAs. In order to characterize the possible changes of gene expression in these diseases, we have investigated global gene expression in fibroblasts from patients with *cbIC* and *cbIG* inherited disorders by RNA-seq. The most differentially expressed genes are strongly associated with developmental processes, neurological, ophthalmologic and cardiovascular diseases. These associations are consistent with the clinical presentation of *cbIC* and *cbIG* disorders. Multivariate analysis of transcript processing revealed splicing alterations that led to dramatic changes in cytoskeleton organization, response to stress, methylation of macromolecules and RNA binding. The RNA motifs associated with this differential splicing reflected a potential role of RNA binding proteins such as HuR and HNRNPL. Proteomic analysis confirmed that mRNA processing was significantly disturbed. This study reports a dramatic alteration of gene expression in fibroblasts of patients with *cbIC* and *cbIG* disorders, which resulted partly from disturbed function of RNA binding proteins. These data suggest to evaluate the rescue of the mislocalization of RNA binding proteins as a potential strategy in the treatment of severe cases who are resistant to classical treatments with co-enzyme supplements.

Key words: cobalamin, metabolism, RNA binding protein, alternative splicing, transcriptome

Introduction

In man, vitamin B12 or cobalamin (cbl) metabolism is responsible for the synthesis of adenosylcobalamin (Adocbl) and methylcobalamin (Mecbl), the two cofactors required for the mitochondrial methylmalonyl-CoA mutase and the cytosolic methionine synthase, respectively. These two biosynthetic pathways can be affected by genetic defects that are inherited in an autosomal recessive manner and were historically defined by complementation groups and names *cblA-G*, *cblJ* and *mut* (Coelho et al. 2012). The most common of these inherited disorders is the cobalamin C (*cblC*) defect with more than 500 patients diagnosed. This complementation group is defined by defects in the *MMACHC* gene (MIM#609831), affecting both Adocbl and Mecbl metabolism. The MMACHC protein has been associated to different functions related to early processing of cbl in the cells from cytosolic chaperone, removal of the upper-axial ligands of dietary cbl: decyanation of cyanocobalamin and dealkylation of alkylcobalamins, to presentation of cbl in the base-off state required by methionine synthase. The *cblG* defect is defined by mutations in the *MTR* gene coding for methionine synthase (MIM 250940) and approximately 50 patients have been diagnosed.

Patients with the *cblC* defect have methylmalonic acidemia combined with hyperhomocysteinemia while *cblG* patients have isolated hyperhomocysteinemia. Neurological, ophthalmological and hematological symptoms are common in patients from both groups with some specific symptoms (Fischer et al. 2014; Huemer et al. 2015). Patients with the *cblC* defect usually present with feeding difficulties, hypotonia, and lethargy and the clinical course includes mainly hematologic and neurologic symptoms. Renal failure, hepatic dysfunction, cardiomyopathy and visual impairment are also frequent. Almost all patients with the *cblG* defect present with megaloblastic anemia and neurologic disorders including lethargy, failure to thrive, developmental delay, nystagmus, hypotonia or hypertonia, ataxia, seizures, and blindness. Despite some common features, clinical presentation and severity of these two inborn errors can vary considerably (Fischer et al. 2014; Huemer et al. 2015).

The mechanisms at the origin of the high variability in the severity and in the nature of the pathologies associated with these disorders are far from being understood but recent findings suggest alterations of gene expression could contribute to these pathomechanisms. Indeed, it has been reported in fibroblasts from *cblC* patients, a relatively moderate overexpression of pro-apoptotic and anti-apoptotic genes (Richard et al. 2006).

While the *cblC* defect leads to reduced synthesis of the two *cbl* co-enzymes, we have recently shown that the lack of *MMACHC* could also result in decreased activity of methionine synthase, probably through a weaker interaction with its partner methionine synthase reductase (Fofou-Caillierez et al, 2013; Bassila et al. 2016). Thus, a reduced activity of methionine synthase is a common feature of the two complementation groups *cblC* and *cblG*. This would result in two biochemical consequences that could alter regulation of gene expression. First, this impaired enzymatic reaction will lead to the accumulation of the two substrates homocysteine and methyltetrahydrofolate, disturbing the folate cycle which is crucial for important cellular pathways including amino acid metabolism, but also biosynthesis of purine and pyrimidines. Methionine is the precursor of S-adenosyl-methionine (SAM), the universal methyl donor required for the methylation of nucleic acids and proteins. Consequently, the reduced synthesis of methionine and SAM will affect the methylation of DNA, RNA and proteins involved in the regulation of gene expression, including histones, transcription factors and their co-activators and RNA binding proteins. We have recently that a defective *cbl* metabolism could also alter the subcellular localization of RNA binding proteins (RBP) such as ELAVL1/HuR by altering their methylation and phosphorylation status, resulting in abnormal mRNA nucleocytoplasmic transport, in a transgenic cellular mouse model and fibroblasts from patients (Battaglia-Hsu et al. 2018). Moreover, this study also revealed that this mislocalization of RBP was associated with dramatic transcriptomic changes.

The subcellular mislocalization of RNA binding proteins (RBP) observed in transgenic mouse and cell models and patient fibroblasts with impaired cellular availability of *cbl* led to subsequent global dysregulation of mRNA trafficking and dramatic transcriptomic changes related to metabolic processing of RNA, cellular response to stress, regulation of cell cycle, neurogenesis and neuron differentiation, plasticity and development (Battaglia-Hsu et al. 2018; Ghemrawi et al. 2019). These results suggested that transcriptomic dysregulation could be an important contributor to the pathogenesis of the inherited disorders of *cbl* metabolism through mechanisms that remain to be dissected.

The altered RBP trafficking may influence alternative splicing. For example, mutations in RBP genes coding produce aberrant splicing linked to amyotrophic lateral sclerosis and autism (Dredge et al. 2001; Parikshak, et al. 2016). HuR and other RBP can be mislocalized in fibroblasts from patients with *cblC* and *cblG* disorders. We aimed to evaluate the consequences on gene splicing and expression that could contribute to the spectrum of clinical manifestations reported in these disorders.

To address this issue, we performed a deep RNA-Seq analysis of gene expression and a proteomic analysis of fibroblasts from 3 *cblC* and 4 *cblG* patients, with mutations in the *MMACHC* and *MTR* genes respectively. Our

data revealed for the first time in *cb1C/G* cells altered splicing and expression of genes related to mislocalization or to over-expression of RNA binding proteins. The most differentially expressed genes are associated with developmental processes and with cardiovascular, neurological and visual manifestations of these disorders. Analysis of differential alternative splicing revealed that cytoskeleton organization, response to cellular stress and RNA binding are the most affected biological functions.

Materials and methods

Patient fibroblasts, cell culture and RNA collection

Patient fibroblasts (3 *cb1C*, 4 *cb1G* and a control line) were obtained from the Reference Center for Inherited Metabolic Diseases of the Greater East Inter-region, the University Hospital of Nancy, the University Hospital for Children in Zurich and the McGill University. The description of each cell line is available in supplementary Table S1. Cells were maintained in culture in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Glucose 4500mg/mL (Sigma Alrich, D5796) supplemented with 10% fetal calf serum (Eurobio, CVFSVF0001), 1% sodium pyruvate (Sigma Aldrich, S8636), 1% penicillin-streptomycin (Sigma Aldrich, P4333) and incubated at 37 ° C, 5% CO₂ until confluent. The culture medium was changed every 3 days. Then, cells were trypsinized and total RNA is isolated from the cell pellet using the RNAeasyTM mini kit extraction (Qiagen) and treated at the DNase I (Ambion, AM1906). The RNA quality was assessed by using the 2100 Bioanalyzer (Agilent).

RNA-Seq library construction and Transcriptome sequencing

RNA-Seq libraries were constructed by using the ScriptSeq Complete Kit for Human/Mouse/Rat (Epicentre, Illumina). First, rRNA was removed from the sample using the Ribo-Zero Magnetic Kit. The ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit was then used to make the RNA-Seq library from the Ribo-Zero treated RNA. RNA-Seq libraries were quantified by picogreen and visualized on Agilent Bioanalyzer. High-throughput sequencing of the transcriptome was performed on three biological replicates of each cell line using the Illumina TruSeqTM sequencer. The DNA fragments were read on nucleotide sequences of 100 base pairs in paired end. Raw sequencing data were then demultiplexed and are compiled in a standard FASTQ files, which were used for bioinformatic analysis.

Bioinformatic analysis of RNA-Seq data

The quality control of nucleotide sequences was performed using FastQC v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Following removal of low quality sequences,

mapping of the reads was performed by HISAT2 v2.0.4 - (Kim et al. 2015) on a version of the hg38 reference genome which accounts for splicing donor and acceptor sites and “normal” SNP polymorphism (https://cloud.biohpc.swmed.edu/index.php/s/grch38_snp/download). Spliced isoforms were assembled from the reconstructed transcripts obtained with Stringtie v1.3.3b (Pertea et al. 2015), allowing for the identification of new isoforms in addition to those overlapping known transcripts from the Ensembl official annotations (Homo_sapiens.GRCh38.89.gtf). Data were normalized with the trimmed means of M-values (TMM) standardization method (Robinson and Oshlack 2010) and then transformed in logarithm base 2 (log₂-) and counts per million (cpm-), as previously described (Law et al., 2014). Paired-end RNA sequencing of the 24 samples generated an average of 110.2 million reads per sample. The overall alignment rate was 90.55% (sd +/- 1.86%), with an average quality of mapped read at 99.97% (PHRED score 37.2) and an average insert size of 362.5 bp (sd +/- 621.4). About 10.94% (from 9.7% to 11.4%) of reads mapped to intronic regions. 55204 transcripts were reconstructed during the next step, which led to a transcriptome of 50818 unique transcripts and 16808 unique genes after filtering for very low expression against the 3 control samples (mean cpm value > 0.5 was considered proof of expression in the control group). Linear modelling with empirical Bayes was then applied to assess differential expression at gene and at transcript level between both control and each patient cell line.

Statistical analysis, differentially expressed genes and functional annotations

Batch effects between the 3 replicate runs were corrected using the ComBat function available in the R *sva* package. Linear modelling with empirical Bayes was applied to assess differential expression at gene and at transcript level between both control and each patient cell line. Differential expression p-values were obtained by using a moderated Student t-test and adjusted for the false discovery rate (FDR) with the Benjamini-Hochberg procedure. Differentially expressed genes (DEGs) were identified with FDR < 0.05 and a fold-change (FC) above 1.5. Gene ontology analysis for significant biological processes and molecular functions (FDR < 0.05) for DEGs were performed with Panther database.

RT-PCR and western blotting

Total RNA was isolated from the cell pellet of 3 *cb1C*, 4 *cb1G* and 1 control (WT). We used custom plates containing 28 pairs of lyophilized primers, designed and pre-validated by Biorad to study gene expression by RT-qPCR. Two reference genes (*AASDH* and *ALAS1*) were used to normalize tested gene expression level. Gene expression levels were pre-analyzed using StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermofischer). A Student test was established on RT-qPCR data. Fold changes were calculated using the 2-deltadelta (CT) method and transformed into log₂ (FC). Spearman correlation (ρ) was calculated to establish a relationship between RNA-Seq and RT-qPCR data. Western blot of MYH1, DMD and HNRNPL proteins were performed with the following antibodies (DMD, Abcam, ab15277; MYH1, Abcam ab91506; B-actin, Cell Signaling 4970; HNRNPL, Santa Cruz Sc-46673) as described (Battaglia-Hsu et al. 2018).

Alternative splicing of *cb1C* and *cb1G* patient fibroblasts and functional annotation

RNA-Seq data was uploaded to the rMATS online software (version 3.0, 8) (Shen et al. 2014) to identify differential alternating splice (AS) events between two groups control and *cb1C/cb1G* cell lines, corresponding to all five basic types of AS patterns: skipped exon (SE), alternative 5' spliced site (A5SS), alternative 3' spliced site (A3SS), mutually exclusive exon (MXE) and intron retention (RI). For each AS event, we used both the reads mapped to the splice junctions and the reads mapped to the exon body as the input for rMATS. The parameters used to detect significant AS events are FDR <1% and delta PSI>5%. Functional annotation of significant differentially spliced genes was performed using Panther database.

Experimental validation of alternative splicing events

Five differentially spliced genes, *XIAP*, *MBD5*, *BMF*, *EEF1AKMT1* and *PRMT2* were selected to validate the rMATS results by RT-PCR. PCR primers were designed using the Primer-BLAST (V.3) software (Supplementary Table S4).

Motif enrichment analysis and identification of RNA Binding Protein (RBP)

rMATS outputs were uploaded to the online rMAPS portal (<http://rmaps.cecsresearch.org/MTool/>) and the motif map tool was used to test common RNA motif enrichments within nearby splicing regions, according to the 5 considered alternative splicing events. Default settings were used apart for the FDR threshold for the rMATS results that was lowered to 1% (a setting that is not proposed by RMAPS directly, rather, rMATS outputs need to be modified for all values between 0.05 and 0.01 to be considered as background). Thresholds were applied on

both p-value and zscore RMAPS outputs to assess statistical significance for over and under-represented consensus motifs (RBP recognition patterns; p-value < $1e^{-3}$ and zscore > 2-fold evaluated background). The complete list of recognition patterns for RBPs is available in supplementary data, Table S5. From the Starbase V3 Clip-Seq experiment database, we compiled lists of RBP targets for all RBPs available, with a stringency of at least 3 whenever possible. We only considered targets that are mRNAs with protein coding as Ensembl biotype (20244 genes). The enrichment of each RBP targets in the number of AS events was calculated as follow: (number of genes affected by AS events that are also known target of RBP)/number of genes affected by AS events)/(number of genes known to be target of RBP)/total number of genes.

LC-MS/MS acquisition

Protein extracts were analyzed using an Orbitrap Fusion Tribrid equipped with an EASY-Spray nanoelectrospray ion source and coupled to an Easy nano-LC Proxeon 1000 system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Chromatographic separation of peptides was performed with the following parameters: Acclaim PepMap100 C18 pre-column (2 cm, 75 μ m i.d., 3 μ m, 100 Å), Pepmap-RSLC Proxeon C18 column (50 cm, 75 μ m i.d., 2 μ m, 100 Å), 300 nl/min flow, gradient rising from 95 % solvent A (water, 0.1% formic acid) to 35% solvent B (100 % acetonitrile, 0.1% formic acid) in 120 minutes followed by column regeneration for 50 minutes. Peptides were analyzed in the Orbitrap cell, in full ion scan mode, at a resolution of 120,000 (at m/z 200), with a mass range of m/z 350-1550 and an AGC target of 4×10^5 . Fragments were obtained by higher-energy C-trap dissociation (HCD) activation with a collisional energy of 30%, and a quadrupole isolation window of 1.6 Da. MS/MS data were acquired in the linear ion trap in a top-speed mode, with a total cycle of 3 seconds with an AGC target of 1×10^4 . The maximum ion accumulation times were set to 100 ms for MS acquisition and 35 ms for MS/MS acquisition in parallelization mode. All MS/MS data were processed with an in-house Mascot search server (Matrix Science, Boston, MA; version 2.4.1) using Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). The mass tolerance was set to 6 ppm for precursor ions and 0.5 Da for fragments. The following modifications were used in variable modifications: oxidation (M), phosphorylation (STY), acetylation (Protein N-term, K). The maximum number of missed cleavages by trypsin was limited to two for all proteases used. MS/MS data were searched against the UniProtKB RefSeq Homo sapiens database.

Quantitative analysis in label-free experiments

For quantitative proteomic analyses, the data of proteomic experiments are the results of three independent samples. Cell extracts were prepared as described above, and the protein content of the samples was measured, in order to quantify the amount of proteins to be precipitated with acetone. Four times volume of cooled acetone (-20°C) were added to sample volume containing 50 µg of protein extracts. Vortexed tubes were incubated for 60 minutes at -20°C then centrifuged for 10 minutes at 13,000-15,000 x g. The protein pellet was heated for 20 minutes at 95°C and then cooled on ice for 20 minutes before performing, in triplicate, digestion overnight at 37°C by sequencing grade trypsin (12.5 µg/ml; Promega, Madison, Wi, USA) in 30 µl of 25 mmol/L NH₄HCO₃. LC-MS/MS acquisition with a 2-hour gradient. Label-free quantification in between subject analysis was performed on raw data with Progenesis-Qi software 4.1 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K.) using the following procedure: (i) chromatograms alignment, (ii) peptide abundances normalization, (iii) statistical analyses of features, and (iv) peptides identification using the Mascot server through Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). A decoy search was performed and the significance threshold was fixed to 0.01. The resulting files were imported into Progenesis-LC software. Normalized abundances of proteins from trypsin digests with similar normalized abundance variations (ANOVA p value < 0.05) were classified together by the AutoClass Bayesian clustering system and visualized with Javatreview (<http://jtreeview.sourceforge.net/>).

Results

RNA-Seq landscape and Identification of differentially expressed genes (DEG)

The transcriptome of fibroblasts from 3 *cb1C* and 4 *cb1G* patients was analyzed by RNA sequencing and compared to a control cell line with 3 biological replicates of each cell line. Description of the cell lines are presented in Supplementary Table S1. In *cb1C* cells, differential expression analysis (false discovery rate or FDR<0.05 and fold change or FC>1.5) identified 84 genes with significantly increased expression and 90 genes with significantly decreased expression. In *cb1G* cells, 110 genes were upregulated and 73 genes were down-regulated. We identified a subset of 51 genes that was also up-regulated in *cb1C* and in *cb1G* cells, while 36 genes were found down-regulated in both groups (Fig. 1a). The ten DEG with the higher positive fold change and the ten with the higher negative fold change are presented in Table 1 with the associated p-value, FDR and a short summary of their function and the known associated pathologies. It is interesting to note that these genes are either down or over-expressed in both cell types with dramatic values of fold change. Several genes are associated with cardiac dysfunction (*TLL1*, *TRPV2*, *DUSP4*, *PPARG*) and nervous system development or function (*EPHA5*, *ISL2*,

SAMD5, *CDON*). The full list of differentially expressed genes in both groups is presented in supplementary data (Supplementary Table S2).

Functional analysis of DEG

In order to functionally characterize the DEG, we carried out an annotation analysis using Panther with Gene Ontology (GO) and we sorted the GO terms by decreasing fold enrichment (Fig. 1b). In *cb1C* cells, the analysis revealed a statistically significant down regulation of genes involved in the following pathways: muscle development (GO: 0014706) and differentiation (GO: 0051146) skeletal system development (GO: 0001501) but also neurological processes such as retinal ganglion cell axon guidance (GO: 0031290) and forebrain development (GO: 0030900). In *cb1G* cells, the significant annotations referred mainly to decreased expression of genes associated with anatomical structure development (GO: 0048856), organ development (GO: 0048513) and actin cytoskeleton organization (GO: 0030036). Over-expressed genes in cells from both genetic defects were associated with regulation of localization (GO: 0032879). The finding that cytoskeleton of patient fibroblasts could be affected is consistent with the very high proportion of patient cells with an abnormal morphology compared to control (Supplementary Fig. S1).

Experimental validation of RNA-Seq data

In order to validate the transcriptomic data obtained by RNA-Seq, 28 genes were selected on the basis of their fold change, differential expression and potential relevance in the pathophysiology of the disease. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) of this set of genes was performed with mRNA from the same cell lines used in the RNA-Seq study (Fig. 2a). Most RT-qPCR results confirm the transcriptomic data with 25 genes validated in *cb1C* cells (89%) and 21 genes in *cb1G* group (75%) (Fig. 2a). The relationship between RNA-Seq and RT-qPCR results was characterized by the calculation of Spearman's rho coefficient (ρ). The results indicate a strong linear correlation of the expression levels obtained by RNA-Seq analysis versus RT-qPCR. (*cb1C*: Spearman's rho, $\rho = 0.8878$; P-value = $8.57E-7$ *cb1G*; Spearman's rho, $\rho = 0.5978$, P-value = $7.81E-4$; Supplementary Fig. S2). We also selected two other genes that are differentially expressed in *cb1C* but not in *cb1G* cells, *DMD* (FC *cb1C*: -11.55) and *MYH1* (FC *cb1C*: -4), to be validated by western blot and immunofluorescence in one cell line from each group (Fig. 2b). Our results confirm that these two genes are strongly under-expressed in *cb1C* cells only.

Analysis of alternative splicing (AS) events

We have previously demonstrated that impaired *cbl* metabolism, including the *cblC* and *cblG* genetic defects, are associated with abnormal mRNA trafficking and at least aberrant splicing of *IRF3* (Battaglia-Hsu et al. 2018, Ghemrawi et al. 2019). Thus, in order to further investigate the consequences of these inherited disorders on alternative splicing, we analyzed our RNASeq data for changes in alternative splicing events (AS) using rMATS software (Multivariate Analysis of Transcript Splicing; Shen et al. 2014). This software allows the quantification of 5 types of AS events: skipped exons (SE), alternative 5' splice site (A5SS), alternative 3' splice site (A3SS), mutually exclusive exon (MXE) and retained intron (RI). The distribution of the density of genes significantly affected (difference in percentage of spliced index Delta PSI > 5% and FDR <0.01), differs according to the categories of AS events (SE, RI, MXE, A5SS and A3SS) in *cblC* and in *cblG* cells compared to control (Fig. 3a). A difference is also observed both groups with the genes affected by MXE and A5SS being more heterogeneous in the *cblG* cells (Fig. 3a). In both cell lines, more than 70% of the genes were affected by skipped exon while the proportion of other genes affected by A3SS, A5SS, MXE and RI events is relatively the same between the lines *cblC* and *cblG* versus control (Fig. 3b). Compared to control, we identified in *cblC* cells, 850 differential splicing events (Delta PSI > 5%, FDR <0.01) within 719 genes and in *cblG* cells, we found 1206 differential splicing events within 1007 genes (Table 2). A subset of 314 genes were affected in both groups. Among the genes affected by differential AS events, a very small number is also differentially expressed (Table S2). Table 3 shows the 20 genes most significantly differentially spliced with their p-values, FDR and ranked by Delta PSI (Delta PSI > 5% and FDR <0.01). The full list of differentially spliced genes in both groups can be found in Supplementary Table S3.

Functional analysis of differential AS events

In order to gain insights into the potential consequences of the differential AS events, we performed a functional analysis of the affected genes. In *cblC* cells, gene ontology (GO) analysis showed that the top biological processes affected are related to metabolic processes, DNA repair, response to DNA damage and cellular stress, cytoskeleton organization but also modification of macromolecules including methylation and histone modification (Fig. 4). More importantly, the main molecular functions affected by the altered alternative splicing are functions related to the contribution of one carbon metabolism in the regulation of gene expression such as protein-lysine N-methyltransferase, SAM-dependent methyltransferase and also RNA binding activities. In *cblG* cells, the GO analysis also showed an involvement of differentially expressed genes in protein modification processes such as H3-K9 histones, repair of DNA damage, cytoskeleton organization, gene expression and RNA binding.

Experimental validation of alternative splicing by RT-PCR

In order to corroborate the rMATS analysis, we selected 5 genes affected by skipped exon (*XIAP*, *BMF*, *EEF1AKMT1* and *PRMT2*) or by alternative 5' splice site (*MBD*) in order to validate the AS events by RT-PCR (Table 4). Primers were designed in neighboring exons of AS events (Supplementary Table S4) and were tested on one *cbIC* and one *cbIG* cell line. Our results confirm a difference in the alternative splicing of *XIAP*, *MBD5*, *EEF1AKMT1* and *PRMT2* genes in the *cbIC* and *cbIG* cells compared to the control but no variation for *BMF* (Fig. 5). In the *cbIC* line, the results of the RT-PCR confirmed the difference of exon inclusion for *PRMT2*. A difference in *XIAP* and *MBD5* splicing was also observed but the results differed from the rMAPS analysis. In the *cbIG* line, we confirmed the rMATS results for *XIAP*, *BMF* and *EEF1AKMT1* genes and we detected a difference in *MBD5* splicing that differs from the rMATS data.

Identification of the RBP involved in differential AS events

In order to investigate further our hypothesis of the contribution of the RBP in the dysregulation of mRNA trafficking and alternative splicing detected in *cbIC* and in *cbIG* cells, we examined the regions surrounding the differential alternative splicing events previously identified, to identify the motifs or binding sites of RBPs that could be significantly over-represented. Thus, we submitted the rMATS outputs with the rMAPS software using the default parameters, to generate RNA-maps for the identification of consensus sequences. In total, we identified 66 motifs around alternatively spliced exons in *cbIC* and 49 motifs in *cbIG* cells. The number of RBP recognizing these patterns are 43 in *cbIC* and 44 in *cbIG* (Fig. 6a). Among the 25 RBP shared by *cbIC* and *cbIG* cells, 14 were supposed to contribute to SE events. The full list of RBP associated with each consensus sequence ranked by decreasing enrichment (pattern > 2 and log (p) > 2.8) can be found in Supplementary Table S5. In order to identify the RBP that are particularly involved in the AS events found in patient cells, we have calculated the enrichment of their targets in the total number of genes affected by AS events using the reference Starbase V3 data for the RBP whose information about target genes are available. Our data indicate a significant enrichment for 2 RBP in the *cbIC* cells only (*PCBP2* and *SRSF7*), 6 RBP in the *cbIG* group (*HNRNPL*, *KHDRBS1*, *MSI1*, *RBM5*, *SRSF10* and *SRSF3*) and 13 RBP in the two genetic defects (*ELAV1/HuR*, *FMR1*, *HNRNPC*, *HNRNPK*, *IGF2BP2*, *IGF2BP3*, *LIN28A*, *PTBP1*, *RBM37*, *SRSF1*, *SRSF9*, *TARDBP*, and *TIA1*) (Fig. 6b).

Subcellular localization of RBP

We have previously discovered that abnormal mRNA metabolism associated with impaired *cbl* metabolism resulted mislocalization of RBP (Battaglia-Hsu et al. 2018; Ghemrawi et al. 2019). Thus, we decided to investigate the subcellular localization of a subset of RBP whom contribution in differential AS events was highlighted by the

rMAPS analysis by analyzing the subcellular localization of TDP43, FMR1, SRSF7, TIA1, HNRNPK and HNRNPL by immunofluorescence and confocal microscopy in control, *cb1C* and *cb1G* fibroblasts (Supplementary Figures S3 and S4). In contrast to ELAV1/HuR that was previously found mislocalized in patient fibroblasts, we did not detect any difference in the subcellular localization of those RBP between patient and control cells.

Proteomic analysis and expression level of HNRNPL

Since the subcellular localization of these RBP was not altered in patient cells, we next analyzed their expression level. A proteomic analysis was performed on the same set of *cb1C* and *cb1G* cells by nano-LC/MSMS coupled to an Orbitrap Fusion ETD mass spectrometer. Functional annotation of the differentially expressed proteins (FC>1.25; pvalue<0.05; Supplementary Tables S6 and S7) revealed that mRNA processing (GO:0006397) was significantly disturbed in *cb1C* (pvalue<0.0005) but not in *cb1G* cells. However, we found that HNRNPL, one of the RBP identified in our rMAPS analysis, was significantly over-expressed in *cb1C* (FC 4.28; pvalue 0.006) and in *cb1G* cells (FC 3.36; pvalue 0.013). The overexpression of HNRNPL in cells with both defects was further confirmed by western blotting and quantification of immunostaining (Fig. 7).

Role of HuR and HNRNPL in the transcriptomic and proteomic modifications in patient cells

Our previous data have highlighted the major role of HuR in the transcriptomic changes associated with impaired *cb1* metabolism (Battaglia-Hsu et al. 2018). Moreover, we have also shown using *cb1C* and *cb1G* cells that this effect resulted from its mislocalization and not from a modified expression level (Battaglia-Hsu et al. 2018; Ghemrawi et al. 2019). However, our data also underscore the contribution of HNRNPL in the alterations of alternative splicing while its subcellular localization remains unchanged in contrast to an increase expression. Thus, in order to investigate the contributions of these two RBP in the transcriptomic and proteomic modifications associated with the *cb1C* and *cb1G* defects, we calculated the enrichments of their respective targets in the genes that we found differentially transcribed, alternatively spliced and expressed (Table 5). Significant values for HuR were found for the differential alternative splicing events (*cb1C*: 1.62 (pvalue 3.85 10E-11); *cb1G*: 1.63 (6.86 10E-23)) and protein expression (*cb1C*: 1.51 (5.51 10E-4); *cb1G*: 1.55 (1.02 10E-3)) for both genetic defects. Similar values were found for HNRNPL for alternative splicing (*cb1C*: 1.74 (7.96 10E-2); *cb1G*: 1.83 (1 10E-20)) but not for protein expression (*cb1C*: 1.22 (0.51); *cb1G*: 1.53 (0,17)). No significant enrichment for the two RBP was found in the lists of the differentially transcribed genes in the two cell types.

Discussion

By analyzing the whole transcriptome of *cbIC* and *cbIG* cells, our study aimed at two main goals. First, we sought to characterize the gene expressions disrupted by these genetic defects that could contribute to the pathomechanisms of their clinical outcomes. Second, we wanted to investigate further the hypothesis based on our previous findings that the altered function of RBP associated with *cbIC* and *cbIG* disorders could affect gene expression by disturbing normal splicing. In order to achieve these goals, we analyzed the RNA sequences of the transcriptome and mRNA splicing in fibroblasts from 4 different *cbIG* patients carrying mutations in the *MTR* gene and from 3 *cbIC* patients with a defect in the *MMACHC* gene. We also performed a proteomic analysis of the same cells in order to confirm our findings about the contribution of RBP in the consequences of the transcriptomic deregulation.

A small number of studies have already described some modifications in gene expression in patient cells with genetic defects of intracellular metabolism of cobalamin. Fibroblasts from patients with mutations in *HCFC1* (*cbIX* defect) or in *THAP11* gene shared some similarities in their transcriptome with a cluster of 46 differentially expressed genes compared to the controls (Quintana et al. 2017). Modifications of protein expression in patient cells with *cbID-MMA* defect have also been reported in an analysis of mitochondria, that lead to the identification of proteins mainly involved in apoptosis, oxidative stress and cell metabolism (Richard et al. 2006). Two other studies focused on *cbIC* cells identified changes of protein expression involved mainly in cytoskeleton organization, nervous system signaling, energy metabolism and cellular detoxification (Caterino et al. 2015; Hannibal et al. 2011).

Our results revealed dramatic transcriptomic changes in *cbIC* and in *cbIG* patient fibroblasts affecting developmental processes of muscles, bones and nervous system, in agreement with the manifestations of early onset of the disease (Fischer et al. 2014; Huemer et al. 2015). Among the most differentially expressed genes (DEG), several code for transcription factors that trigger cascades of dysregulation. Indeed, we found a massive decrease in the expression of the transcription factors *ISL2* and *FOXE1* with a fold change in *cbIC* cells reaching 58 and 128 and in *cbIG* cells 30 and 145, respectively.

Interestingly, the functional analysis of DEG also highlighted a significant enrichment of genes involved in cytoskeleton organization, confirming a previous proteomic analysis of *cbIC* cells (Hannibal et al. 2011). Many studies indicate that consequences of cytoskeleton abnormalities could contribute to the development of neurological and cardiac dysfunctions. Indeed, we have previously shown in a cellular model of folate deficiency that disorganization of the cytoskeleton could lead to impair vesicular transport and synaptic functions (Akchiche

et al. 2012). It has also been shown that alterations of cytoskeleton could affect cell motility and axon guidance in patients with amyotrophic lateral sclerosis (Prudencio et al. 2015; D'Erchia et al. 2017).

Furthermore, our results indicate that among the differentially expressed genes identified in our study, many of them code for cytoskeletal proteins that have been directly associated with cardiac and neurological disorders.

Our RNAseq shows also DEG of genes potentially involved in cardiomyopathy manifestations presented by *cb1C* and *cb1G* patients. *MYH10* gene is strongly downregulated in *cb1C* and *cb1G* cells with a fold change (FC) close to 6 in both cell lines. Mutations in the *MYH10* gene, that encodes a non-muscle myosin, have been associated with developmental defects in brain and heart (Ridge et al. 2017). Moreover, *MYH10* mutations were also associated in mice with severe cardiac defects including ventricular septal defect (Ma and Adelstein, 2014). The protein encoded by *PDLIM3* or *ALP*, two genes down-regulated in *cb1C* and in *cb1G* cells with a fold change reaching -19 and -69 respectively, is supposed to be involved in cytoskeletal assembly and plays an important role in mice cardiac muscles. Indeed, *PDLIM3* deficient mice lead to right ventricular chamber dilatation and dysfunction suggesting a role in the onset of cardiomyopathy (Pashmforoush et al. 2001). The *TLL1* gene codes for a metalloprotease that is crucial for the development of mammalian heart and was downregulated in both cell types (FC *cb1C* -19; FC *cb1G* -68.6) (Clark et al. 1999). The role of this gene was further confirmed by the identification of deleterious mutations of *TLL1* in four non-related patients with atrial septal defect (Stańczyk et al. 2009). *DMD* is another important gene strongly under expressed in *cb1C* cells. It encodes dystrophin, a protein that connects the filamentous actin cytoskeleton to the extracellular matrix. Since the role of this protein is to stabilize the plasma membrane, a functional deficiency of dystrophin leads to progressive muscle weakness leading to loss of ambulation, respiratory complications and heart failure. Indeed, dilated cardiomyopathy is considered as a major cause of death in patients with *DMD* mutations (Kamdar et al. 2016). The precise molecular mechanisms causing the cellular damage triggered by the lack of dystrophin are still poorly understood. However, the main hypotheses suggest a direct mechanism, dysregulation of calcium pathways and an increased oxidative stress (Allen et al. 2016). In addition to the F-actin structures, the dystrophin protein complex is also associated with the microtubules and intermediate filaments and the role of the cytoskeleton in heart failure is well documented (Hein et al. 2000). Several genes up-regulated in *cb1C* and in *cb1G* cells is also associated with cardiac disorders. The overexpression of *DUSP4*, which encodes a dual-specificity protein phosphatase that can inactivate MAP kinases, has been observed in dilated cardiomyopathy (Communal et al. 2002). Moreover, specific cardiac overexpression of *DUSP4* is sufficient to cause cardiomyopathy in transgenic mice (Choi et al. 2012). *PPARG* is another gene up-regulated in *cb1C* and *cb1G* fibroblasts. It encodes the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) a ligand-

activated transcription factor that regulates tissue triglyceride accumulation. Its overexpression in mice has been associated with dilated cardiomyopathy (Son et al. 2007). PPAR γ expression is repressed by SIRT1 (Picard et al. 2004). We found an upregulation of PPAR γ concurrently with a decreased expression of PPAR α and SIRT1 in rats exposed to the fetal programming of the deficiency in vitamin B12 and folate and a decreased expression of SIRT1 in fibroblasts from patients with inherited disorders (Moreno Garcia et al. 2013; Ghemrawi et al. 2019). Thus, the upregulation of *PPARG* reported in our patient cells is likely to result from the decreased activity of SIRT1 associated with impaired vitamin B12 metabolism (Guéant et al. 2013; Ghemrawi et al. 2019).

Our RNAseq shows DEG of genes potentially involved in the neurologic disorders presented by *cb1C* and *cb1G* patients. *EPHA5* is a gene that was found to be strongly down-regulated in both *cb1C* and *cb1G* cells (FC *cb1C*: 211; FC *cb1G*: 13) and it has been found to be crucial for synaptogenesis during hippocampus development. This protein coded by gene is a member of the ephrin receptors that participate in various cellular functions such as immune cell development and neuronal cell migration, including retinal ganglion cell axon guidance (Murai and Pasquale, 2004). Another gene strongly down-regulated in patient fibroblasts that has been associated with neurological and visual problems is *ISL2* (FC *cb1C*: 58; FC *cb1G*: 30), that codes for a transcription factor important for motoneurons in the embryonic spinal cord and for the pathfinding of retinal ganglion cell axons (Thaler et al. 2004; Pak et al. 2004).

Some of the up-regulated genes found in our cells could also contribute to the development of neurological disorders. Indeed, we reported an over-expression of *LYNX1* (FC *cb1C*: 10.9; FC *cb1G*: 8.4), a gene coding for a membrane protein known to modulate the function of nicotinic acetylcholine receptors, which contribute to a wide array of functions, including learning and memory. Interestingly, the increased expression of *LYNX1* impairs plasticity in the primary visual cortex of mice while its absence enhanced learning and memory abilities (Miwa et al. 2006; Morishita et al. 2010).

We also found an up-regulation of *DAPK1* (FC *cb1C*: 10.5; FC *cb1G*: 14.6), which codes for a Ser/Thr kinase that plays important roles in neural development. *DAPK1* contributes to the pathogenesis of many neurological diseases including epilepsy, Alzheimer and Parkinson disease. Indeed, overexpression of *DAPK1* has been observed in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and is sufficient to produce locomotor abnormalities and death of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease (You et al. 2016; Su et al. 2018).

It is well known that disruptions in RNA metabolism, including aberrant alternative mRNA splicing, are associated with many pathologies, such neurological diseases, dilated cardiomyopathy, retinitis pigmentosa and many types

of cancer (Scotti and Swanson, 2016). Thus, in addition to investigate quantitative changes in the transcriptome of *cbIC* and *cbIG* cells, we also aimed at identifying the potential alterations of alternative splicing. Our results reveal that the number of differentially spliced genes (719 in *cbIC* group and 1007 in *cbIG* group) is much higher than the number of genes differentially expressed (174 genes in *cbIC* group and 183 in *cbIG* group; FDR<0.05; FC<1.5). Analysis of these differentially spliced genes indicated a significant enrichment in functions related to cellular response to stress, cytoskeleton organization and regulation of gene expression by methylation. We confirmed the alteration of alternative splicing by RT-PCR in *MBD5*, which encodes a protein of the methyl-CpG-binding domain (MBD) family that also includes *MECP2*, a gene associated with the Rett syndrome. Alterations of *MBD5* have been associated with epileptic encephalopathies, intellectual disability and autism spectrum disorder (Carvill et al. 2013; Talkowski et al. 2011). A study performed with a mouse model of Rett syndrome has revealed that the loss of *MECP2* function was not only associated with widespread aberrations in gene expression but also with anomalous patterns of alternative splicing following neuronal stimulation (Osenberg et al. 2018).

We have recently demonstrated using *cbIC* and *cbIG* patient fibroblasts, that these genetic defects are associated with global mRNA mislocalization and abnormal subcellular localization of the RNA binding-proteins HuR, HnRNPA1 and SRSF1 (Battaglia-Hsu et al, 2018; Ghemrawi et al. 2019). Our analysis of RNA motifs suggests that other RBPs play also important roles in the aberrant splicing detected in *cbIC* and *cbIG* fibroblasts: PCBP2 and SRSF7 in *cbIC* cells, HNRNPL, KHDRBS1, MSI1, RBM5, SRSF10 and SRSF3 in *cbIG* cells and ELAV1/HuR, FMR1, HNRNPC, HNRNPK, IGF2BP2, IGF2BP3, LIN28A, PTBP1, RBM37, SRSF1, SRSF9, TARDBP, and TIA1 in both cell types. Even though most of these RBP were not found to be mislocalized in patient cells, our data indicate that HNRPNL is indeed over-expressed in *cbIC* and in *cbIG* fibroblasts. We also noticed that *HNRNPL* mRNA, as well as many of the most relevant genes differentially expressed in our study are known targets of HuR (*DMD*, *MYH10*, *PPARG*, *DUSP4*, *DAPK1*). Thus, our findings suggest that changes in HNRNPL expression could result from altered HuR subcellular localization and confirm our previous reports about the crucial role of HuR in the consequences of impaired metabolism of cobalamin (Battaglia-Hsu et al, 2018; Ghemrawi et al. 2019).

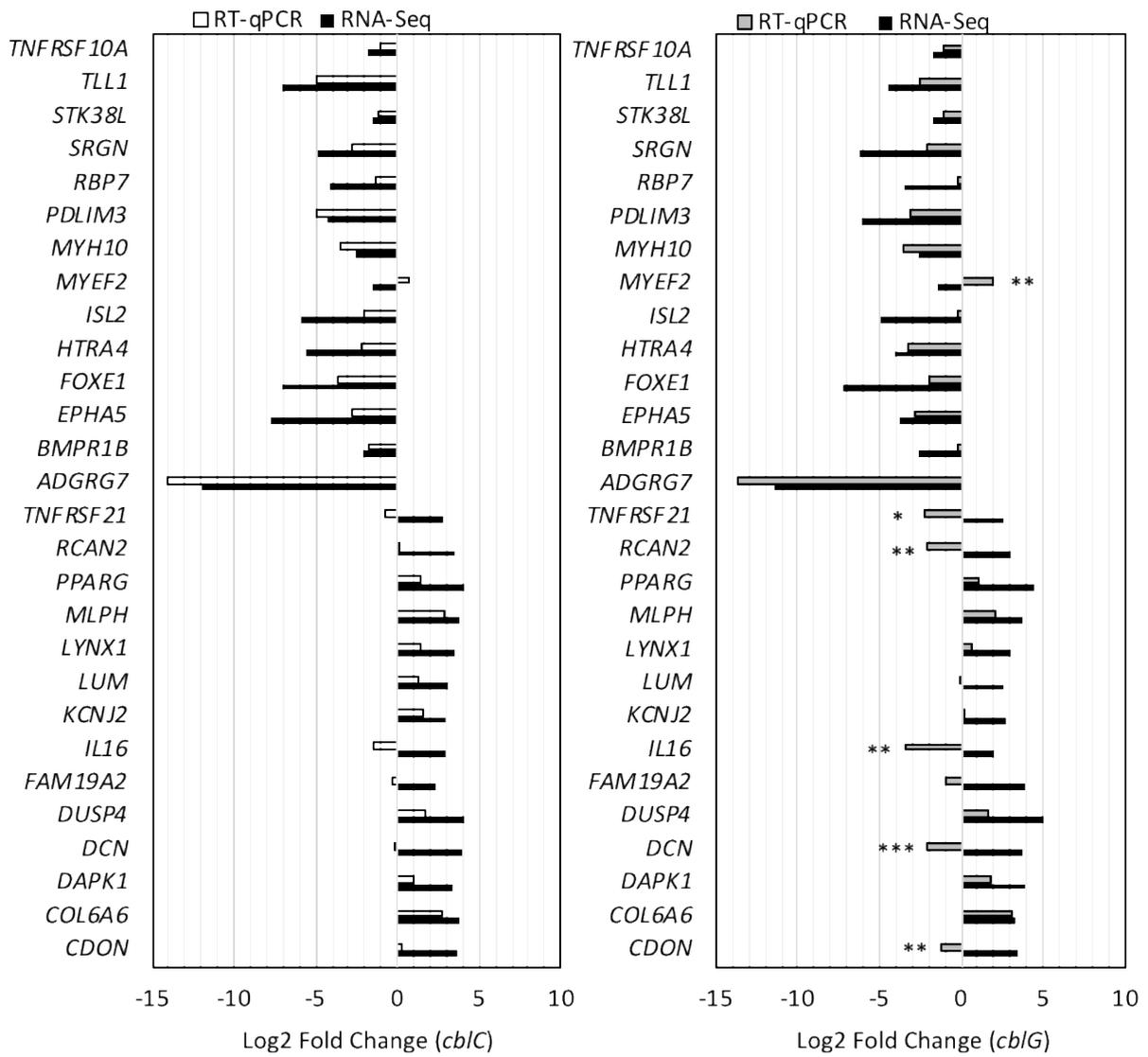
In summary, our data clearly show that the *cbIC* and *cbIG* defects lead to altered expression and splicing of genes involved in developmental processes and heart and neurological pathomechanisms, which are consistent with the manifestations observed in patients. The finding that many of these dysregulated genes are directly involved in known pathologies confirm previous proteomic studies made with *cbIC* cells (Hannibal et al, 2011; Caterino et al,

2015). Moreover, we found that abnormal alternative splicing associated with both genetic defects also affects important biological processes such as cytoskeleton organization, modification of proteins involved in gene expression and RNA binding. Even though the analysis of our transcriptomic data at a quantitative level did not highlight the role of a specific RBP, our study reveals that these molecules play a major role in the alterations of alternative splicing and protein expression associated with the *cbIC* and *cbIG* defects. The characterization of the specific contribution of each RBP on the transcriptome and on the proteome will require further experiments and will raise novel perspectives in the understanding of the molecular mechanisms underlying the clinical manifestations presented by patients with *cbIC* and *cbIG* defects of cobalamin metabolism. Moreover, our study also suggest that the rescue of the mislocalization of RBP such as HuR, could constitute an potential novel strategy in the treatment of severe cases who are resistant to classical treatments with co-enzyme supplements.

Funding

This work was supported by Fondation Jérôme Lejeune, CHRU Nancy Hospital and Région Lorraine.

A



B

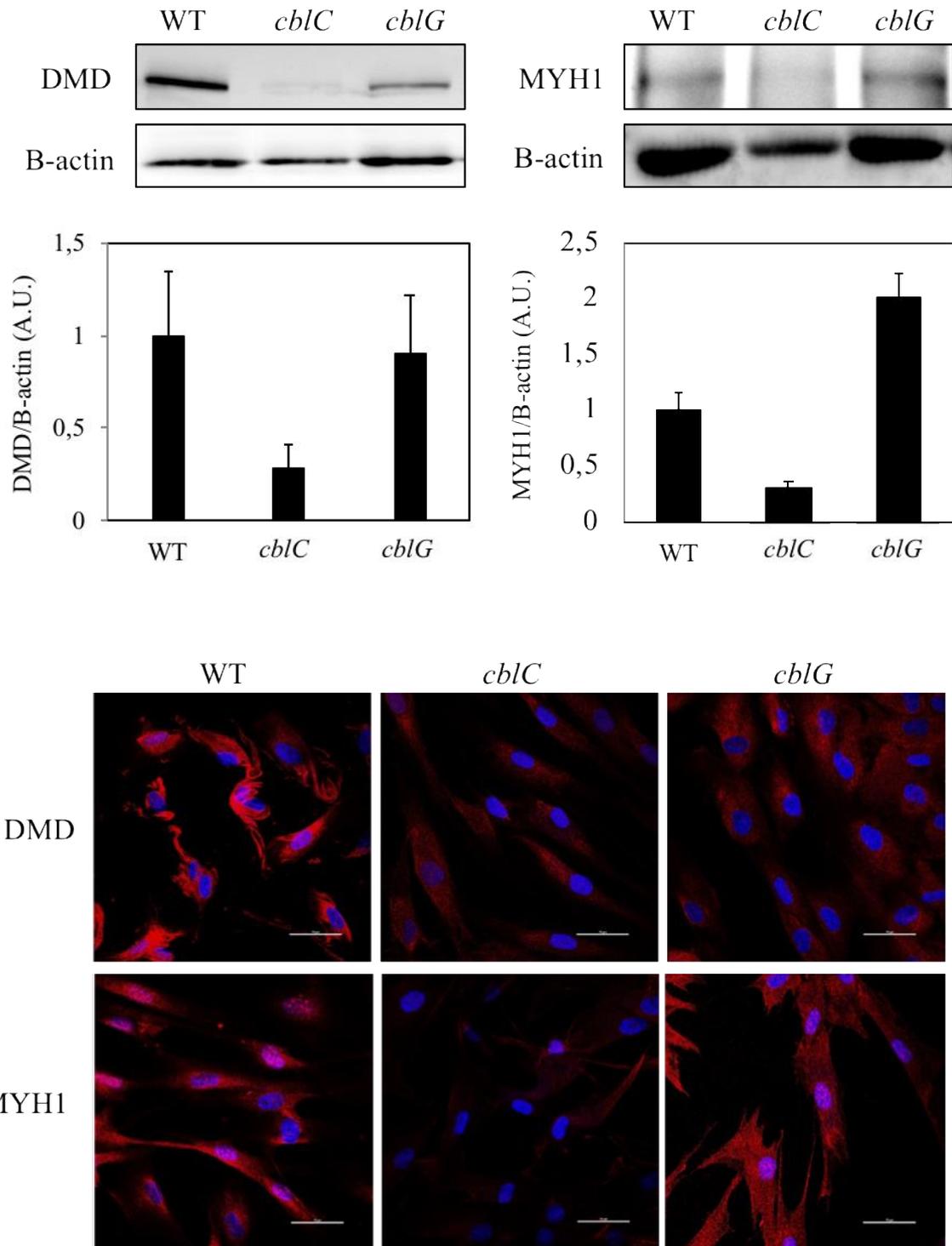
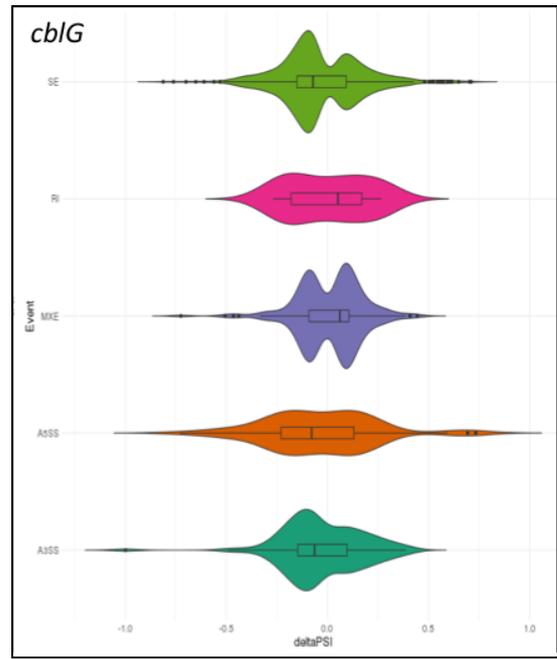
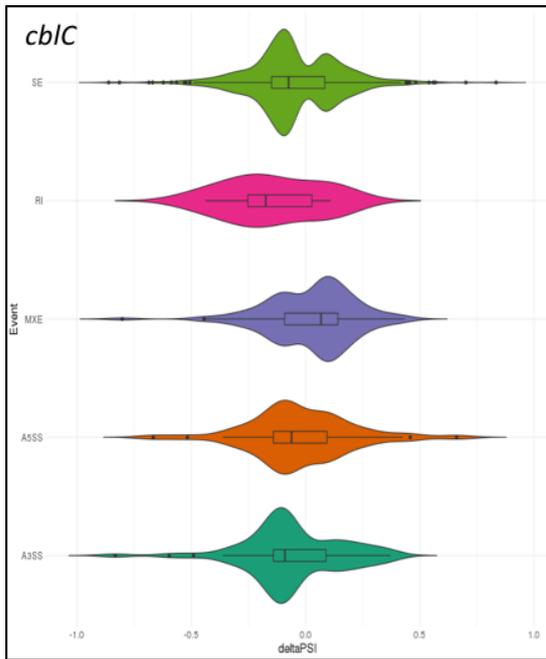


Fig. 2 RT-qPCR validation of the DEGs. Comparison of the fold change obtained by RNA-Seq and by RT-qPCR for a selection of 28 genes

A



B

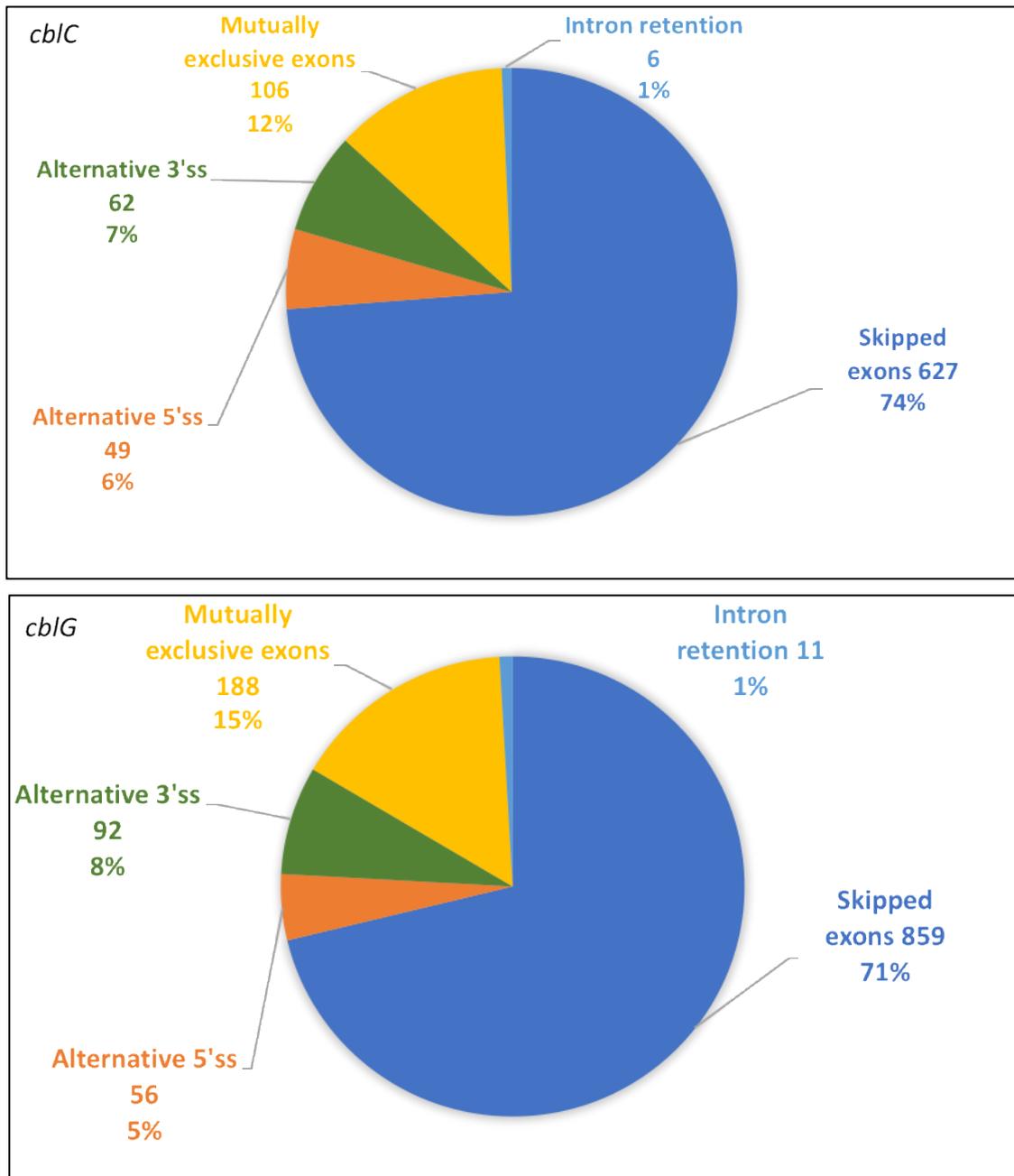


Fig. 3 Alternative splicing (AS) analysis in *cb1C* and *cb1G* patient fibroblasts. **a** Violin plots representing the density of differential alternative splicing events found in *cb1C* (N=3x3) and *cb1G* (N=4x3) replicate samples compared to control (N=3) (rMATS analysis, FDR < 1% and delta-PSI > 5%). **b** Number and relative proportions of differential AS events found in patient cells compared to controls (rMATS analysis, Delta PSI >5%, FDR<0,01)

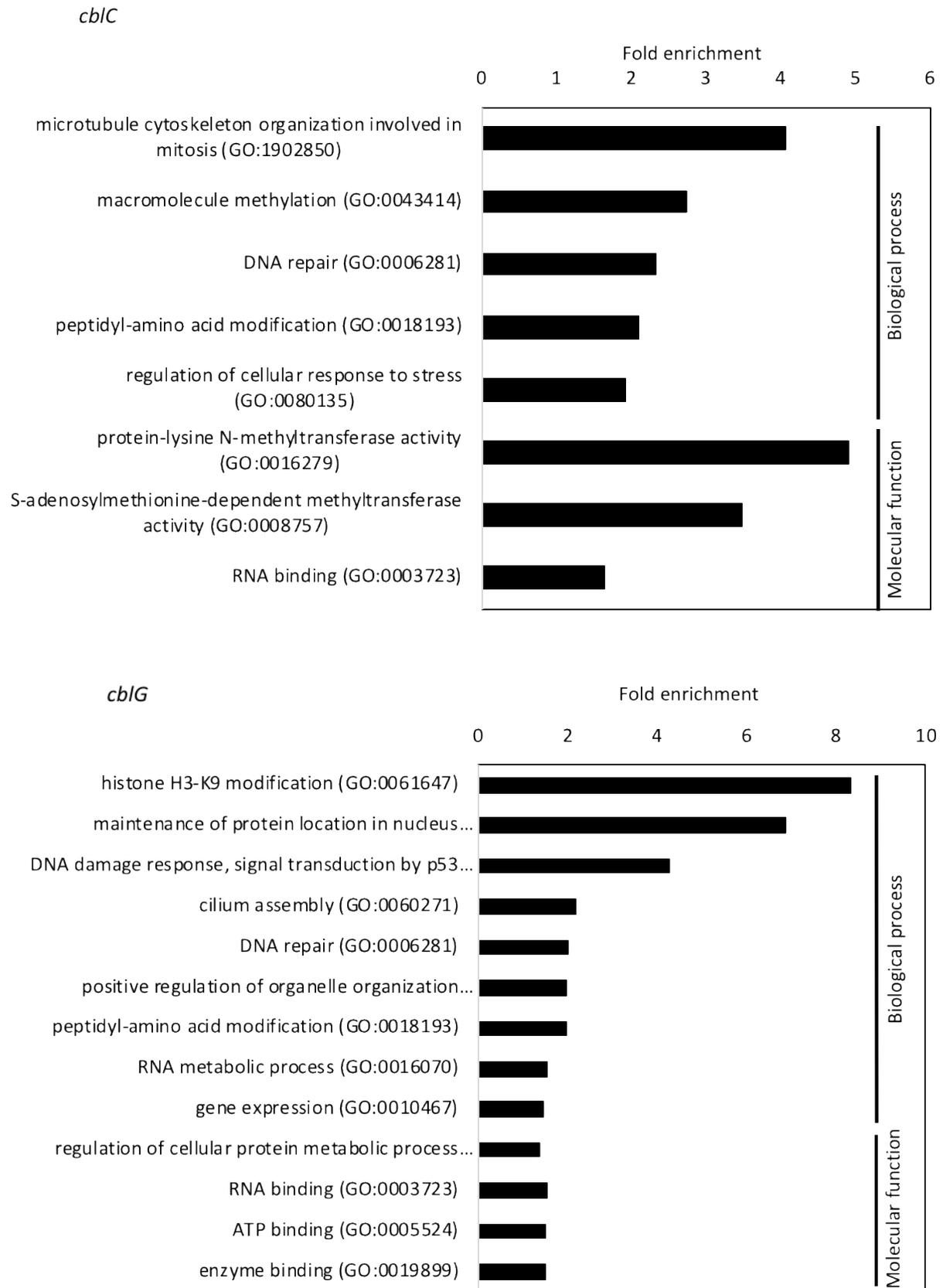


Fig. 4 Functional annotations with relative fold-enrichment of the genes affected by differential alternative splicing (Panther analysis).

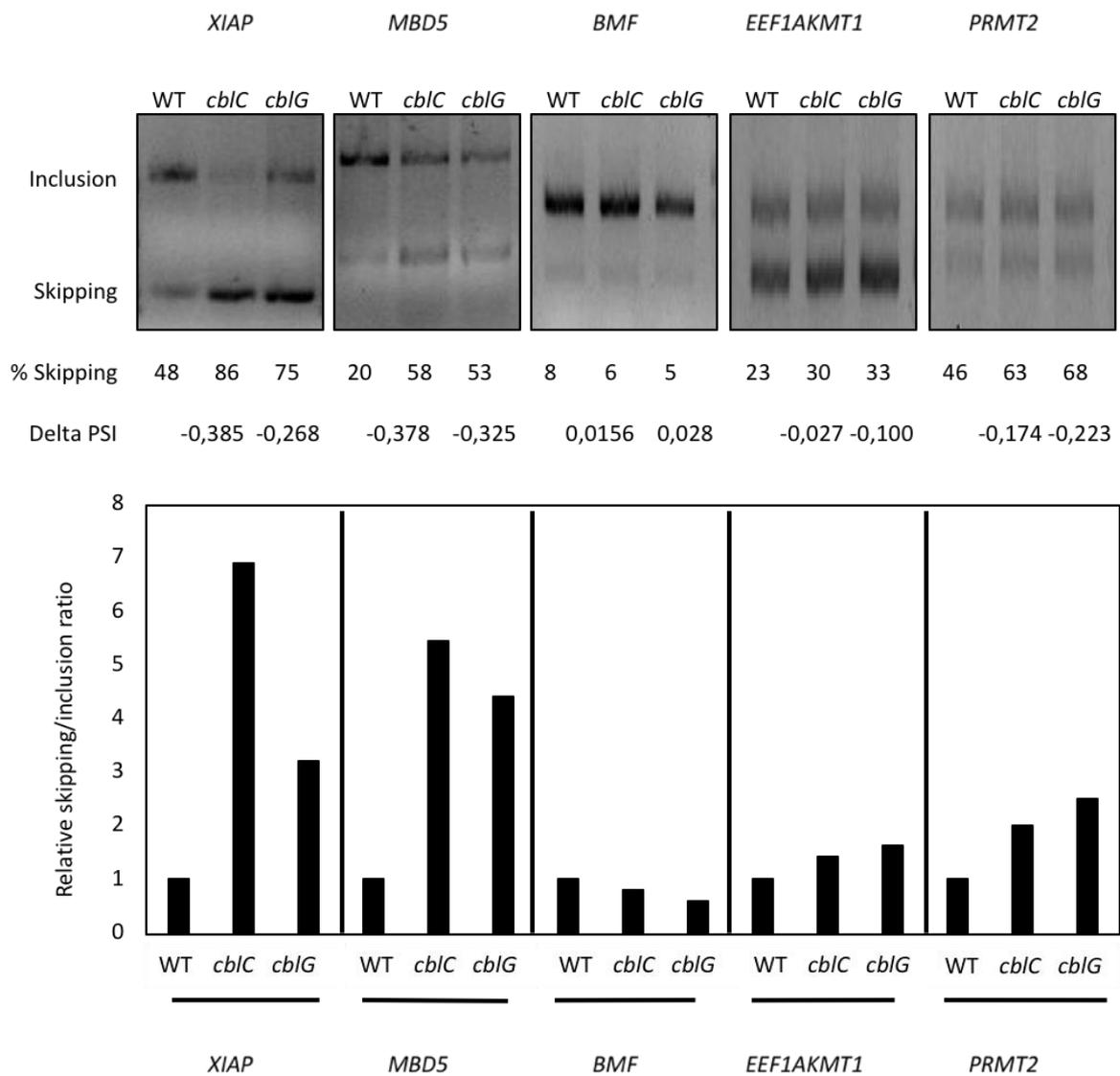


Fig. 5 Experimental validation by RT-PCR of abnormal alternative splicing in *cbIC* and *cbIG* fibroblasts compared to control. The proportion of exon skipping was calculated by densitometric analysis of the bands and the Delta PSI were obtained from the rMATS analysis.

A

Number of consensus sequences and associated RBP
(log(p)>2,8; Enrichment >2)

Events	<i>cbIC</i>		<i>cbIG</i>		Common <i>cbIC-cbIG</i>
	Consensus sequences	RBP	Consensus sequences	RBP	RBP
SE	35	32	23	23	14
A5SS	4	3	7	7	0
A3SS	9	7	8	8	2
MXE	17	9	10	5	0
RI	0	0	1	1	0
Total	66	43	49	44	25

B

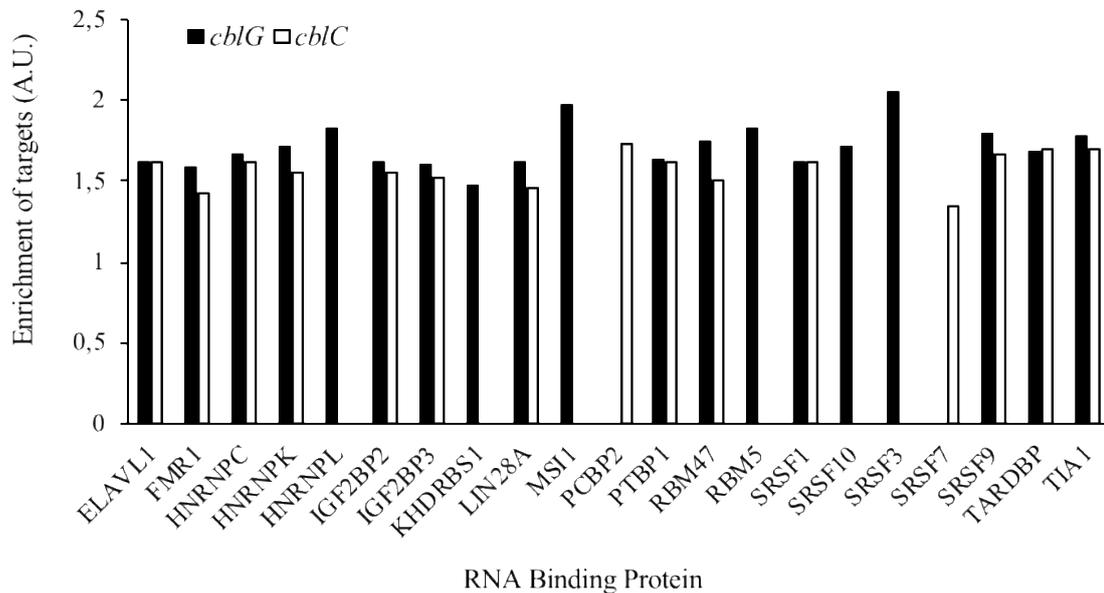


Fig. 6 Identification of RNA Binding Proteins responsible for abnormal alternative splicing events in *cbIC* and *cbIG* fibroblasts. **a** Number of consensus sequences and associated RNA binding proteins significantly enriched in differential alternative splicing events identified in *cbIC* and in *cbIG* cells. **b** Enrichment of RBP targets identified in differential alternative splicing events.

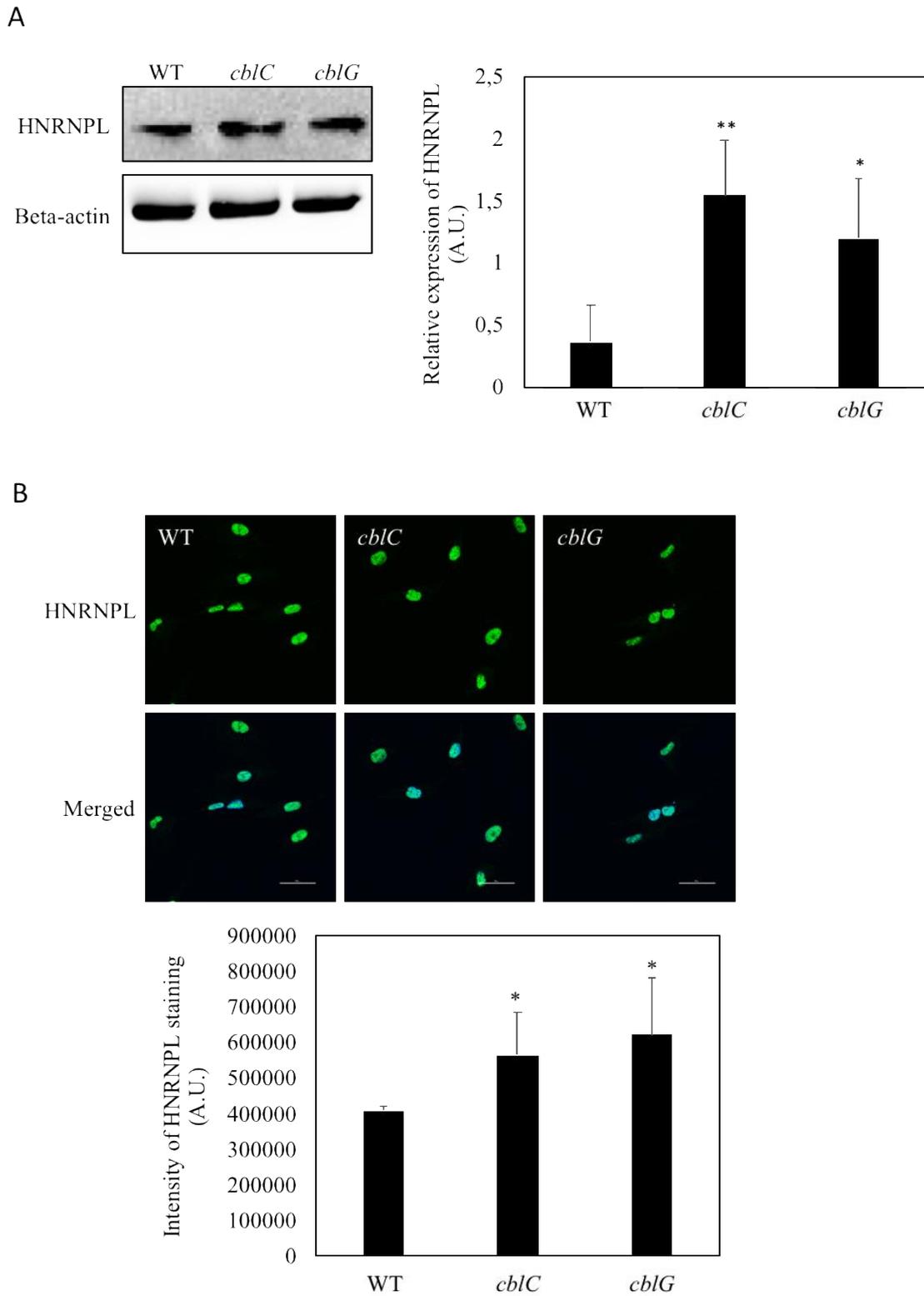


Fig. 7 Expression of HNRNPL in *cblC* and *cblG* fibroblasts compared to control. **a** Western blot of HNRNPL and densitometric analysis expression (n=3). Beta-actin was used as an internal control of protein expression. **B** Immunofluorescence staining of HNRNPL. Fibroblasts were stained with anti-HNRNPL and DAPI and visualized by confocal microscopy. Intensity of the staining was measured using Image J freeware (n=3).

Tables:

Gene	Log2 FC		p-value		FDR		Functions
	<i>cb1C</i>	<i>cb1G</i>	<i>cb1C</i>	<i>cb1G</i>	<i>cb1C</i>	<i>cb1G</i>	
<i>ADGRG7</i>	-11,95	-11,48	5,45E-17	2,63E-17	9,17E-13	4,42E-13	G protein-coupled receptor
<i>EPHA5</i>	-7,72	-3,71	9,46E-06	4,86E-04	3,38E-03	4,23E-02	Protein-tyrosine kinase (nervous system development)
<i>TLL1</i>	-7,1	-4,52	2,61E-05	1,96E-04	7,41E-03	2,46E-02	Zinc-dependent, metalloprotease (development of mammalian heart)
<i>FOXE1</i>	-7,00	-7,18	1,14E-07	3,55E-08	1,60E-04	3,73E-05	Transcription factor (cleft palate, thyroid morphogenesis)
<i>FAM9C</i>	-6,43	-4,02	2,63E-06	2,81E-06	1,44E-03	1,21E-03	Anti-apoptotic nuclear protein
<i>ISL2</i>	-5,87	-4,9	1,48E-08	1,99E-08	2,49E-05	2,56E-05	Transcription factor (nervous system)
<i>HTRA4</i>	-5,67	-4,06	5,29E-07	1,50E-06	4,88E-04	7,21E-04	Serine protease (degradation of misfolded proteins)
<i>AP001999.1</i>	-5,5	-3,84	7,37E-06	1,56E-05	3,03E-03	4,85E-03	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA
<i>CCDC144NL</i>	-5,37	-5,2	8,09E-09	3,98E-09	1,51E-05	7,43E-06	Coiled-coil domain-containing protein (diabetic retinopathy)
<i>SRGN</i>	-4,88	-6,17	2,25E-05	3,42E-06	6,52E-03	1,44E-03	Proteoglycan (inflammatory response)
<i>SAMD5</i>	3,54	4,82	5,57E-06	1,59E-08	2,55E-03	2,22E-05	Eph receptor binding protein (nervous system development)
<i>RCAN2</i>	3,56	2,98	3,26E-04	2,67E-04	3,37E-02	2,95E-02	Regulator of calcineurin 2
<i>CDON</i>	3,62	3,49	1,57E-04	3,91E-05	2,16E-02	9,25E-03	Multifunctional co-receptor (myogenesis, neurogenesis)
<i>TRPV2</i>	3,7	3,82	7,18E-05	2,91E-04	1,37E-02	3,13E-02	Stretch-sensitive Ca ²⁺ -permeable channel (cardiomyopathy and muscular dystrophy)
<i>COL6A6</i>	3,85	3,35	1,53E-04	1,23E-04	2,16E-02	1,93E-02	Collagen Type VI Alpha 6
<i>MLPH</i>	3,86	3,79	2,01E-04	9,30E-05	2,59E-02	1,59E-02	Melanophilin
<i>DCN</i>	4,01	3,74	1,04E-06	5,99E-07	7,93E-04	3,59E-04	Small leucine-rich proteoglycan (corneal dystrophy, myogenesis)
<i>DUSP4</i>	4,08	5,05	8,54E-06	2,03E-07	3,26E-03	1,55E-04	Dual specificity phosphatase (cardiomyopathy)
<i>PPARG</i>	4,10	4,47	1,90E-07	6,53E-09	2,28E-04	9,98E-06	Nuclear receptor, regulator of adipocyte differentiation (cardiac dysfunction)
<i>PRXL2A</i>	4,49	4,61	2,95E-04	1,09E-05	3,23E-02	3,73E-03	Peroxiredoxin Like (redox regulatory protein)

Events	Number of differential AS events		Number of genes affected		Genes in common
	<i>cb1C</i>	<i>cb1G</i>	<i>cb1C</i>	<i>cb1G</i>	
SE	627	859	517	686	244
A5SS	49	56	48	55	16
A3SS	62	92	61	87	26
MXE	106	188	87	168	27
RI	6	11	6	11	1
Total	850	1206	719	1007	314

Table 3 Top20 genes affected by events of alternative splicing in *cb1C* and *cb1G* groups (ranked by Delta-PSI)

Event <i>cb1C</i>	Gene	p-value	FDR	Delta PSI (WT- <i>cb1C</i>)	Event <i>cb1G</i>	Gene	p-value	FDR	Delta PSI (WT- <i>cb1G</i>)
SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,834	A5SS	<i>ULK3</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,733
A3SS	<i>XRCC4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,832	A5SS	<i>FAAP20</i>	3,51E-07	5,08E-05	0,731
MXE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,802	MXE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,725
SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,702	SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,711
A5SS	<i>C8orf59</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,666	SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,702
A5SS	<i>ULK3</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,661	A5SS	<i>TTLL3</i>	2,20E-11	9,95E-09	0,693
A3SS	<i>ZNF655</i>	1,06E-10	1,37E-07	0,596	SE	<i>NDUFB2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,649
SE	<i>USP53</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,568	SE	<i>GUSBP11</i>	2,48E-08	5,07E-06	0,615
SE	<i>DRAM2</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,559	SE	<i>USP28</i>	1,52E-05	1,17E-03	0,611
SE	<i>ALDH3A2</i>	9,66E-06	8,27E-04	0,54	SE	<i>AP000347.1</i>	2,70E-08	5,46E-06	0,61
SE	<i>TVP23C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,861	A3SS	<i>XRCC4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-1
SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,814	SE	<i>GHR</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,812
SE	<i>ZNF561</i>	4,26E-10	1,82E-07	-0,685	SE	<i>TVP23C</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,761
SE	<i>DMKN</i>	4,29E-14	3,77E-11	-0,669	SE	<i>TVP23C-CDRT4</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,699
SE	<i>ECHDC2</i>	3,53E-09	1,12E-06	-0,622	SE	<i>LIMS2</i>	0,00E+00	0,00E+00	-0,651
SE	<i>CROCCP2</i>	8,40E-10	3,17E-07	-0,587	SE	<i>AP000347.2</i>	4,74E-06	4,57E-04	-0,61
SE	<i>DMKN</i>	4,83E-11	2,66E-08	-0,564	SE	<i>CCDC74B</i>	6,12E-05	3,45E-03	-0,561
SE	<i>ZNF45</i>	6,32E-07	8,57E-05	-0,53	SE	<i>CCDC74B</i>	6,81E-05	3,74E-03	-0,531
SE	<i>SNX11</i>	1,11E-05	9,22E-04	-0,524	SE	<i>CROCCP2</i>	6,17E-06	5,71E-04	-0,515
SE	<i>CROCCP2</i>	8,52E-10	3,19E-07	-0,523	SE	<i>SENP7</i>	9,35E-12	5,08E-09	-0,505

Table 4 Genes selected for validation of differential alternative splicing events by RT-PCR

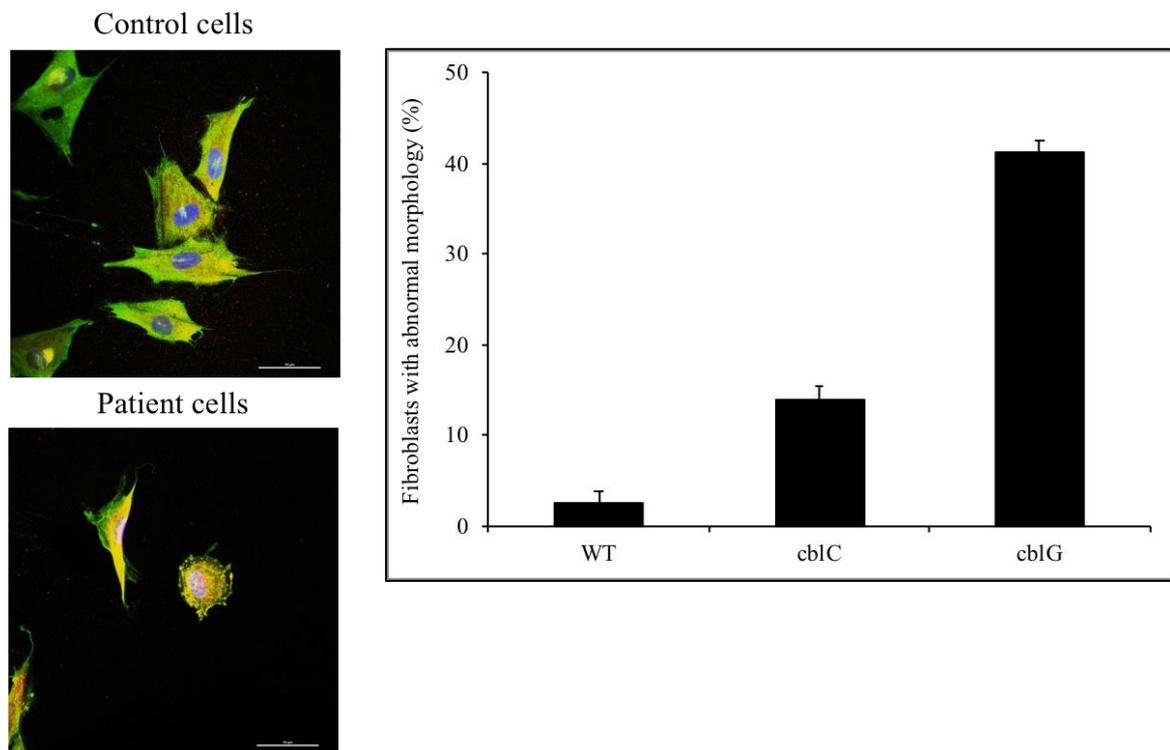
Gene	Transcript	Event	Total size of transcript (pb)	Size of transcript spliced (pb)	Exon number	Delta PSI <i>cb1C</i>	Delta PSI <i>cb1G</i>
<i>XIAP</i>	<i>XIAP-202</i>	SE	1095	186	2	0,272	-0,174
<i>MBD5</i>	<i>MBD5-202</i>	A5SS	1664	570	12	0,251	0,131
<i>BMF</i>	<i>BMF-202</i>	SE	381	220	3	-	0,285
<i>EEF1AKMT1</i>	<i>EEF1AKMT1-201</i>	SE	469	388	3	-	-0,248
<i>PRMT2</i>	<i>PRMT2-202</i>	SE	395	286	2	-0,154	-

Table 5 Enrichment of HuR and HNRNPL in the genes differentially transcribed, spliced and expressed compared to controls (pvalues)

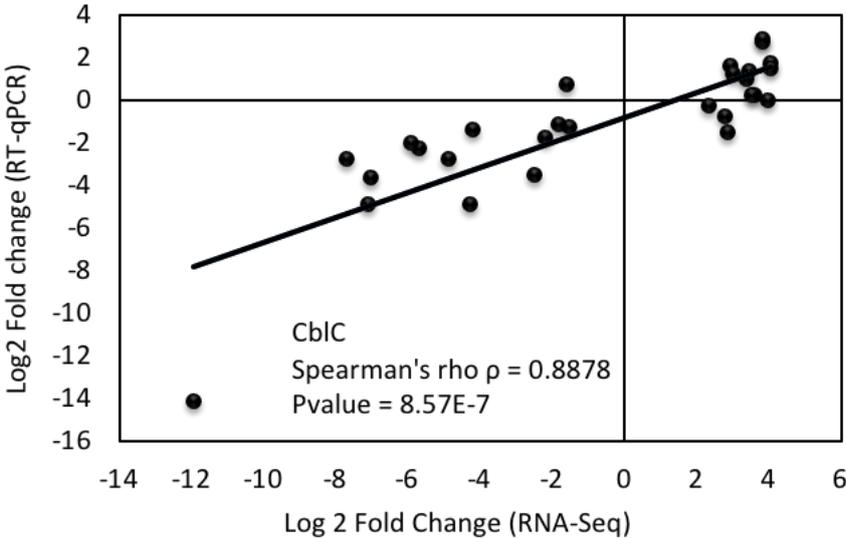
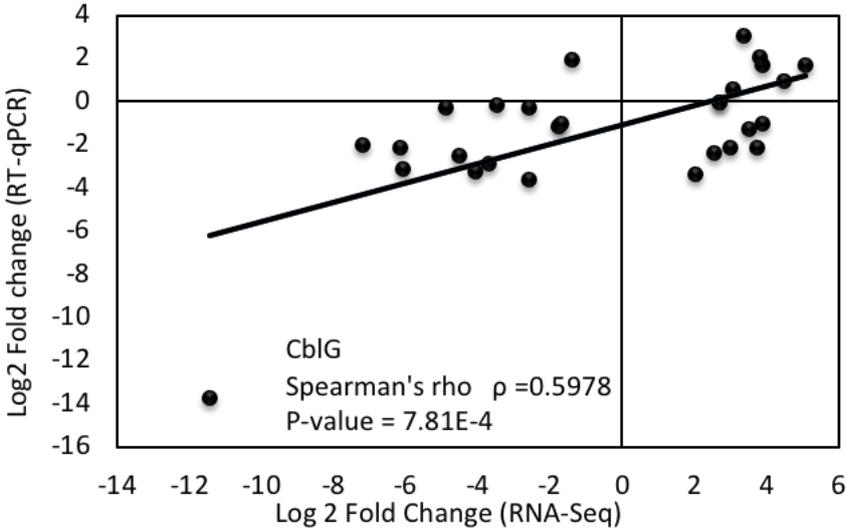
	HuR		HNRNPL	
	<i>cbIC</i>	<i>cbIG</i>	<i>cbIC</i>	<i>cbIG</i>
Transcription level	1.08 (0.57)	1.14 (0.70)	1.06 (0.86)	0.79 (0.53)
Alternative splicing	1.62 (3.85 10 ^E -11)	1.63 (6.86 10 ^E -23)	1.74 (7.96 10 ^E -2)	1.83 (1 10 ^E -20)
Protein expression	1.51 (5.51 10 ^E -4)	1.55 (1.02 10 ^E -3)	1.22 (0.51)	1.53 (0,17)

Supplementary figures

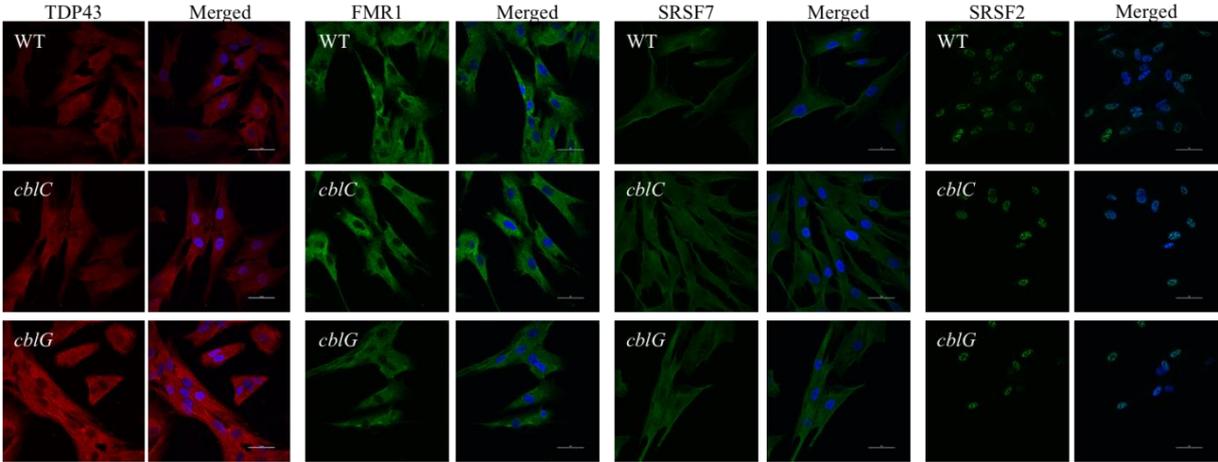
Supplementary Figure S1



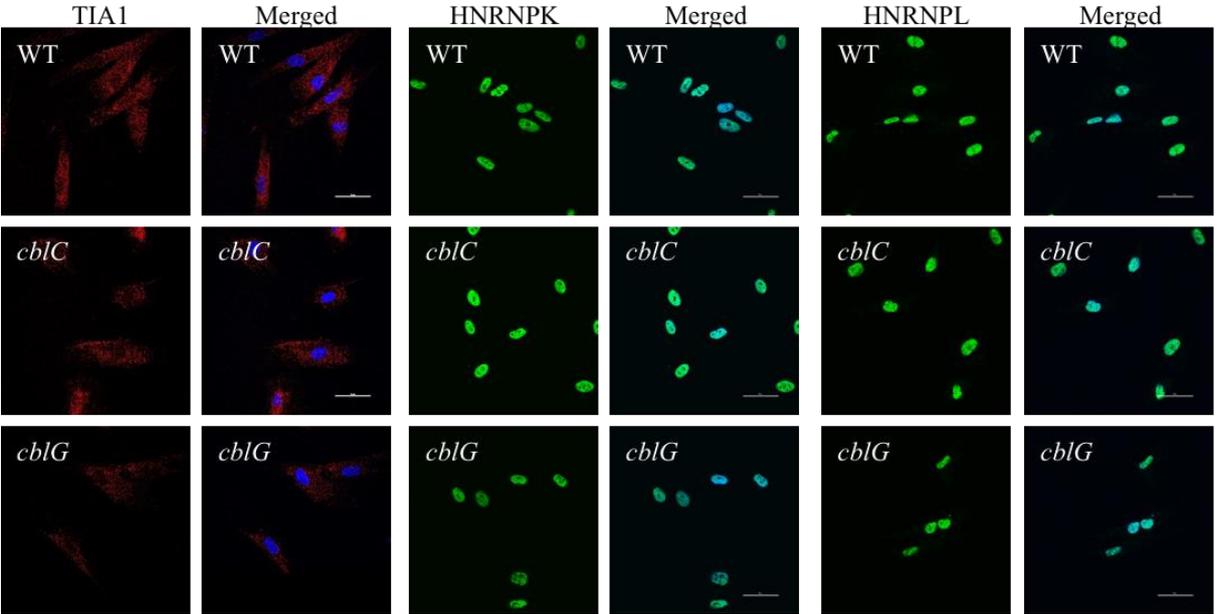
Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S3



Supplementary Figure S4



Supplementary Tables

Supplementary Table S1 = Tableau 6 du manuscrit

Supplementary Table S2 = Annexe 1

Supplementary Table S3 = Annexe 2

Supplementary Table S4 = Tableau 27

Supplementary Table S5 = Annexe 3

Supplementary Table S6 et S7 = Annexe 4

References

Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Kerek R, Martin N, Pourié G, Koziel V, Helle D, Alberto JM, Ortiou S, Camadro JM, Léger T, Guéant JL, Daval JL. Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J*. 2012 Oct;26(10):3980-92. doi: 10.1096/fj.12-205757. Epub 2012 Jun 19.

Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):253-305. doi: 10.1152/physrev.00007.2015

Bassila C, Ghemrawi R, Flayac J, Froese DS, Baumgartner MR, Guéant JL, Coelho D. Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Jan;1863(1):103-112. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.10.016.

Battaglia-Hsu SF, Ghemrawi R, Coelho D, Dreumont N, Mosca P, Hergalant S, Gauchotte G, Sequeira JM, Ndiongue M, Houlgatte R, Alberto JM, Umoret R, Robert A, Paoli J, Jung M, Quadros EV, Guéant JL. Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res*. 2018 Sep 6;46(15):7844-7857. doi: 10.1093/nar/gky634.

Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, Cook J, Khan A, Dorschner MO, Weaver M, Calvert S, Malone S, Wallace G, Stanley T, Bye AM, Bleasel A, Howell KB, Kivity S, Mackay MT, Rodriguez-Casero V, Webster R, Korczyn A, Afawi Z, Zelnick N, Lerman-Sagie T, Lev D, Møller RS, Gill D, Andrade DM, Freeman JL, Sadleir LG, Shendure J, Berkovic SF, Scheffer IE, Mefford HC. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet*. 2013 Jul;45(7):825-30. doi: 10.1038/ng.2646.

Caterino M, Pastore A, Strozzi MG, Di Giovamberardino G, Imperlini E, Scolamiero E, Ingenito L, Boenzi S, Ceravolo F, Martinelli D, Dionisi-Vici C, Ruoppolo M. The proteome of cblC defect: in vivo elucidation of altered

cellular pathways in humans. *J Inherit Metab Dis.* 2015 Sep;38(5):969-79. doi: 10.1007/s10545-014-9806-4. Epub 2015 Jan 14.

Choi JC, Wu W, Muchir A, Iwata S, Homma S, Worman HJ. Dual specificity phosphatase 4 mediates cardiomyopathy caused by lamin A/C (LMNA) gene mutation. *J Biol Chem.* 2012 Nov 23;287(48):40513-24. doi: 10.1074/jbc.M112.404541.

Clark TG, Conway SJ, Scott IC, Labosky PA, Winnier G, Bundy J, Hogan BL, Greenspan DS. The mammalian Tolloid-like 1 gene, *Tll1*, is necessary for normal septation and positioning of the heart. *Development.* 1999 Jun;126(12):2631-42.

Communal C, Colucci WS, Remondino A, Sawyer DB, Port JD, Wichman SE, Bristow MR, Singh K. Reciprocal modulation of mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and 2 in failing human myocardium. *J Card Fail.* 2002 Apr;8(2):86-92.

D'Erchia AM, Gallo A, Manzari C, Raho S, Horner DS, Chiara M, Valletti A, Aiello I, Mastropasqua F, Ciaccia L, Locatelli F, Pisani F, Nicchia GP, Svelto M, Pesole G, Picardi E. Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS. *Sci Rep.* 2017 Aug 30;7(1):10046. doi: 10.1038/s41598-017-10488-7.

Dredge BK, Polydorides AD, Darnell RB. The splice of life: alternative splicing and neurological disease. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jan;2(1):43-50.

Fischer S, Huemer M, Baumgartner M, Deodato F, Ballhausen D, Boneh A, Burlina AB, Cerone R, Garcia P, Gökçay G, Grünewald S, Häberle J, Jaeken J, Ketteridge D, Lindner M, Mandel H, Martinelli D, Martins EG, Schwab KO, Gruenert SC, Schwahn BC, Sztriha L, Tomaske M, Trefz F, Vilarinho L, Rosenblatt DS, Fowler B, Dionisi-Vici C. Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the *cb1C* defect. *J Inherit Metab Dis.* 2014 Sep;37(5):831-40. doi: 10.1007/s10545-014-9687-6.

Fofou-Caillierez MB, Mrabet NT, Chéry C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, Paoli J, Alberto JM, Coelho D, Camadro JM, Feillet F, Watkins D, Fowler B, Rosenblatt DS, Guéant JL. Interaction between methionine synthase

isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Hum Mol Genet.* 2013 Nov 15;22(22):4591-601. doi: 10.1093/hmg/ddt308.

Ghemrawi R, Arnold C, Battaglia-Hsu SF, Pourié G, Trinh I, Bassila C, Charif R, Wiedemann W, Flayac J, Robert A, Dreumont N, Feillet F, Guéant JL, Coelho D. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metabolism.* 2019 (accepted)

Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu SF. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* 2013 Mar 21;4:e553. doi: 10.1038/cddis.2013.69.

Guéant JL, Namour F, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab.* 2013 Jun;24(6):279-89. doi: 10.1016/j.tem.2013.01.010.

Hannibal L, DiBello PM, Yu M, Miller A, Wang S, Willard B, Rosenblatt DS, Jacobsen DW. The MMACHC proteome: hallmarks of functional cobalamin deficiency in humans. *Mol Genet Metab.* 2011 Jul;103(3):226-39. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.03.008. Epub 2011 Mar 24.

Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000 Jan 14;45(2):273-8.

Huemer M, Bürer C, Ješina P, Kožich V, Landolt MA, Suormala T, Fowler B, Augoustides-Savvopoulou P, Blair E, Brennerova K, Broomfield A, De Meirleir L, Gökçay G, Hennermann J, Jardine P, Koch J, Lorenzl S, Lotz-Havla AS, Noss J, Parini R, Peters H, Plecko B, Ramos FJ, Schlune A, Tsiakas K, Zerjav Tansek M, Baumgartner MR. Clinical onset and course, response to treatment and outcome in 24 patients with the cblE or cblG remethylation defect complemented by genetic and in vitro enzyme study data. *J Inherit Metab Dis.* 2015 Sep;38(5):957-67. doi: 10.1007/s10545-014-9803-7.

Kamdar F, Garry DJ. Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016 May 31;67(21):2533-46. doi: 10.1016/j.jacc.2016.02.081.

Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015 Apr;12(4):357-60. doi: 10.1038/nmeth.3317. Epub 2015 Mar 9.

Law C, Paquet M, Kania A. Emergence of motor circuit activity. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4):e93836. doi: 10.1371/journal.pone.0093836.

Ma X, Adelstein RS. A point mutation in Myh10 causes major defects in heart development and body wall closure *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Jun;7(3):257-65. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000455.

Miwa JM, Stevens TR, King SL, Caldarone BJ, Ibanez-Tallon I, Xiao C, Fitzsimonds RM, Pavlides C, Lester HA, Picciotto MR, Heintz N. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron*. 2006 Sep 7;51(5):587-600.

Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK. Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science*. 2010 Nov 26;330(6008):1238-40. doi: 10.1126/science.1195320.

Murai KK, Pasquale EB. Eph receptors, ephrins, and synaptic function. *Neuroscientist*. 2004 Aug;10(4):304-14.

Osenberg S, Karten A, Sun J, Li J, Charkowick S, Felice CA, Kritzer M, Nguyen MVC, Yu P, Ballas N. Activity-dependent aberrations in gene expression and alternative splicing in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 5;115(23):E5363-E5372. doi: 10.1073/pnas.1722546115. Epub 2018 May 16.

Parikhshak NN, Swarup V, Belgard TG, Irimia M, Ramaswami G, Gandal MJ, Hartl C, Leppa V, Ubieta LT, Huang J, Lowe JK, Blencowe BJ, Horvath S, Geschwind DH. Genome-wide changes in lncRNA, splicing, and regional gene expression patterns in autism. *Nature*. 2016 Dec 15;540(7633):423-427. doi: 10.1038/nature20612.

Pak W, Hindges R, Lim YS, Pfaff SL, O'Leary DD. Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell*. 2004 Nov 12;119(4):567-78.

Pashmforoush M, Pomiès P, Peterson KL, Kubalak S, Ross J Jr, Hefti A, Aebi U, Beckerle MC, Chien KR. Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat Med.* 2001 May;7(5):591-7.

Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol.* 2015 Mar;33(3):290-5. doi: 10.1038/nbt.3122. Epub 2015 Feb 18.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature.* 2004 Jun 17;429(6993):771-6. Epub 2004 Jun 2.

Prudencio M, Belzil VV, Batra R, Ross CA, Gendron TF, Pregent LJ, Murray ME, Overstreet KK, Piazza-Johnston AE, Desaro P, Bieniek KF, DeTure M, Lee WC, Biendarra SM, Davis MD, Baker MC, Perkerson RB, van Blitterswijk M, Stetler CT, Rademakers R, Link CD, Dickson DW, Boylan KB, Li H, Petrucelli L. Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat Neurosci.* 2015 Aug;18(8):1175-82. doi: 10.1038/nn.4065.

Quintana AM, Yu HC, Brebner A, Pupavac M, Geiger EA, Watson A, Castro VL, Cheung W, Chen SH, Watkins D, Pastinen T, Skovby F, Appel B, Rosenblatt DS, Shaikh TH. Mutations in THAP11 cause an inborn error of cobalamin metabolism and developmental abnormalities. *Hum Mol Genet.* 2017 Aug 1;26(15):2838-2849. doi: 10.1093/hmg/ddx157.

Richard E, Monteoliva L, Juarez S, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M, Albar JP. Quantitative analysis of mitochondrial protein expression in methylmalonic acidemia by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res.* 2006 Jul;5(7):1602-10.

Ridge LA, Mitchell K, Al-Anbaki A, Shaikh Qureshi WM, Stephen LA, Tenin G, Lu Y, Lupu IE, Clowes C, Robertson A, Barnes E, Wright JA, Keavney B, Ehler E, Lovell SC, Kadler KE, Hentges KE. Non-muscle myosin IIB (Myh10) is required for epicardial function and coronary vessel formation during mammalian development. *PLoS Genet.* 2017 Oct 30;13(10):e1007068. doi: 10.1371/journal.pgen.1007068.

Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11(3):R25. doi: 10.1186/gb-2010-11-3-r25. Epub 2010 Mar 2.

Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1):19-32. doi: 10.1038/nrg.2015.3. Epub 2015 Nov 23.

Shen S, Park JW, Lu ZX, Lin L, Henry MD, Wu YN, Zhou Q, Xing Y. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 23;111(51):E5593-601. doi: 10.1073/pnas.1419161111.

Son NH, Park TS, Yamashita H, Yokoyama M, Huggins LA, Okajima K, Homma S, Szabolcs MJ, Huang LS, Goldberg IJ. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest.* 2007 Oct;117(10):2791-801.

Stańczak P, Witecka J, Szydło A, Gutmajster E, Lisik M, Auguściak-Duma A, Tarnowski M, Czekaj T, Czekaj H, Sieroń AL. Mutations in mammalian tolloid-like 1 gene detected in adult patients with ASD. *Eur J Hum Genet.* 2009 Mar;17(3):344-51. doi: 10.1038/ejhg.2008.175.

Su Y, Deng MF, Xiong W, Xie AJ, Guo J, Liang ZH, Hu B, Chen JG, Zhu X6 Man HY, Lu Y, Liu D, Tang B, Zhu LQ. MicroRNA-26a/Death-Associated Protein Kinase 1 Signaling Induces Synucleinopathy and Dopaminergic Neuron Degeneration in Parkinson's Disease. *Biol Psychiatry.* 2019 May 1;85(9):769-781. doi: 10.1016/j.biopsych.2018.12.008.

Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA, van Bon BW, Shen Y, Repnikova EA, Gastier-Foster J, Thrush DL, Kathiresan S, Ruderfer DM, Chiang C, Hanscom C, Ernst C, Lindgren AM, Morton CC, An Y, Astbury C, Brueton LA, Lichtenbelt KD, Ades LC, Fichera M, Romano C, Innis JW, Williams CA, Bartholomew D, Van Allen MI, Parikh A, Zhang L, Wu BL, Pyatt RE, Schwartz S, Shaffer LG, de Vries BB, Gusella JF, Elsea SH. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2011 Oct 7;89(4):551-63. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.09.011.

Thaler JP, Koo SJ, Kania A, Lettieri K, Andrews S, Cox C, Jessell TM, Pfaff SL. A postmitotic role for Isl-class LIM homeodomain proteins in the assignment of visceral spinal motor neuron identity. *Neuron*. 2004 Feb 5;41(3):337-50.

You MH, Kim BM, Chen CH, Begley MJ, Cantley LC, Lee TH. Death-associated protein kinase 1 phosphorylates NDRG2 and induces neuronal cell death. *Cell Death Differ*. 2017 Feb;24(2):238-250. doi: 10.1038/cdd.2016.114.

Annexe 7: Article scientifique N°2

SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders

Rose Ghemrawi ^a, Carole Arnold ^a, Shyue-Fang Battaglia-Hsu ^a, Grégory Pourié ^a, Isabelle Trinh ^a, Christine Bassila ^a, **Rashka Charif** ^a, Arnaud Wiedemann ^{a,b}, Justine Flayac ^a, Aurélie Robert ^a, Natacha Dreumont ^a, François Feillet ^{a,b}, Jean-Louis Guéant ^{a,b,1}, David Coelho ^{a,b,1,*}

^a Université de Lorraine, Inserm, UMRS 1256, NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure, F-54000 Nancy, France.

^b Université de Lorraine, CHRU-Nancy, National Center of Inborn Errors of Metabolism, F-54000 Nancy, France.

* *Correspondance to* : David Coelho, Inserm-UL U1256 – NGERE, Faculté de Médecine, Bâtiment C 2ème étage, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP50184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Telephone : +33 (0)3 72 74 61 50 ; E-mail: david.coelho@inserm.fr

E-mail addresses: rose.ghemrawi@hotmail.com (R.Ghemrawi), carole.arnold@inserm.fr (C.Arnold), shyue-fang.battaglia@univ-lorraine.fr (SF Battaglia-Hsu), gregory.pourie@univ-lorraine.fr (G. Pourié), isabelle.trinh6@etu.univ-lorraine.fr (I. Trinh), christine_bassila@hotmail.com (C. Bassila), charif.rashka@univ-lorraine.fr (R.Charif), arnaud.wiedemann@gmail.com (A. Wiedemann), justine.flayac@univ-lorraine.fr (J. Flayac), aurelie.robert@univ-lorraine.fr (A. Robert), natacha.dreumont@univ-lorraine.fr (N. Dreumont), f.feillet@chru-nancy.fr (F. Feillet), jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr (JL Guéant).

¹ The last two authors contributed equally to this work.

Abstract

Background: The molecular consequences of inborn errors of vitamin B12 or cobalamin metabolism are far from being understood. Moreover, innovative therapeutic strategies are needed for the treatment of neurological outcomes that are usually resistant to conventional treatments. Our previous findings suggest a link between SIRT1, cellular stress and RNA binding proteins (RBP) mislocalization in the pathological mechanisms triggered by impaired vitamin B12 metabolism.

Objectives and Methods: The goal of this study was to investigate the effects of the pharmacological activation of SIRT1 using SRT1720 on the molecular mechanisms triggered by impaired methionine synthase activity. Experiments were performed in vitro with fibroblasts from patients with the *cblG* and *cblC* inherited defects of vitamin B12 metabolism and in vivo with an original transgenic mouse model of methionine synthase deficiency specific to neuronal cells. Subcellular localization of the RBPs HuR, HnRNPA1, RBM10, SRSF1 and Y14 was investigated by immunostaining and confocal microscopy in patient fibroblasts. RBPs methylation and phosphorylation were studied by co-immunoprecipitation and proximity ligation assay. Cognitive performance of the transgenic mice treated with SRT1720 was measured with an aquatic maze.

Results: Patient fibroblasts with *cblC* and *cblG* defects of vitamin B12 metabolism presented with endoplasmic reticulum stress, altered methylation, phosphorylation and subcellular localization of HuR, HnRNPA1 and RBM10, global mRNA mislocalization and increased HnRNPA1-dependent skipping of IRF3 exons. Incubation of fibroblasts with cobalamin, S-adenosyl methionine and okadaic acid rescued the localization of the RBPs and mRNA. The SIRT1 activating compound SRT1720 inhibited ER stress and rescued RBP and mRNA mislocalization and IRF3 splicing. Treatment with this SIRT1 agonist prevented all these

hallmarks in patient fibroblasts but it also improved the deficient hippocampo-dependent learning ability of methionine synthase conditional knock-out mice.

Conclusions: By unraveling the molecular mechanisms triggered by inborn errors of cbl metabolism associating ER stress, RBP mislocalization and mRNA trafficking, our study opens novel therapeutic perspectives for the treatment of inborn errors of vitamin B12 metabolism.

Keywords: vitamin B12, inherited defect, RNA binding protein, SIRT1, SIRT1720, cognitive defect

1. Introduction

In man, vitamin B12 or cobalamin (cbl) is essential for normal development and survival. The two cbl coenzymes adenosylcobalamin (AdoCbl) and methylcobalamin (MeCbl) serve as cofactor for two enzymes, methylmalonyl-CoA mutase (MUT, E.C. 5.4.99.2) and methionine synthase (MS, 5-methyl- tetrahydrofolate: L-homocysteine S-methyltransferase; E.C. 2.1.1.13, encoded by MTR), respectively [1]. Most inborn error of cellular cbl metabolism decrease MS activity and lead to hyperhomocysteinemia and homocystinuria (Supplementary Fig. 1). These inherited defects are classified as complementation groups named cblC-G and cblJ by fibroblast phenotyping. They include 7 genes, which respectively encode proteins for cellular uptake and transport, including two lysosomal membrane proteins, LMBD1 (cblF) and ABCD4 (cblJ), two cytoplasmic transporters/enzymes, MMACHC (cblC) and MMADHC (cblD) and the two target enzymes of MeCbl, methionine synthase (MS) (cblG) and methionine synthase reductase (MSR, encoded by MTRR, cblE group) [2, 3].

CblC is the most common complementation group of inborn errors of intracellular cbl metabolism (MIM# 277400). It results from mutations in the MMACHC gene, which codes for a cytosolic enzyme responsible for the decyanation and the dealkylation of cyanocobalamin and alkylcobalamins, respectively. Most cblC patients present with hematologic and neurological pathologies and some of them with optic atrophy or pigmentary retinopathy [4, 5]. Patients with cblG defect (MIM# 250940) carry mutations in the MTR gene, which encodes MS. They usually present with hypotonia, megaloblastic anemia, developmental delay, and brain atrophy [6]. A subgroup named cblG-variant, noted cblG* is defined by undetectable MS activity in fibroblasts [7].

The molecular mechanisms underlying the pathophysiology of these genetic defects are far from being completely understood. They are supposed to result from the acculation

of methylmalonic acid and/or homocysteine and the decreased synthesis of methionine, which is the immediate metabolic precursor of S-adenosyl methionine (SAM), the universal methyl donor involved in many essential biochemical processes. Indeed, SAM-dependent methylation of DNA, RNA and proteins such as histones is crucial for epigenomic mechanisms of gene expression and for other acceptor molecules such as neurotransmitters, and membrane phospholipids. However, recent studies have highlighted the role of oxidative stress and the subsequent activation of apoptosis in *cblA*, *cblB*, *cblD*-variant 1 and *cblC* (8), in *cblG* and *cblE* (9), and in *cblC* and *cblB* defects (10). We previously demonstrated that impaired cellular availability of vitamin B12 alters cell proliferation and differentiation [11] and triggers endoplasmic reticulum (ER) stress in murine neuroblastoma N1E115 cells [12]. Impaired *cbl* metabolism is also associated with disturbances of mRNA nucleocytoplasmic transport related to the subcellular mislocalization of several RNA binding proteins (RBP), including the ELAVL1/HuR stress protein in N1E115 cells [13]. The abnormal HuR subcellular localization is also found in the Cd320 knock-out mouse model, in which the cellular uptake of *cbl* is impaired [13].

The overall aim of our study was to evaluate the molecular mechanisms that could explain the origin of the high variability in clinical presentation and poor response to conventional therapy of inborn errors of *cbl* metabolism. We found that *cblC*, *cblG* and *cblG** defects produce a SIRT-dependent ER stress that leads to altered shuttling and splicing of mRNA through the subcellular mislocalization of stress-sensitive RBP, including ELAVL1/HuR, HnRNPA1 and RBM10. Our study opens perspectives for the use of SIRT1 agonists as a novel therapeutic strategy to treat the cases of inborn errors of *cbl* metabolism with poor response to conventional therapy.

2. Material and Methods

2.1. Cell culture

Patient fibroblasts were provided by D.R. Rosenblatt (McGill University Canada; *cblG*2*), M.R. Baumgartner (University Hospital of Zürich, Switzerland; *cblC2*, *cblC3*, *cblG*1*) and the CHRU Hospital of Nancy, France (*cblC1*, *cblG1*, *cblG2*). The description of cell lines used is presented in Supplementary Table 1. Fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and supplemented with antibiotics. All cells have been used with a similar number of passages, between 10 and 20. Hydroxycobalamin, SAM, okadaic acid, G418, thapsigargin (TG) and Adox were purchased from Sigma (Lyon, France) and SRT1720 from Euromedex (Strasbourg,

France) [15]. Cells were treated with hydroxycobalamin (20 μ M) or SAM (75 μ M) for 5–7 days. TG, Adox and SRT1720 treatments were done for 3 days at 1 μ M. Okadaic acid treatment was applied for 3 days at 10 nM.

2.2. Western blot

Western blot experiments were performed as described [13]. ATF6 (Santa Cruz), HuR (Millipore), HnRNPA1 (Santa Cruz), SRSF1 (James Stevenin, IGBMC, Strasbourg), Y14 and RBM10 (Novus Biologicals). Appropriate secondary antibodies conjugated to HRP were used for detection with Clarity Western ECL Substrate (BioRad).

2.3. Immunoprecipitation

Immunoprecipitation experiments were performed as described [13] with Phospho-Serine (Millipore) and Methyl-Arginine (Abcam) antibodies.

2.4. Immunofluorescence

Fibroblasts were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with PBS- 0.1% Triton, blocked with 5% BSA, and incubated with primary antibodies: HuR (Millipore), HnRNPA1 (Santa Cruz), SRSF1 (James Stevenin, IGBMC, Strasbourg), Y14 and RBM10 (Novus Biologicals) for 100 min at room temperature and with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Detection of the nucleus was done with 4, 6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma). Cells were imaged using Nikon C2 confocal microscope with 60x oil immersion lens.

2.5. Duolink Proximity ligation assay

The proximity ligation assay (Duolink in situ PLA; Eurogentec, Angers, France) was performed to visualize and quantify interactions. Cells were fixed with paraformaldehyde 4%, blocked with BSA 5% for 1 h and incubated with primary antibodies against HuR, HnRNPA1, Phospho-Serine or Methyl-Arginine overnight at 4°C. A pair of oligonucleotide-labelled secondary antibodies was used according to the manufacturer's instructions. Each dot

corresponds to a close interaction. The signals were counted and assigned to a specific subcellular location based on microscopy images by using the Blob-Finder/MatLab freeware.

2.6. FISH

Fibroblasts were fixed with paraformaldehyde (15 min, 4 °C) and permeabilized with PBS-0.1 % triton for 20 min. A prehybridization was performed for 30 min at room temperature in a buffer containing 1.2 mL formamide 40 %, 300 μ L SSC20X, 4.5 μ L BSA 10 mg/mL, 18 μ L yeast tRNA 10 μ g/ μ L and 1.2 mL H₂O. This was followed by hybridization (90 min at 42°C) with FISH probes (Eurogentec) diluted to 0.2 μ M in the buffer. The sequence of the polyA tail was oligo (dT) 70 modified in 5' with alexa fluor 546. Detection of the nucleus was done with 4, 6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma). Cells were imaged using Nikon C2 with x60 oil immersion lens.

2.7. Splicing analysis

Total RNA was isolated from cultured cells using the RNeasy Plus Mini extraction kit (Qiagen) followed by a reverse transcription (Reverse Transcription kit, Qiagen). PCR was performed in 35 cycles; annealing temperature was 57°C. The IRF3 primers used were as follows: Forward: 5'-AGCCTCGAGTTTGAGAGCTACC-3'; Reverse: 5'-GGTATCAGAAGTACTGCCTCCAC-3'. PCR products were 500 bp (Full-length IRF3; 4 exons), 327 bp (Splicing variant type I: only exon 2 exclusion) and 155 bp (Splicing variant type II: both exon 2 and exon 3 exclusion) [14].

2.8. Generation of conditional Mtr-KO mice

The Mtr-KO mouse model was generated in collaboration with the Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France). We used the vector #CSD 69523 obtained from European Conditional Mouse Mutagenesis program, which is based on the 'Knock-out First' strategy. This vector contains two loxP sites flanking exons 4 and 5 of the Mtr gene. The vector was electroporated in C57Bl/6 embryonic stem cells. Targeted cells were screened by PCR, confirmed by Southern blot analysis and injected into blastocysts derived from mouse strain C57Bl/6 to generate chimeras, which were mated to test their ability to transmit the transgene to their progeny. Selected chimeras were used to create the Mtr-KO mouse line, which was maintained on a C57Bl/6 background. This line was crossed with a Thy1-Cre line (Stock number 6143, FVB/N-Tg (Thy1-cre)1Vln/J, Jackson Institute, USA) to induce Mtr deletion in

the central nervous system. Genotyping by PCR was performed on DNA extracted from tail samples, using specific primers and internal PCR controls.

2.9. RT-qPCR

Total RNA from cortex and hippocampus samples were purified by phenol–chloroform extraction. Reverse transcription was done using the PrimeScript RT Takara System (Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France) according to manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed with SYBR Premix Ex Taq Tli RNaseH Plus system (Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France) with Mtr primers (Forward ACACTTGGCCTACCGGATG and Reverse CCAGCCACAAACCTCTTGAC) and Polymerase II primers (Forward AGCAAGCGGTTCCAGAGAAG and Reverse TCCCGAACACTGACATATCTCA).

2.10. Immunofluorescent labelling of mouse samples

Mouse brain hemispheres were fixed by Carnoy's solution, dehydrated and imbedded in paraffin by Leica ASP300-S Dewaxed (Histo Clear; National Diagnostics, HS-200). Sagittal brain sections were rehydrated using standard protocol and incubated at 95°C for 30 minutes in a sodium EDTA solution for antigen retrieval. Brain slices were blocked at 4°C overnight with PBS-Triton 0,1% - BSA 10% (SIRT1) or PBS-Triton 0,1% - Horse Serum 5% - BSA 10% (HuR). They were incubated overnight in a humid chamber at 4°C with primary antibodies: SIRT1 (1/50, Sc-15404, Santa Cruz, Dallas, USA) and HuR (1/200, 07-468, Merck, Darmstadt, Germany), washed in BSA/PBS-Triton and incubated with secondary antibody coupled to Alexa Fluor (Ab150065, Abcam, Cambridge, United Kingdom) for 1 h at room temperature. Detection of the nucleus was done with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma). Slides were washed in PBS and mounted using a minimal volume of medium (DAKO). Images were acquired with a Nikon C2 confocal microscope with 60x oil immersion lens. All regions of interest were imaged in the brain section. Densitometric analysis of images was performed with ImageJ 1.49v (NIH, USA). Nuclei were counted and fluorescence was measured.

2.11. Behavioral test and pharmacological procedure

The water maze consisted of a square pool filled with water (5 cm deep, 25°C) divided by grey plastic walls to delimit 25 zones. Open doors allow communications between zones designing an ideal route from a starting zone to an exit with additional lateral error-zones. Each mouse was allowed to run the maze twice a day during 4 consecutive days (sessions S1 to S4 with a cut-off time of 2 min). Parameters were recorded using a video-tracking system

(Viewpoint, France). The time required to escape from the maze was named "escape latency". Adult males and females were used and were 12 months of age. A group of 6 mice was treated with SRT1720 (50 mg/kg in 0,5 ml dimethylsulfoxyde, 4,5 ml polyethylene glycol 400 40% in distilled water) every two days by oral administration during 2 weeks. Maze sessions occurred during the last week of treatment. As control, some mice received a corresponding vehicle dose (200 µl). Treated animals received seven doses during the whole protocol and six doses before the beginning of the behavioral test. For a better clarity in the figure, the results of the vehicle groups were fused with their corresponding genetic groups, since the vehicle did not lead to any variation to wild-type or MTR^{-/-} mice. All animal experiments were approved by the ethical committee for animal experiments of the Region Lorraine (Agreement #12851-2017122215366738).

2.12. Statistics

Results were expressed as means + standard error of the mean. Comparison between cell phenotypes was performed by one-way ANOVA. For behavioral data, a two-ways ANOVA was applied according the different groups and treatments, followed by a Fischer's exact post-hoc analysis to obtain putative significances between groups (p values).

3. Results

3.1. Cellular stress of cbIC and cbIG fibroblasts leads to cytoplasmic localization of HuR

Treatment of control fibroblasts with the G418 antibiotic led to the translocation of HuR from nucleus to cytoplasm. In contrast, in cbIG patient fibroblasts, HuR was detected in both compartments and G418 produces no translocation. We confirmed that HuR localization resulted from a cellular stress by incubating control fibroblasts with the ER-stress inducer thapsigargin (Fig. 1A). Thapsigargin induced a cytoplasmic localization of HuR with a progressive shift that was already visible following 12h of treatment, culminating with almost a complete lack of nuclear localization after 48h.

3.2. cbIC and cbIG defects lead to SIRT1-mediated endoplasmic reticulum stress

Our data show a strong increase of ATF6 activation, a typical mechanism of ER stress in cbIC and in cbIG* fibroblasts, compared to control cells. Since ER stress could trigger HuR relocalization, we hypothesized that the partial cytoplasmic localization of HuR in cbIG cells could be prevented by SIRT1 activation. Thus, we quantified the cleavage of ATF6 in patient cells following incubation with cbl and the SIRT1 agonist SRT1720 (Fig. 1B). Both treatments

with either Cbl or SRT1720 reduced the amount of ATF6 cleavage in cblC cells but only SRT1720 was effective in cblG* fibroblasts.

3.3. Inborn errors of cbl metabolism produce a mislocalization of RBPs related to cell stress

In addition to HuR, we further investigated the subcellular localization of HnRNPA1, SRSF1 and Y14 in fibroblasts from three cblC (C1, C2, C3) and four cblG patients (G1, G2, G*1, G*2) compared to one control cell line. HuR, HnRNPA1 and SRSF1 were selected for their roles in the cellular stress response while RBM10 and Y14 are not known to be involved in this pathway. Our results confirm the nuclear localization of HuR in control cells and show that HuR subcellular distribution is dramatically modified in all tested patient fibroblasts (Fig. 2, Supplementary Fig. 2). Interestingly, the shift towards a cytoplasmic localization is variable according to the patient cells with a complete absence of HuR in the nuclei, in fibroblasts from the cblG variant case. Our results also show the loss of nuclear localization for HnRNPA1 and RBM10 in all the tested fibroblasts (Fig. 2, Supplementary Fig. 2). In contrast, the subcellular localization of SRSF1 and Y14 was unaffected in the seven patient cells examined.

3.4. Mislocalization of HuR, HnRNPA1 and RBM10 is rescued by vitamin B12, SAM and SRT1720 treatments

In order to confirm that the mislocalization of HuR, HnRNPA1 and RBM10 was the consequence of cellular stress induced by impaired cbl metabolism, we examined their subcellular localization in cells incubated with either SRT1720, vitamin B12 or S-adenosyl methionine (SAM). We found that the pharmacological activation of SIRT1 by SRT1720, vitamin B12 and SAM restored the nuclear localization of HuR, HnRNPA1 and RBM10 in all tested patient fibroblasts (Fig. 3, Supplementary Fig. 3). The effect of SAM suggested that the effect of altered B12 metabolism on RBPs subcellular localization was due to a mechanism related to impaired SAM-dependent methylation.

3.5. Inhibition of methylation does not lead to nucleocytoplasmic translocation of HuR, HnRNPA1 and RBM10

In order to investigate specifically the effect of RBPs methylation status on their subcellular localization, we treated the fibroblasts with the inhibitor of methyltransferase, adenosine dialdehyde (Adox). As expected, this treatment decreased the methylation of HuR, HnRNPA1 and RBM10 in wild type cells (Fig. 3, Supplementary Fig. 3). However, the treatment of wild-type cells with Adox did not produce any cytoplasmic localization of HuR,

suggesting that its nucleocytoplasmic translocation does not result from its altered methylation (Fig. 3). In contrast, in Adox-treated patient cells, HuR remained in the nuclei (Fig. 3), indicating that methylation is necessary for the nucleocytoplasmic transport of HuR.

3.6. Nuclear localization of HuR, HnRNPA1 and RBM10 is restored by the PP2A inhibitor okadaic acid

We previously reported that impaired cbl metabolism resulted in increased protein phosphatase PP2A expression and that the treatment of patient cells with the PP2A inhibitor okadaic acid (OA) restored the phosphorylation of HuR [11, 13]. Thus, we investigated the role of HuR phosphorylation on its subcellular localization by treating patient cells with OA. The treatment increased HuR phosphorylation and restored the nuclear staining of HuR in cblC patient fibroblasts, showing that impaired phosphorylation is a pathological mechanism involved in the RBPs mislocalization (Fig. 3).

3.7. Decreased methylation and phosphorylation of HuR, HnRNPA1 and RBM10 is reversed by B12, SAM and SRT1720 treatments

We examined the methylation and the phosphorylation of all the mislocalized RBPs in patient cells by co-immunoprecipitation with anti-methyl-arginine and anti-phospho-serine antibodies. Our results show a strong decrease of both methylated and phosphorylated forms of HuR, HnRNPA1 and RBM10 in cblC, cblG and cblG* fibroblasts (Fig. 4A, Supplementary Fig. 4A). These data showed that the post-translational modifications of RBPs were associated to the altered nucleocytoplasmic shuttling of RBPs in inborn errors of cbl metabolism.

To confirm the role of cbl impaired metabolism on the methylation of RBP, we examined the effect of either vitamin B12 or SAM on the methylation and the phosphorylation of HuR, HnRNPA1 and RBM10 in control cells and cblC, cblG and cblG* fibroblasts. The incubation of patient fibroblasts with either vitamin B12 or SAM was able to restore the methylation and phosphorylation of the 3 RBPs (Fig. 4B, Supplementary Fig. 4B). Interestingly, the activation of SIRT1 by SRT1720 treatment was also partially effective in the rescue of these post-translational modifications.

3.8. Impaired RBPs function in cblC, cblG and cblG* patients is restored by adding B12, SAM or SRT1720

Since the mislocalization of RBPs could affect their functions, we investigated the localization of mRNA by performing FISH staining of poly-A mRNA. Our results showed a

predominant nuclear localization of mRNA in control fibroblasts and a mixed perinuclear and cytoplasmic localization in patient cells (Fig. 5A). Moreover, the treatment of patient fibroblasts with SRT1720, B12 and SAM restored the nuclear localization of poly-A mRNAs (Fig. 5A, Supplementary Fig. 5).

In addition to the consequences on mRNA shuttling, it may be expected that the mislocalization of RBP may alter the proper splicing of the target mRNAs. For example, knock-down of HnRNPA1 increases the skipping of exons 2 (type I) and 3 (type 3) of Interferon Regulatory Factor-3 (IRF3) pre-mRNA [14]. We therefore studied the splicing of IRF3 as an example of the consequences of RBPs mislocalization in patient fibroblasts. RT-PCR amplification of IRF3 generated three different products, a full-length product of 500 bp (FL) containing the exons 1 to 4, a first splicing type I variant of 327 bp with exclusion of exon 2 and a type II variant of 155 bp with exclusion of exon 2 and exon 3 (Fig. 5B). As expected, in wild type cells, IRF3 RT-PCR generated almost only the FL isoform while a decrease of the ratio FL/(FL+I+II) was observed in cblG and cblG* fibroblasts. Interestingly, this ratio was corrected following incubation of cblG and cblG* cells with SRT1720 (Fig. 5B) B12 vitamin and SAM (Supplementary Fig. 5).

3.9. SIRT1 expression and HuR subcellular localization are altered in the mouse model of methionine synthase deficiency in the brain

Using a cellular model with impaired cbl availability, we previously demonstrated that the altered nucleo-cytoplasmic shuttling of RBP leads to SIRT1-dependent dramatic transcriptomic changes affecting neurogenesis, neuron differentiation, and neuroplasticity [13]. Therefore, we further investigated the effect of SIRT1 pharmacological activation on the altered neuroplasticity resulting from impaired vitamin B12 metabolism in an original transgenic mouse model of methionine synthase deficiency specific to neuronal cells (Fig. 6A). The efficiency of our construct was validated by the analysis of Mtr expression by RT-qPCR that revealed a significant decrease of Mtr mRNA levels in the cortex and the hippocampus of homozygous Mtr KO mice (Fig. 6B). Western blot analysis of MTR in 72 mice revealed that 30% of the animals did not present a significative decrease of the protein while 54% of them expressed less than 10% of the protein compared to controls (data not shown). Immunohistochemical analysis of different regions of the brain indicated that SIRT1 expression was significantly decreased in the CA1 subfield of the hippocampus but not in the dentate gyrus, CA2, CA3, cortex and cerebellum (Fig. 6C). In order to evaluate the effect of the SIRT1-

activating compound, a group of mice was treated with 50 mg/kg of SRT1720 every two days by oral administration during 2 weeks. Our results indicated that this treatment was able to restore the level of SIRT1 in the CA1 region (Fig. 6C, 6D). Then, we evaluated the activation of SIRT1 by SRT1720 on cellular stress and RBP mislocalization by analyzing the subcellular distribution of HuR. We showed a decreased nuclear localization of HuR in Mtr KO mice compared to wild type mice. This result is consistent with an impaired nucleocytoplasmic translocation of HuR in response to cellular stress. This hallmark was partly rescued in the brain from Mtr KO mice treated with SRT1720 (Fig. 6E).

3.10. Pharmacological activation of SIRT1 improves the cognitive defects of the brain-Mtr KO mice

The learning performance of control and Mtr KO mice was evaluated using a water maze in which the animals were evaluated twice a day during four consecutive days (Fig. 7A). The results, expressed as the time required to exit the maze, show that control mice achieved efficient cognitive performance since they present a shorter escape latency from session 2 to session 4 (Fig. 7B). On the other hand, Mtr KO mice showed poor cognitive performance even in session S4 ($P < 0.003$). The treatment of Mtr KO mice with the SIRT agonist reduced dramatically the cognitive deficit from session 3 ($P < 0.003$). The cumulative traces of the video-tracking recording confirmed the phenotype of the Mtr KO and the effect of SRT1720 on their cognitive performance (Fig. 7A).

4. Discussion

The ER stress of fibroblasts from patients with inborn errors of cbl cellular metabolism was evidenced by activation of the ATF6 pathway. This was consistent with previous results obtained in N1E115 TO cells [13]. ER stress may be triggered by the oxidative stress that results from the increased ROS production [16]. The accumulation of homocysteine produced by cbl deficiency could also lead to increased homocysteinylation of proteins. This protein adduct mechanism increases protein aggregation and ER stress [17]. Moreover, we found previously that the cbl impaired cellular availability in N1E115 TO cell induces ER stress by greater acetylation of HSF1 through decreased SIRT1 expression, whereas adding vitamin B12

produces protective effects. The increased acetylation of HSF1 leads to critical reduction of the expression of molecular chaperones that modulate ER stress [18].

Our data showed that inborn errors of cbl metabolism could trigger the cytoplasmic accumulation of RBP associated with ER stress. HuR and HnRNPA1 are two RBP involved in the response to cell stress. HuR is ubiquitously expressed and it is involved in various biological processes such as proliferation and stress response, and in mRNA metabolism processes that include splicing, polyadenylation, translation and miRNA repression [19]. The HnRNPA1 protein belongs to the splicing regulator (SR) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) classes that is predominantly located in the nucleus. While it was initially known for its contribution to mRNA splicing regulation, HnRNPA1 also acts as trans-acting factor involved in translation initiation of specific mRNAs through its binding to internal ribosome entry sites (IRES) following stress stimuli [20, 21]. Interestingly, the function of HnRNPA1 proteins on regulating alternative splicing by the use of alternative 5' splice sites is balanced by the relative amount of SRSF1 [22]. The SRSF1 protein, also called ASF/SF2, is a member of the SR proteins involved in the regulation of general and alternative splicing, nonsense-mediated mRNA decay and mRNA export [23]. It has been demonstrated that stress stimuli result in cytoplasmic accumulation of HnRNPA1 in contrast to SRSF1 [24]. This finding is consistent with our data showing no difference in subcellular localization of SRSF1 between patient fibroblasts and control cells and supports the idea that the mislocalization of HnRNPA1 could have functional consequences. We observed also a mislocalization of RBM10 in all patient cells. In contrast to HuR and HnRNPA1, RBM10 is not a cellular stress RBP. It is a member of the RNA-binding motif (RBM) gene family, which contains several functional domains involved in RNA or protein binding interactions, including with components of pre-spliceosomal A and B complexes [25]. Several studies have highlighted an extensive role of RBM10 in alternative splicing [26, 27]. Thus, the mislocalization of RBM10 in patient cells could participate in deregulation of alternative splicing of target gene transcription in cblC and cblG defects. In contrast to HuR, HnRNPA1 and RBM10, Y14 was not mislocalized in patient cells. This may be explained by the absence of methylation and phosphorylation changes of Y14 in patient fibroblasts, in contrast to HuR, HnRNPA1 and RBM10.

Cbl and SAM treatment resulted in the rescue of methylation, phosphorylation and subcellular localization of HuR, HnRNPA1 and RBM10. This confirmed the key role of decreased methylation and phosphorylation in the abnormal subcellular localization of these RBPs. The treatment of wild-type cells with the methylation inhibitor AdoX did not lead to

HuR mislocalization while it resulted in nuclear localization of HuR in the stressed cblC cells by impairing the nucleocytoplasmic shuttling of Hur that should be associated with cellular stress. In contrast, the inhibition of phosphatases by okadaic acid treatment restored the nuclear localization of HuR in patient cells. These data are similar to those obtained in the mouse N1E115 neuroblastoma cells [13]. They showed that phosphorylation has a prominent role in the nucleocytoplasmic shuttling and subcellular localization of RBP and RNA in stressed cells of patients while decreased methylation alone has a modulating but no mandatory role in this shuttling. Indeed, our data support the numerous studies highlighting the importance of post-translational modifications in the regulation of HuR function, including phosphorylation of serine and threonine residues [28, 29].

The inborn errors of cbl metabolism produced altered nucleo-cytoplasmic shuttling of mRNAs and splicing of IRF3 that were consistent with the RBP cytoplasmic mislocalization. The loss of nuclear localization and increased cytoplasmic localization of HuR, HnRNPA1 and RBM10 produces a mislocalization of mRNA that is involved in pathological mechanisms of other genetic diseases with neurological manifestations. Mutations affecting the HnRNPA1 gene have been associated with amyotrophic lateral sclerosis [30]. Among them, it has been shown that a specific mutation affecting the nuclear localization signal (NLS) of HnRNPA1 could lead to permanent cytoplasm localization and most likely to pathogenic loss of function in a patient who presented with flail arm syndrome (FAS), an atypical and mild subtype of amyotrophic lateral sclerosis characterized with progressive and symmetric weakness of the upper limbs but with no significant lower limb disability [31]. It is noticeable that some cblC and cblG cases may have neurological manifestations that mimic mild forms of amyotrophic lateral sclerosis [32]. In addition, methylcobalamin prevented the death of motor neurons derived from embryonic stem cell co-cultivated with astrocytes expressing mutant human superoxide dismutase-1 (G93A) [33]. RBM10 null mutations affect early embryonic development and could lead to the X-linked recessive disorder TARP syndrome associated with hearing loss, optic atrophy and structural brain abnormalities [34]. Interestingly, an in-frame deletion of RBM10 found in a TARP patient has been associated with the loss of nuclear localization and accumulation in the cytosol, strongly suggesting that the abnormal subcellular localization of RBM10 could be responsible for pathogenic loss of function [26]. The altered splicing of IRF3 may be an example of a general deregulation of RNA splicing produced by inborn errors of cbl metabolism. IRF3 splicing is regulated by HnRNPA1 [14]. We also observed an abnormal splicing of IRF3 with skipping of exons 2 and 3 in cblG and in cblG*

fibroblasts (Fig. 5B). IRF gene codes for a transcriptional activator for type I interferons and the truncated isoforms produced by alternative splicing are known to inhibit the full-length gene product [14]. Taken together, the dramatic alterations of mRNA shuttling and splicing could contribute to explain the great variability of clinical manifestations and response to therapy of inborn errors of cbl metabolism.

The impaired cbl metabolism leads to RBP mislocalization and subsequent transcriptomic changes mainly affecting genes involved in neurogenesis, synapse transmission, brain development, and neuroplasticity, in NIE-115 and patient cells. These data led us to investigate the effect of SIRT1 activation on the cognitive defects associated with the genetic defects of cbl metabolism in a mice model of cblG with conditional invalidation of Mtr in the brain. The invalidation of Mtr produced a decreased expression of SIRT1 in the hippocampus. The subsequent alteration of the localization of HuR and the hippocampo-dependent learning ability, were corrected by the administration of SRT1720. Similarly, Wang et al showed that SRT1720 treatment could reduce the cognitive decline in type 2 diabetic rats, probably through a Nrf2-NFkB dependent mechanism [35]. Thus, our study suggests that the beneficial effect of SRT1720 on the cognitive performance of the Mtr KO mice results from the rescue of RBPs proper localization through its protective effects against ER stress. They are consistent with the beneficial effects of SRT1720 recently described on neuroplasticity, including axon growth, dendritic arborization and neurite outgrowth [36].

5. Conclusions

Taken together, our data show a common scenario of the molecular consequences of the inborn errors of cbl cellular metabolism with reduced MS activity. The oxidant stress and decreased expression of SIRT1 produce ER stress and a subsequent mislocalization of RBP through decreased methylation and phosphorylation leading to deregulation of RNA trafficking and splicing (Supplementary Fig. 6). These pathological mechanisms were reversed by pharmacological activation of SIRT1 in patient cells in vitro but also in vivo in a mouse model of methionine synthase deficiency. Indeed, we showed that SRT1720 treatment could partially rescue the cognitive defects observed in these mice. Thus, our work opens perspectives for the use of SIRT1 activating compounds as a novel therapeutic strategy to treat inborn errors of cbl metabolism especially for patients with poor response to conventional therapy. For many of these patients, a good treatment response effect on metabolic markers does not include

significant improvement of neurological and psychiatric symptoms [6], highlighting the need for an alternative therapeutic approach.

Acknowledgment

We thank D.R. Rosenblatt (McGill, Montreal) and M.R. Baumgartner (University Children's Hospital, Zürich) for providing patient fibroblasts.

Funding

This work was supported by fundings from Fondation Jérôme Lejeune, CHRU Nancy Hospital and Région Lorraine.

Conflict-of-interest/financial disclosure statement

None.

Authors contributions

J.L.G. and D.C. conceived the study. J.L.G., D.C., and R.G. wrote the manuscript. R.G., S.F.B.H., N.D., F.F., J.L.G. and D.C. contributed to the experimental design and interpretation of data. R.G., C.B., A.W., J.F., A.R. and N.D. contributed to the fibroblast studies. C.A., I.T. and G.P. contributed to the mouse studies.

Current address of R. Ghemrawi: College of Pharmacy, Al Ain University, 112612 Abu Dhabi, UAE.

Abbreviations

ABCD4, ATP Binding Cassette Subfamily D Member 4; AdoCbl, adenosylcobalamin; Adox, adenosine dialdehyde; ATF6, Activating Transcription Factor 6; ELAVL1, ELAV Like RNA Binding Protein 1; ER, endoplasmic reticulum; FISH, Fluorescence In Situ Hybridization; HnRNPA1, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1; HSF1, Heat Shock Transcription Factor 1; HuR, Hu-Antigen R, ELAVL1; IRF3, Interferon Regulatory Factor-3; LMBD1, LMBR1 domain-containing protein; MeCbl, methylcobalamin; MTR, 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase; MTRR, 5-Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferase Reductase; OA, okadaic acid; PLA, proximity ligation assay; PP2A, Protein Phosphatase 2 Phosphatase Activator; RBM10, RNA Binding Motif Protein 10; RBP, RNA binding protein; SAM, S-adenosyl methionine; SIRT1, Sirtuin 1; SRSF1, Serine and Arginine Rich Splicing Factor 1; SSC, Saline Sodium Citrate buffer; TG, thapsigargin.

Legends to Figures

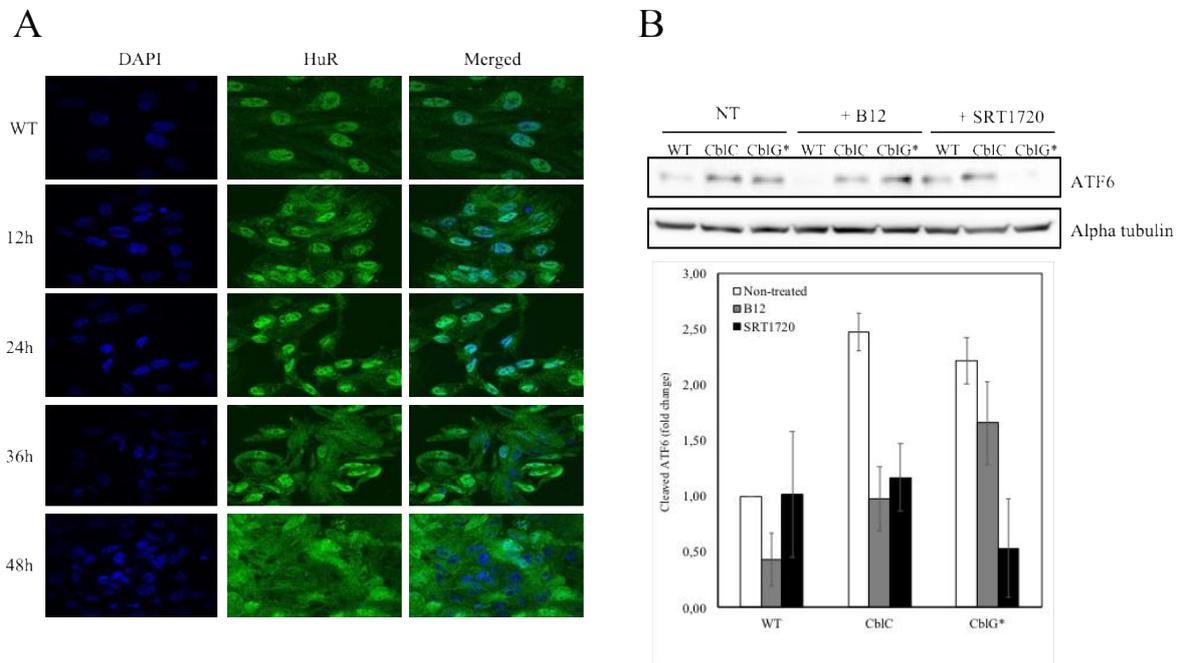


Fig. 1. Effect of thapsigargin on the subcellular localization of HuR in control fibroblasts and effect of vitamin B12 and SRT1720 on ATF6 cleavage in *cblC* and in *cblG** patient fibroblasts. (A) Following exposure to thapsigargin (1 μ M, 3 days), cells were stained with anti-HuR and DAPI at different time points and visualized by confocal microscopy. (B) Fibroblasts from control (WT), *cblC* and *cblG** patients were incubated with B12 vitamin (hydroxocobalamin 20 μ M, 5 days) or with SRT1720 (1 μ M, 3 days) and submitted to western blotting against the activated form of ATF6. Alpha tubulin was used as an internal control of protein expression. Densitometric analysis of three different Western blots shows the quantification of cleaved.

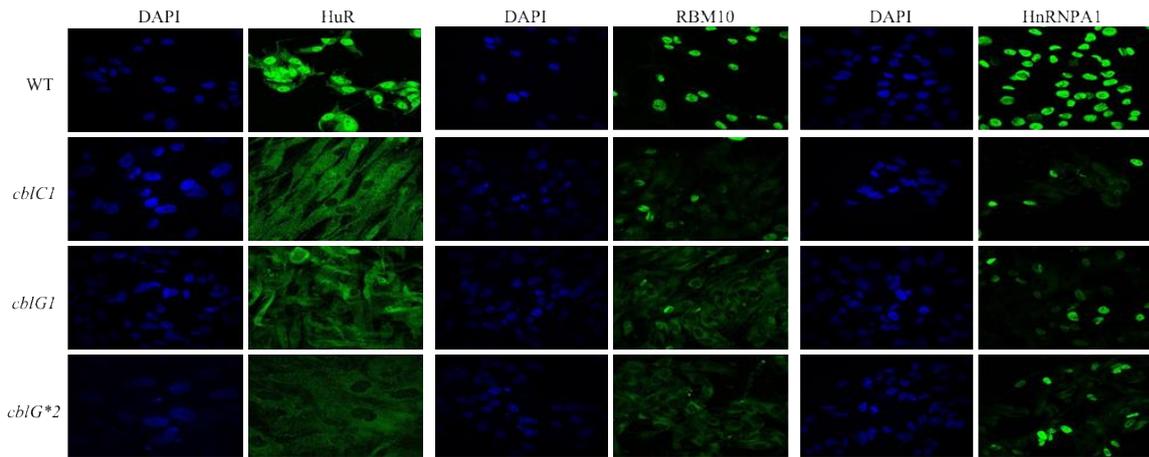


Fig. 2. Subcellular localization of selected RNA binding proteins. Fibroblasts from control, and from three patients (*cblC1*, *cblG1* and *cblG*2*) patients were stained with anti-HuR, anti-RBM10 and anti-HnRNPA1 and visualized by confocal microscopy.

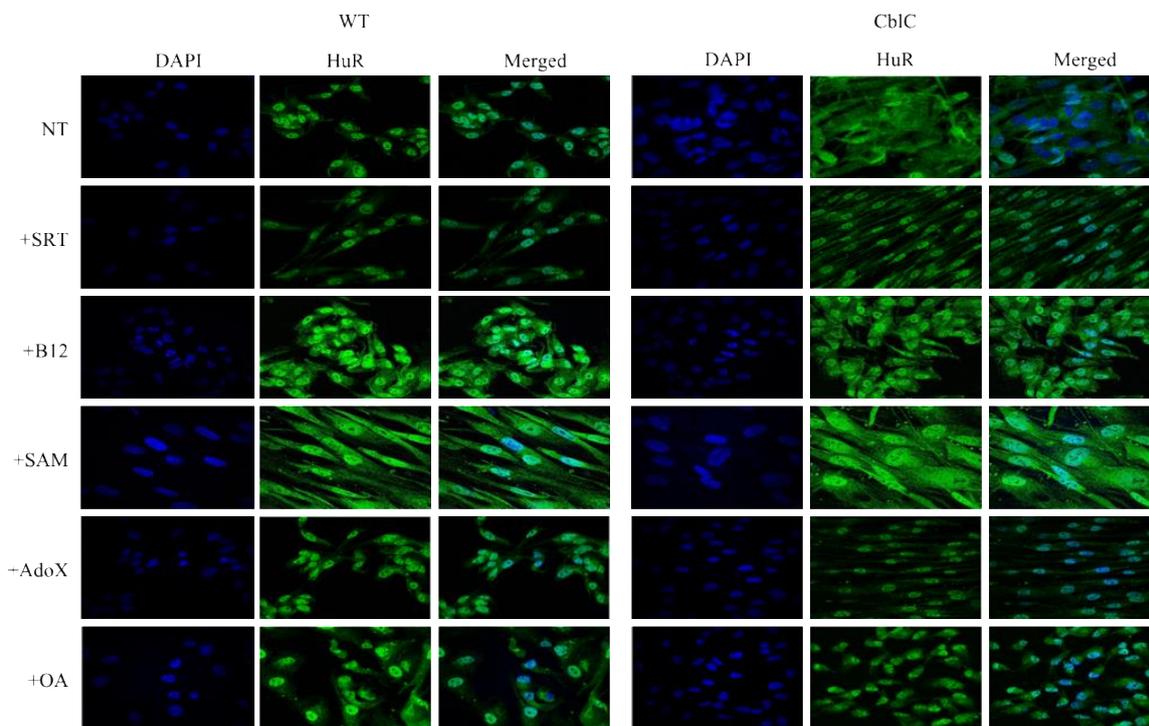
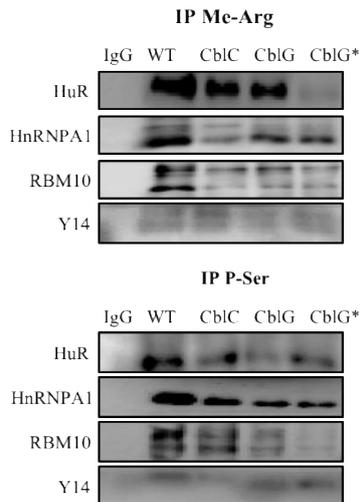


Fig. 3. Effect of SRT1720, vitamin B12, SAM, AdoX and okadaic acid on the subcellular localization of HuR. Fibroblasts from control and from one *cblC* patient were incubated with SRT1720 (1 μ M, 3 days), B12 vitamin (hydroxocobalamin 20 μ M, 5 days), SAM (75 μ M, 5 days), AdoX (1 μ M) and okadaic acid (OA, 10 nM), stained with anti-HuR and visualized by confocal microscopy.

A



B

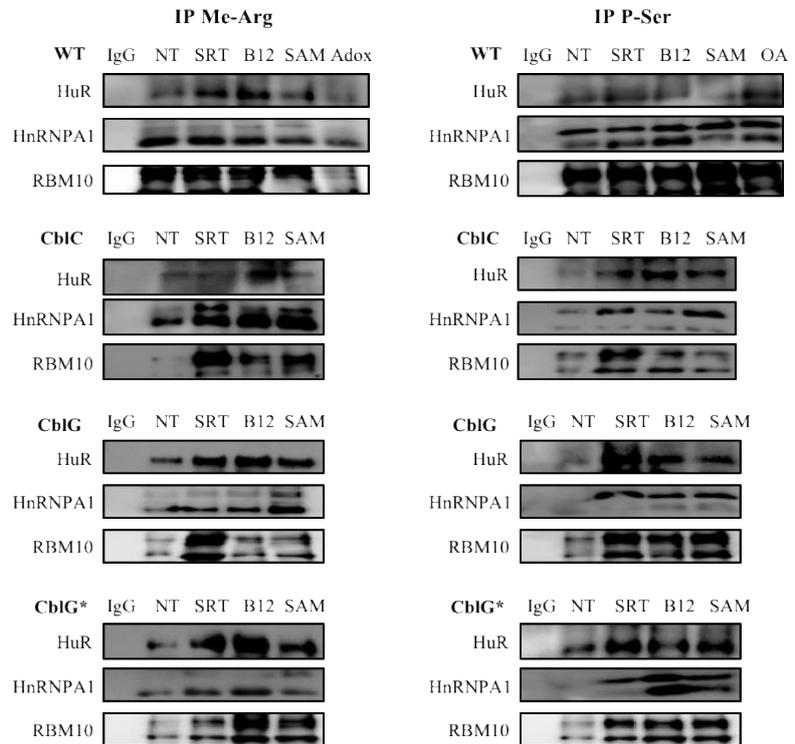
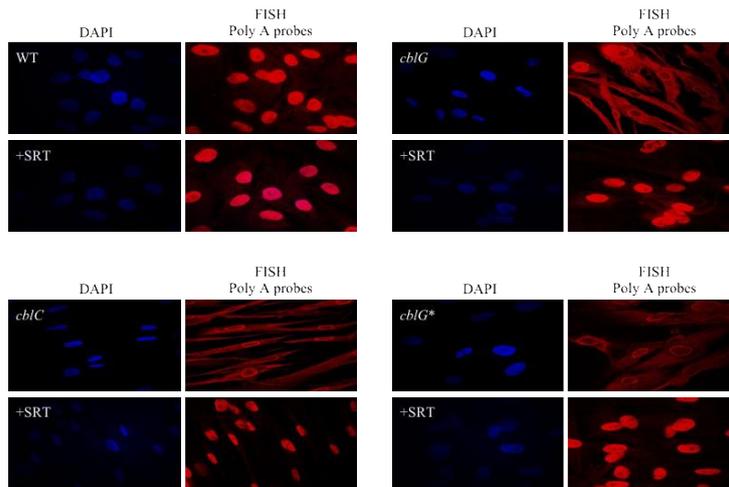


Fig. 4. Effect of SRT1720, vitamin B12, SAM, AdoX and okadaic acid treatments on the methylation and on the phosphorylation of HuR, HnRNPA1 and RBM10. (A) Control (WT) cblC, cblG and cblG* fibroblasts extracts were immuno-precipitated with anti-methyl-arginine or phosphor-serine antibodies and submitted to western blotting against HuR, HnRNPA1, RBM10 and Y14 proteins. (B) Similarly, in addition to the IgG control and to non-treated cells (NT), each cell line was treated with SRT1720 (SRT, 1 μ M), B12 vitamin (B12, 20 μ M), SAM (75 μ M) and AdoX (1 μ M) for the detection of the methylated forms of HuR, HnRNPA1 and RBM10 or with SRT1720 (SRT), B12 vitamin (B12), SAM and okadaic acid (OA, 10 nM) for the detection of the phosphorylated forms of the same RNA binding proteins.

A



B

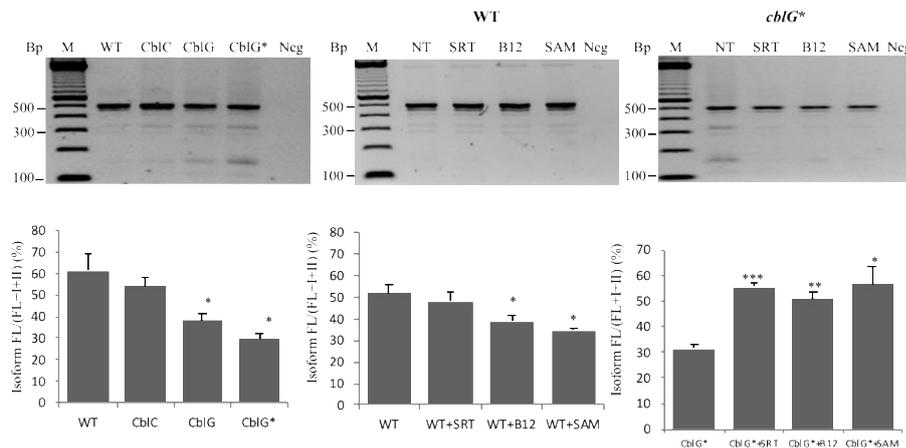


Fig. 5. Effect of SRT1720 on mRNA localization and effects of SRT1720, vitamin B12 and SAM treatments on IRF3 splicing. (A) Control (WT), *cblC*, *cblG* and *cblG** fibroblasts were treated with SRT1720 (1 μ M, 3 days), and submitted to FISH assay with poly A probes and stained with DAPI before visualization by confocal microscopy. (B) Alternative splicing of IRF3 in control (WT), *cblC*, *cblG* and *cblG** fibroblasts. Control and *cblG** cells were treated with SRT1720 (1 μ M, 3 days), B12 vitamin (hydroxocobalamin 20 μ M, 5 days) and SAM (75 μ M, 5 days). RT-PCR of IRF3 was performed with specific primers (Guo et al, 2013) designed to amplify three different products: a full-length product of 500 bp (FL) containing the exons 1 to 4, a first splicing variant of 327 bp (Type I: exclusion of exon 2) and a second variant of 155 bp (Type II: exclusion of exon 2 and exon 3 and expressed by the ratio FL/(FL+I+II)). T test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$.

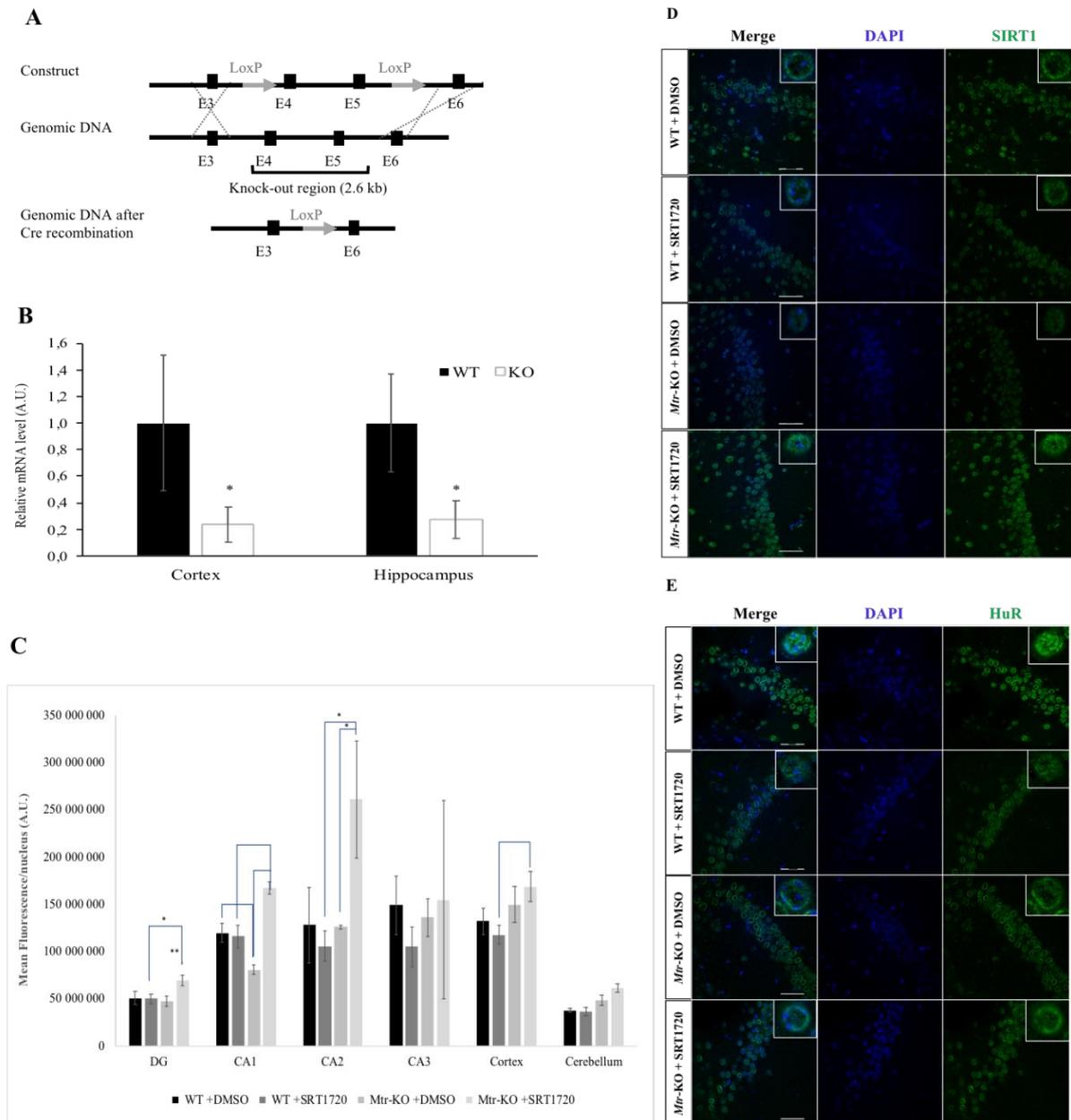


Fig. 6. *Mtr* knock-out mouse model, SIRT1 expression in the brain and effect of SRT1720 treatment on the cognitive function. (A) Genetic strategy for the *Mtr* knock-out mouse model. The construct was inserted into the genomic region by homologous recombination (grey crosses). In the construct, two LoxP sites are flanking the exons 4 and 5 of the *Mtr* gene. Following Cre recombination between the two LoxP sites, these two exons are removed and a frameshift occurs in exon 6. (B) *Mtr* mRNA quantitation by RT-qPCR in the cortex and hippocampus of WT and *Mtr*-KO mice (n=6) $P < 0.001$. (C) Quantification of the SIRT1 protein by immunofluorescence (green) in different cerebral regions of WT and *Mtr*-KO mice

following SRT1720 treatment. T test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ (D). Immunofluorescence staining of SIRT1 (green) in WT and Mtr-KO mice following SRT1720 treatment in the CA1 zone of the hippocampus. Confocal microscopy with x60 objective. Scale bars (white dash) represent 10 μm . (E). Immunofluorescence staining of HuR (green) in WT and Mtr-KO mice following SRT1720 treatment in the CA1 zone of the hippocampus. Confocal microscopy with x60 objective. Scale bars (white dash) represent 10 μm .

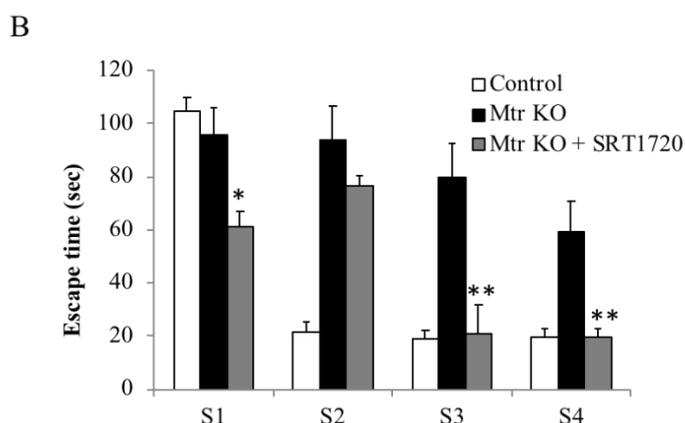
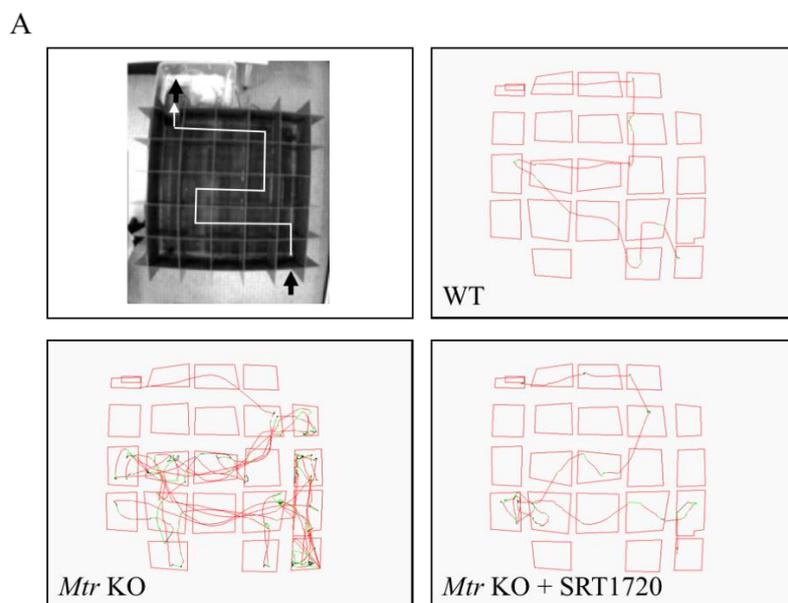


Fig. 7. Effect of SRT1720 treatment on the cognitive performance of brain Mtr-KO mice (A). Upper view of the water maze with the ideal route from the start-box to the home-cage. Every other square zone represents errors and waste of time and examples of cumulative traces of mice in the maze at the end of the training sessions (hippocampo-dependent learning procedure). The red color indicates a rapid speed while the green color indicates a slow speed and even several stops on the walls of the maze. (B) Escape latency of the mice in the aquatic maze. Histograms represent the time required for the mice to exit from the aquatic maze. WT: wild type mouse; Mtr KO: brain Mtr knock-out mouse; Mtr KO + SRT1720: brain Mtr knock-out mouse treated by SRT1720 as described in the Material and Methods section. Each group is composed of at least 6 mice. Parameters were recorded using a video-tracking system (Viewpoint, France). ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

References

1. Watkins D, Rosenblatt DS (2013) Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism. *Biochimie* 95, 1019-1022. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.05.001
2. Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, Suormala T, Burda P, Frapolli M, Stucki M, Nürnberg P, Thiele H, Robenek H, Höhne W, Longo N, Pasquali M, Mengel E, Watkins D, Shoubridge EA, Majewski J, Rosenblatt DS, Fowler B, Rutsch F, Baumgartner MR (2012) Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* 44, 1152-1155. DOI: 10.1038/ng.2386
3. Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold R, Baumgartner MR, Fowler B (2008) Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N. Engl. J. Med.* 358, 1454-1464. DOI: 10.1056/NEJMoa072200
4. Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D, Morel CF, Fujiwara TM, Moras E, Hosack AR, Dunbar GV, Antonicka H, Forgetta V, Dobson CM, Leclerc D, Gravel RA, Shoubridge EA, Coulton JW, Lepage P, Rommens JM, Morgan K, Rosenblatt DS (2006) Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat. Genet.* 38, 93-100. DOI: 10.1038/ng1683
5. Fischer S, Huemer M, Baumgartner M, Deodato F, Ballhausen D, Boneh A, Burlina AB, Cerone R, Garcia P, Gökçay G, Grünewald S, Häberle J, Jaeken J, Ketteridge D, Lindner M, Mandel H, Martinelli D, Martins EG, Schwab KO, Gruenert SC, Schwahn BC, Sztriha L, Tomaske M, Trefz F, Vilarinho L, Rosenblatt DS, Fowler B, Dionisi-Vici C. (2014) Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 831-480. DOI: 10.1007/s10545-014-9687-6
6. Huemer M, Bürer C, Ješina P, Kožich V, Landol MA, Suormala T, Fowler , Augoustides-Savvopoulou P, Blair E, Brennerova K, Broomfield A, De Meirleir L, Gökçay G, Hennermann J, Jardine P, Koch J, Lorenzl S, Lotz-Havla AS, Noss J, Parini R, Peters H, Plecko B, Ramos FJ, Schlune A, Tsiakas K, Zerjav Tansek M, Baumgartner MR (2015) Clinical onset and course, response to treatment and outcome in 24 patients with the cblE or cblG remethylation defect complemented by genetic and in vitro enzyme study data. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 957-967. DOI: 10.1007/s10545-014-9803-7
7. Sillaots SL, Hall CA, Hurteloup V, Rosenblatt DS (1992) Heterogeneity in cblG: differential retention of cobalamin on methionine synthase. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 47, 242-249.
8. Richard E, Alvarez-Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M (2007) Methylmalonic acidemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *J. Pathol.* 213, 453-461. DOI: 10.1002/path.2248
9. Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Pérez N. (2013) Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *J. Cell Biochem.* 114, 183-191. DOI: 10.1002/jcb.24316
10. 10.Jorge-Finnigan A, Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Richard E (2010) Different altered pattern expression of genes related to apoptosis in isolated methylmalonic aciduria cblB type

and combined with homocystinuria cblC type. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 959-967. DOI: 10.1016/j.bbadis.2010.08.002

11. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, Alberto JM, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, Martinez-Fong D, Daval JL, Guéant JL (2009) Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21930-21935. DOI: 10.1073/pnas.0811794106
12. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Guéant JL, Battaglia-Hsu SF (2013) Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* 4, e553. DOI: 10.1038/cddis.2013.69
13. Battaglia-Hsu SF, Ghemrawi R, Coelho D, Dreumont N, Mosca P, Hergalant , Gauchotte G, Sequeira JM, Ndiongue M, Houlgatte R, Alberto JM, Umoret R, Robert A, Paoli J, Jung M, Quadros EV, Guéant JL (2018) Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1. *Nucleic Acids Res.* 46, 7844-7857. DOI: 10.1093/nar/gky634
14. Guo R, Li Y, Ning J, Sun D, Lin L, Liu X (2013) HnRNP A1/A2 and SF2/ASF regulate alternative splicing of interferon regulatory factor-3 and affect immunomodulatory functions in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 8, e62729. DOI: 10.1371/journal.pone.0062729
15. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450, 712-716. DOI: 10.1038/nature06261
16. Richard E, Jorge-Finnigan A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Desviat LR, Gort L, Briones P, Leal F, Pérez-Cerdá C, Ribes A, Ugarte M, Pérez B; MMACHC Working Group. (2009) Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cblC) with homocystinuria (MMACHC). *Hum. Mutat.* 30, 1558-1566. DOI: 10.1002/humu.21107
17. Jakubowski H. (2019) Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiol. Rev.* 99, 555-604. DOI: 10.1152/physrev.00003.2018
18. Guéant JL, Elakoum R, Ziegler, Coelho D, Feigerlova E, Daval JL, Guéant-Rodriguez RM (2014) Nutritional models of foetal programming and nutrigenomic and epigenomic

dysregulations of fatty acid metabolism in the liver and heart. *Pflugers Arch.* 466, 833-850. DOI: 10.1007/s00424-013-1339-4

19. Meisner NC, Filipowicz W (2011) Properties of the Regulatory RNA-Binding Protein HuR and its Role in Controlling miRNA Repression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 700, 106-123. DOI: 10.1007/978-1-4419-7823-3_10

20. Cammas A, Pileur F, Bonnal S, Lewis SM, Lévêque N, Holcik M, Vagner S. (2007) Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Mol. Biol. Cell* 18, 5048-5059. DOI: 10.1091/mbc.e07-06-0603

21. Guil S, Long JC, Cáceres JF (2006) hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5744-5758. DOI: 10.1128/MCB.00224-06

22. Mayeda A, Krainer AR (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68, 365-375. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90477-t

23. Sinha R, Allemand E, Zhang Z, Karni R, Myers MP, Krainer AR (2010) Arginine methylation controls the subcellular localization and functions of the oncoprotein splicing factor SF2/ASF. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2762-2674. DOI: 10.1128/MCB.01270-09

24. Van der Houven van Oordt W, Diaz-Meco MT, Lozano J, Krainer AR, Moscat J, Cáceres JF (2000) The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J. Cell. Biol.* 149, 307-316. DOI: 10.1083/jcb.149.2.307

25. Bessonov S, Anokhina M, Will CL, Urlaub H, Lührmann R (2008) Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 452, 846-850. DOI: 10.1038/nature06842

26. Wang Y, Gogol-Döring A, Hu H, Fröhler S, Ma Y, Jens M, Maaskola J, Murakawa Y, Quedenau C, Landthaler M, Kalscheuer V, Wiczorek D, Wang Y, Hu Y, Chen W (2013) Integrative analysis revealed the molecular mechanism underlying RBM10-mediated splicing regulation. *EMBO Mol. Med.* 5, 1431-1442. DOI: 10.1002/emmm.201302663

27. Inoue A, Yamamoto N, Kimura M, Nishio K, Yamane H, Nakajima K (2014) RBM10 regulates alternative splicing. *FEBS Lett.* 588, 942-947. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.01.052

28. Abdelmohsen K, Pullmann R Jr, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA, Furneaux H, Gorospe M. (2007) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol. Cell.* 25, 543-557. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.01.011

29. Grammatikakis I, Abdelmohsen K, Gorospe M (2017) Posttranslational control of HuR function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* Epub 2016 Jun 16. DOI: 10.1002/wrna.1372

30. Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi AS, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benatar M, King OD,

Kimonis VE, Ross ED, Wehl CC, Shorter J, Taylor JP (2013) Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and HnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495, 467-473. DOI: 10.1038/nature11922

31. Liu Q, Shu S, Wang RR, Liu F, Cui B, Guo XN, Lu CX, Li XG, Liu MS, Peng B, Cui LY, Zhang X (2016) Whole-exome sequencing identifies a missense mutation in HnRNPA1 in a family with flail arm ALS. *Neurology* 87, 1763-1769. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003256

32. Mirian, A, Korngut L. (2018) The Utility of the Laboratory Work Up at the Time of Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neuromuscul. Dis.* 5, 35-38. DOI: 10.3233/JND-170281

33. Ito S, Izumi Y, Niidome T, Ono Y (2017) Methylcobalamin prevents mutant superoxide dismutase-1-induced motor neuron death in vitro. *Neuroreport.* 28, 101-107. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000716

34. Johnston JJ, Teer JK, Cherukuri PF, Hansen NF, Loftus SK, NIH Intramural Sequencing Center (NISC), Chong K, Mullikin J, Biesecker LG (2010) Massively parallel sequencing of exons on the X chromosome identifies RBM10 as the gene that causes a syndromic form of cleft palate. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 743-748. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.007

35. Wang F, Shang Y, Zhang R, Gao X, Zeng Q (2018) A SIRT1 agonist reduces cognitive decline in type 2 diabetic rats through antioxidative and anti-inflammatory mechanisms. *Mol. Med. Rep.* Epub ahead of print. DOI: 10.3892/mmr.2018.9699

36. Lee J, Ko YU, Chung Y, Yun N, Kim M, Kim K, Oh YJ (2018) The acetylation of cyclin-dependent kinase 5 at lysine 33 regulates kinase activity and neurite length in hippocampal neurons. *Sci. Rep.* 8, 13676. DOI: 10.1038/s41598-018-31785-9

37. Fofou-Caillierez MB, Mrabet NT, Chéry C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, Paoli J, Alberto JM, Coelho D, Camadro JM, Feillet F, Watkins D, Fowler B, Rosenblatt DS, Guéant JL (2013) Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4591-4601. DOI: 10.1093/hmg/ddt308

38. Bassila C, Ghemrawi R, Flayac J, Froese DS, Baumgartner MR, Guéant JL, Coelho D (2017) Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1863, 103-112. DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.10.016

39. Watkins D, Ru M, Hwang HY, Kim CD, Murray A, Philip NS, Kim W, Legakis H, Wai T, Hilton JF, Ge B, Doré C, Hosack A, Wilson A, Gravel RA, Shane B, Hudson TJ, Rosenblatt DS (2002) Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 143-153. DOI: 10.1086/341354

Références bibliographiques

- Abdrabo LS, Watkins D, Wang SR, Lafond-Lapalme J, Riviere J-B, Rosenblatt DS. Genome and RNA sequencing in patients with methylmalonic aciduria of unknown cause. *Genet Med*. 2019 Aug 29;1–5.
- Akchiche N, Bossenmeyer-Pourié C, Kerek R, Martin N, Pourié G, Koziel V, et al. Homocysteinylated neuronal proteins contribute to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *The FASEB Journal*. 2012 Oct;26(10):3980–92.
- Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):253–305.
- Ament AE, Li Z, Sturm AC, Perko JD, Lawson S, Masterson M, et al. Juvenile cobalamin deficiency in individuals of African ancestry is caused by a founder mutation in the intrinsic factor gene GIF. *Br J Haematol*. 2009 Feb;144(4):622–4.
- Ames BN. Optimal micronutrients delay mitochondrial decay and age-associated diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2010 Jul 1;131(7):473–9.
- Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012 Aug 1;23(8):853–9.
- Andrès E, Affenberger S, Vinzio S, Noel E, Kaltenbach G, Schlienger J-L. Carences en vitamine B12 chez l'adulte : étiologies, manifestations cliniques et traitement. *La Revue de Médecine Interne*. 2005 Dec 1;26(12):938–46.
- Andrès E, Dali- Youcef N, Vogel T, Serraj K, Zimmer J. Oral cobalamin (vitamin B12) treatment. An update. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2009;31(1):1–8.
- Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ*. 2004 Aug 3;171(3):251–9.
- Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *CMLS, Cell Mol Life Sci*. 2003 Aug 1;60(8):1647–58.
- Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 2014 May 15;30(10):1363–9.
- Bacci GM, Donati MA, Pasquini E, Munier F, Cavicchi C, Morrone A, et al. Optical coherence tomography morphology and evolution in cb1C disease-related maculopathy in a case series of very young patients. *Acta Ophthalmologica*. 2017;95(8):e776–82.
- Baribault C, Ehrlich KC, Ponnaluri VKC, Pradhan S, Lacey M, Ehrlich M. Developmentally linked human DNA hypermethylation is associated with down-modulation, repression,

- and upregulation of transcription. *Epigenetics*. 2018;13(3):275–89.
- Bassila C, Ghemrawi R, Flayac J, Froese DS, Baumgartner MR, Guéant J-L, et al. Methionine synthase and methionine synthase reductase interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2017 Jan 1;1863(1):103–12.
- Battaglia-Hsu S, Akchiche N, Noel N, Alberto J-M, Jeannesson E, Orozco-Barrios CE, et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Dec 22;106(51):21930–5.
- Battaglia-Hsu S-F, Ghemrawi R, Coelho D, Dreumont N, Mosca P, Hergalant S, et al. Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res*. 2018 Sep 6;46(15):7844–57.
- Baulny HO de, Gérard M, Saudubray JM, Zittoun J. Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment. *Eur J Pediatr*. 1998 Mar 1;157(2):S77–83.
- Beedholm-Ebsen R, Wetering K van de, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood*. 2010 Feb 25;115(8):1632–9.
- van den Berg DLC, Snoek T, Mullin NP, Yates A, Bezstarosti K, Demmers J, et al. An Oct4-Centered Protein Interaction Network in Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Apr 2;6(4):369–81.
- Berlin H, Berlin R, Brante G. Oral Treatment of Pernicious Anemia with High Doses of Vitamin B12 Without Intrinsic Factor. *Acta Medica Scandinavica*. 1968;184(1–6):247–58.
- Bhate V, Deshpande S, Bhat D, Joshi N, Ladkat R, Watve S, et al. Vitamin B12 status of pregnant Indian women and cognitive function in their 9-year-old children. *Food Nutr Bull*. 2008 Dec;29(4):249–54.
- Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986 May;321(6067):209.
- Bjørke-Monsen A-L, Ueland PM. Cobalamin status in children. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2011;34(1):111–9.
- Black DL. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*. 2003;72(1):291–336.
- Blaise SA, Nédélec E, Schroeder H, Alberto J-M, Bossenmeyer-Pouricé C, Guéant J-L, et al. Gestational Vitamin B Deficiency Leads to Homocysteine-Associated Brain Apoptosis and Alters Neurobehavioral Development in Rats. *The American Journal of Pathology*. 2007 Feb 1;170(2):667–79.
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*. 2011 Apr 15;435(2):297–312.
- Brunaud L, Alberto J-M, Ayav A, Gérard P, Namour F, Antunes L, et al. Vitamin B12 Is a

- Strong Determinant of Low Methionine Synthase Activity and DNA Hypomethylation in Gastrectomized Rats. *DIG*. 2003;68(2–3):133–40.
- Brunaud L, Alberto J-M, Ayav A, Gérard P, Namour F, Antunes L, et al. Effects of Vitamin B12 and Folate Deficiencies on DNA Methylation and Carcinogenesis in Rat Liver. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2005;41(8):1012–1019.
- Caramaschi D, Sharp GC, Nohr EA, Berryman K, Lewis SJ, Davey Smith G, et al. Exploring a causal role of DNA methylation in the relationship between maternal vitamin B12 during pregnancy and child's IQ at age 8, cognitive performance and educational attainment: a two-step Mendelian randomization study. *Hum Mol Genet*. 2017 Aug 1;26(15):3001–13.
- Carmel R. Gastric juice in congenital pernicious anemia contains no immunoreactive intrinsic factor molecule: study of three kindreds with variable ages at presentation, including a patient first diagnosed in adulthood. *Am J Hum Genet*. 1983a Jan;35(1):67–77.
- Carmel R. R-Binder Deficiency: A Clinically Benign Cause of Cobalamin Pseudodeficiency. *JAMA*. 1983b Oct 14;250(14):1886–90.
- Carmel R. Current Concepts in Cobalamin Deficiency. *Annual Review of Medicine*. 2000;51(1):357–75.
- Carmel R. Mild Transcobalamin I (Haptocorrin) Deficiency and Low Serum Cobalamin Concentrations. *Clinical Chemistry*. 2003 Aug 1;49(8):1367–74.
- Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2214–21.
- Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on Cobalamin, Folate, and Homocysteine. *Hematology*. 2003 Jan 1;2003(1):62–81.
- Carmel R, Parker J, Kelman Z. Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *British Journal of Haematology*. 2009;147(3):386–91.
- Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC, McMahon JM, O'Roak BJ, Cook J, et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet*. 2013 Jul;45(7):825–30.
- Caterino M, Pastore A, Strozziero MG, Giovamberardino GD, Imperlini E, Scolamiero E, et al. The proteome of cblC defect: in vivo elucidation of altered cellular pathways in humans. *J Inherit Metab Dis*. 2015 Sep 1;38(5):969–79.
- Charlet J, Duymich CE, Lay FD, Mundbjerg K, Dalsgaard Sørensen K, Liang G, et al. Bivalent Regions of Cytosine Methylation and H3K27 Acetylation Suggest an Active Role for DNA Methylation at Enhancers. *Mol Cell*. 2016 05;62(3):422–31.
- Chen J, Zhou X, Wu W, Wang X, Wang Y. FTO-dependent function of N6-methyladenosine is involved in the hepatoprotective effects of betaine on adolescent mice. *J Physiol Biochem*. 2015 Sep 1;71(3):405–13.
- Chen NC, Yang F, Capecchi LM, Gu Z, Schafer AI, Durante W, et al. Regulation of

- homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *FASEB J*. 2010 Aug;24(8):2804–17.
- Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2012 Oct;120(10):1362–8.
- Cicccone DN, Su H, Hevi S, Gay F, Lei H, Bajko J, et al. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*. 2009 Sep;461(7262):415–8.
- Clarac F, Massion J, Smith AM. Duchenne, Charcot and Babinski, three neurologists of La Salpêtrière Hospital, and their contribution to concepts of the central organization of motor synergy. *Journal of Physiology-Paris*. 2009 Nov 1;103(6):361–76.
- Clark TG, Conway SJ, Scott IC, Labosky PA, Winnier G, Bundy J, et al. The mammalian Tolloid-like 1 gene, *Tll1*, is necessary for normal septation and positioning of the heart. *Development*. 1999 Jun;126(12):2631–42.
- Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, et al. Mutations in *ABCD4* cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet*. 2012a Oct;44(10):1152–5.
- Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, et al. Mutations in *ABCD4* cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet*. 2012b Oct;44(10):1152–5.
- Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS, Newbold RF, et al. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N Engl J Med*. 2008 Apr 3;358(14):1454–64.
- Communal C, Colucci WS, Remondino A, Sawyer DB, Port JD, Wichman SE, et al. Reciprocal modulation of mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 and 2 in failing human myocardium. *J Card Fail*. 2002 Apr;8(2):86–92.
- Cooper BA, Rosenblatt DS. Inherited Defects of Vitamin B Metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 1987;7(1):291–320.
- Costanzo RV, Vilá- Ortíz GJ, Perandones C, Carminatti H, Matilla A, Radrizzani M. *Anp32e/Cpd1* regulates protein phosphatase 2A activity at synapses during synaptogenesis. *European Journal of Neuroscience*. 2006;23(2):309–24.
- Dashtipour K, Tafreshi A, Adler C, Beach T, Chen X, Serrano G, et al. Hypermethylation of *Synphilin-1*, *Alpha-Synuclein-Interacting Protein (SNCAIP)* Gene in the Cerebral Cortex of Patients with Sporadic Parkinson's Disease. *Brain Sci* [Internet]. 2017 Jun 27 [cited 2019 Sep 17];7(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5532587/>
- Daval J-L, Blaise S, Guéant J-L. Vitamin B deficiency causes neural cell loss and cognitive impairment in the developing rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 6;106(1):E1.
- Dejosez M, Levine SS, Frampton GM, Whyte WA, Stratton SA, Barton MC, et al. *Ronin/Hcf-1* binds to a hyperconserved enhancer element and regulates genes involved in the growth of embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2010 Jul 15;24(14):1479–84.

- Delgado-Reyes CV, Wallig MA, Garrow TA. Immunohistochemical Detection of Betaine–Homocysteine S-Methyltransferase in Human, Pig, and Rat Liver and Kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001 Sep 1;393(1):184–6.
- Deme JC, Hancock MA, Xia X, Shintre CA, Plesa M, Kim JC, et al. Purification and interaction analyses of two human lysosomal vitamin B12 transporters: LMBD1 and ABCD4. *Molecular Membrane Biology*. 2014 Nov 1;31(7–8):250–61.
- D’Erchia AM, Gallo A, Manzari C, Raho S, Horner DS, Chiara M, et al. Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Aug 30 [cited 2019 Sep 30];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5577269/>
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Kadir H, Narang M, Lerner-Ellis JP, et al. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet*. 2002a Dec 15;11(26):3361–9.
- Dobson CM, Wai T, Leclerc D, Wilson A, Wu X, Doré C, et al. Identification of the gene responsible for the cblA complementation group of vitamin B12-responsive methylmalonic acidemia based on analysis of prokaryotic gene arrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002b Nov 26;99(24):15554–9.
- Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, et al. Topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature*. 2012 May;485(7397):201–6.
- Drost H-G, Paszkowski J. Biomart: genomic data retrieval with R. *Bioinformatics*. 2017 15;33(8):1216–7.
- Ebbing M, Bønaa KH, Nygård O, Arnesen E, Ueland PM, Nordrehaug JE, et al. Cancer Incidence and Mortality After Treatment With Folic Acid and Vitamin B12. *JAMA*. 2009 Nov 18;302(19):2119–26.
- Feil R. Ready for the marks. *Nature*. 2009 Sep;461(7262):359–60.
- Fernandez AF, Huidobro C, Fraga MF. De novo DNA methyltransferases: oncogenes, tumor suppressors, or both? *Trends in Genetics*. 2012 Oct 1;28(10):474–9.
- Fettelschoss V, Burda P, Sagné C, Coelho D, De Laet C, Lutz S, et al. Clinical or ATPase domain mutations in ABCD4 disrupt the interaction between the vitamin B12-trafficking proteins ABCD4 and LMBD1. *J Biol Chem*. 2017 14;292(28):11980–91.
- Finglas PM. Dietary Reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;8(11):296–7.
- Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 1990 May 1;1(5):228–37.
- Finkelstein JD. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clinical Chemical Laboratory Medicine*. 2007;45(12):1694–1699.

- Fischer S, Huemer M, Baumgartner M, Deodato F, Ballhausen D, Boneh A, et al. Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the cblC defect. *J Inher Metab Dis*. 2014 Sep 1;37(5):831–40.
- Fofou-Caillierez MB, Mrabet NT, Chéry C, Dreumont N, Flayac J, Pupavac M, et al. Interaction between methionine synthase isoforms and MMACHC: characterization in cblG-variant, cblG and cblC inherited causes of megaloblastic anaemia. *Hum Mol Genet*. 2013 Nov 15;22(22):4591–601.
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2007 May 1;13(3):225–38.
- Froese DS, Fowler B, Baumgartner MR. Vitamin B12, folate, and the methionine remethylation cycle—biochemistry, pathways, and regulation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [Internet]. 2018 Dec 27 [cited 2019 Feb 1];0(0). Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jimd.12009>
- Froese DS, Gravel RA. Genetic disorders of vitamin B12 metabolism: eight complementation groups – eight genes. *Expert Rev Mol Med* [Internet]. 2010 Nov;12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995210/>
- Froese DS, Kopec J, Fitzpatrick F, Schuller M, McCorvie TJ, Chalk R, et al. Structural Insights into the MMACHC-MMADHC Protein Complex Involved in Vitamin B12 Trafficking. *J Biol Chem*. 2015 Dec 4;290(49):29167–77.
- Froese DS, Krojer T, Wu X, Shrestha R, Kiyani W, von Delft F, et al. Structure of MMACHC Reveals an Arginine-Rich Pocket and a Domain-Swapped Dimer for Its B12 Processing Function. *Biochemistry*. 2012 Jun 26;51(25):5083–90.
- Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. Gene expression regulation mediated through reversible m⁶A RNA methylation. *Nature Reviews Genetics*. 2014 May;15(5):293–306.
- Fujii K, Galivan JH, Huennekens FM. Activation of methionine synthase: Further characterization of the flavoprotein system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1977 Jan 30;178(2):662–70.
- Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, Christensen EI, Tanner SM, Chapelle A de la, et al. The functional cobalamin (vitamin B12)–intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1573–9.
- Garcia MM, Guéant- Rodriguez R-M, Pooya S, Brachet P, Alberto J-M, Jeannesson E, et al. Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *The Journal of Pathology*. 2011;225(3):324–35.
- Gaull GE, Tallan HH. Methionine adenosyltransferase deficiency: new enzymatic defect associated with hypermethioninemia. *Science*. 1974 Oct 4;186(4158):59–60.
- Gérard M, Morin G, Bourillon A, Colson C, Mathieu S, Rabier D, et al. Multiple congenital anomalies in two boys with mutation in HCFC1 and cobalamin disorder. *European Journal of Medical Genetics*. 2015 Mar 1;58(3):148–53.

- Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant J-L, et al. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* 2013 Mar;4(3):e553.
- Girard CL, Santschi DE, Stabler SP, Allen RH. Apparent ruminal synthesis and intestinal disappearance of vitamin B12 and its analogs in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2009 Sep;92(9):4524–9.
- Gottlieb C, Lau K-S, Wasserman LR, Herbert V. Rapid Charcoal Assay for Intrinsic Factor (IF), Gastric Juice Unsaturated B12 Binding Capacity, Antibody to IF, and Serum Unsaturated B12 Binding Capacity. *Blood.* 1965 Jun 1;25(6):875–84.
- Gräsbeck R. Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B12 malabsorption with proteinuria). *Orphanet J Rare Dis.* 2006 May 19;1:17.
- Greenberg H, Penman S. Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells. *Journal of Molecular Biology.* 1966 Nov 28;21(3):527–35.
- Guéant J, Coelho D, Nicolas J-P. [Vitamin B12 and related genetic disorders]. *Bull Acad Natl Med.* 2014 Jun;198(6):1141–56.
- Guéant J-L, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto J-M, Freund J-N, Dulluc I, et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie.* 2013a May 1;95(5):1033–40.
- Guéant J-L, Chéry C, Oussalah A, Nadaf J, Coelho D, Josse T, et al. A PRDX1 mutant allele causes a MMACHC secondary epimutation in cblC patients. *Nature Communications.* 2018 Jan 4;9(1):67.
- Guéant J-L, Namour F, Guéant-Rodriguez R-M, Daval J-L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2013b Jun 1;24(6):279–89.
- Guéant J-L, Namour F, Guéant-Rodriguez R-M, Daval J-L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2013c Jun 1;24(6):279–89.
- Hall CA. The neurologic aspects of transcobalamin II deficiency. *British Journal of Haematology.* 1992;80(1):117–20.
- Hannibal L, DiBello PM, Yu M, Miller A, Wang S, Willard B, et al. THE MMACHC PROTEOME: HALLMARKS OF FUNCTIONAL COBALAMIN DEFICIENCY IN HUMANS. *Mol Genet Metab.* 2011 Jul;103(3):226–39.
- Hannibal L, Kim J, Brasch NE, Wang S, Rosenblatt DS, Banerjee R, et al. Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: A role for the MMACHC (cblC) gene product. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2009 Aug 1;97(4):260–6.
- He C. Grand Challenge Commentary: RNA epigenetics? *Nature Chemical Biology.* 2010 Nov 15;6:863–5.
- Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000 Jan 14;45(2):273–8.

- Hodgkin DC, Kamper J, Mackay M, Pickworth J, Trueblood KN, White JG. Structure of vitamin B12. *Nature*. 1956 Jul 14;178(4524):64–6.
- Hörster F, Baumgartner MR, Viardot C, Suormala T, Burgard P, Fowler B, et al. Long-Term Outcome in Methylmalonic Acidurias Is Influenced by the Underlying Defect (mut⁰, mut⁻, cblA, cblB). *Pediatric Research*. 2007 Aug;62(2):225–30.
- Huemer M, Baumgartner MR. The clinical presentation of cobalamin-related disorders: From acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *Journal of Inherited Metabolic Disease* [Internet]. 2018 Sep 25 [cited 2019 Feb 19];0(0). Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jimd.12012>
- Huemer M, Bürer C, Ješina P, Kožich V, Landolt MA, Suormala T, et al. Clinical onset and course, response to treatment and outcome in 24 patients with the cblE or cblG remethylation defect complemented by genetic and in vitro enzyme study data. *J Inherit Metab Dis*. 2014a;38(5):957–67.
- Huemer M, Diodato D, Schwahn B, Schiff M, Bandeira A, Benoist J-F, et al. Guidelines for diagnosis and management of the cobalamin-related remethylation disorders cblC, cblD, cblE, cblF, cblG, cblJ and MTHFR deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(1):21–48.
- Huemer M, Scholl-Bürgi S, Hadaya K, Kern I, Beer R, Seppi K, et al. Three new cases of late-onset cblC defect and review of the literature illustrating when to consider inborn errors of metabolism beyond infancy. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2014b Nov 15;9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255922/>
- Hörster F, Hoffmann Georg F. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria? recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2004 Oct [cited 2019 Sep 2];19(10). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00467-004-1572-3>
- Illingworth RS, Bird AP. CpG islands – ‘A rough guide.’ *FEBS Letters*. 2009;583(11):1713–20.
- de jaeger C, Fraoucene N, Voronska E, Cherin P. Rôle de l’homocystéine en pathologie. *Médecine & Longévité*. 2010 Jun 1;2(2):73–86.
- Jeong S-O, Son Y, Lee JH, Choi SW, Kim SH, Cheong Y-K, et al. Both nitric oxide and nitrite prevent homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and subsequent apoptosis via cGMP-dependent pathway in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017 Nov 4;493(1):164–9.
- Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, et al. N6-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nat Chem Biol*. 2011 Oct 16;7(12):885–7.
- Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis*. 2018 Jan 31;5(1):1–8.
- Jorge-Finnigan A, Gámez A, Pérez B, Ugarte M, Richard E. Different altered pattern expression of genes related to apoptosis in isolated methylmalonic aciduria cblB type and combined with homocystinuria cblC type. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular*

- Basis of Disease. 2010 Nov 1;1802(11):959–67.
- Joseph J. Fattening by deprivation: methyl balance and perinatal cardiomyopathy. *The Journal of Pathology*. 2011;225(3):315–7.
- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*. 2011;12(2):206–22.
- Kadayifci FZ, Zheng S, Pan Y-X. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Dec 14 [cited 2019 Aug 31];19(12). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320837/>
- Kamdar F, Garry DJ. Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016 May 31;67(21):2533–46.
- Kapadia CR, Serfilippi D, Voloshin K, Donaldson RM. Intrinsic Factor-mediated Absorption of Cobalamin by Guinea Pig Ileal Cells. *J Clin Invest*. 1983 Mar;71(3):440–8.
- Katz M, Lee SK, Cooper BA. Vitamin B12 Malabsorption Due to a Biologically Inert Intrinsic Factor. *New England Journal of Medicine*. 1972 Aug 31;287(9):425–9.
- Ke S, Alemu EA, Mertens C, Gantman EC, Fak JJ, Mele A, et al. A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes Dev*. 2015 Oct 1;29(19):2037–53.
- Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K. Methionine Adenosyltransferase II-dependent Histone H3K9 Methylation at the COX-2 Gene Locus. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13592–601.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*. 2015 Apr;12(4):357–60.
- Kim J, Gherasim C, Banerjee R. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 23;105(38):14551–4.
- Kim J, Hannibal L, Gherasim C, Jacobsen DW, Banerjee R. A Human Vitamin B12 Trafficking Protein Uses Glutathione Transferase Activity for Processing Alkylcobalamins. *J Biol Chem*. 2009 Nov 27;284(48):33418–24.
- Kim JC, Lee N-C, Hwu PW-L, Chien Y-H, Fahiminiya S, Majewski J, et al. Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B12 metabolism: Diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012 Dec 1;107(4):664–8.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013 Mar;14(3):153–65.
- Koutmos M, Gherasim C, Smith JL, Banerjee R. Structural Basis of Multifunctionality in a Vitamin B₁₂-processing Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Aug 26;286(34):29780–7.
- Kulkarni A, Dangat K, Kale A, Sable P, Chavan-Gautam P, Joshi S. Effects of Altered Maternal

- Folic Acid, Vitamin B12 and Docosahexaenoic Acid on Placental Global DNA Methylation Patterns in Wistar Rats. *PLoS One* [Internet]. 2011 Mar 10 [cited 2019 Mar 29];6(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3053375/>
- Kvezereli-Kopadze M, Mtvarelidze Z. [IMERSLUND-GRÄSBECK SYNDROME CONGENITAL FORM OF VITAMIN B12 DEFICIENCY ANEMIA]. *Georgian Med News*. 2019 May;(290):45–8.
- Langan RC, Goodbred AJ. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *AFP*. 2017 Sep 15;96(6):384–9.
- Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014;15(2):R29.
- Ledley FD, Lumetta MR, Zoghbi HY, VanTuinen P, Ledbetter SA, Ledbetter DH. Mapping of human methylmalonyl CoA mutase (MUT) locus on chromosome 6. *American Journal of Human Genetics*. 1988 Jun;42(6):839.
- Lee D-H, Jacobs DR, Porta M. Hypothesis: a unifying mechanism for nutrition and chemicals as lifelong modulators of DNA hypomethylation. *Environ Health Perspect*. 2009 Dec;117(12):1799–802.
- Lerner-Ellis JP, Anastasio N, Liu J, Coelho D, Suormala T, Stucki M, et al. Spectrum of mutations in *MMACHC*, allelic expression, and evidence for genotype–phenotype correlations. *Hum Mutat*. 2009 Jul 1;30(7):1072–81.
- Lerner- Ellis JP, Dobson CM, Wai T, Watkins D, Tirone JC, Leclerc D, et al. Mutations in the *MMAA* gene in patients with the *cblA* disorder of vitamin B12 metabolism. *Human Mutation*. 2004;24(6):509–16.
- Lerner-Ellis JP, Gradinger AB, Watkins D, Tirone JC, Villeneuve A, Dobson CM, et al. Mutation and biochemical analysis of patients belonging to the *cblB* complementation class of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006a Mar 1;87(3):219–25.
- Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D, et al. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, *cblC* type. *Nature Genetics*. 2006b Nov 27;38(1):ng1683.
- Li J, Yang X, Qi Z, Sang Y, Liu Y, Xu B, et al. The role of mRNA m6A methylation in the nervous system. *Cell Biosci* [Internet]. 2019 Aug 20 [cited 2019 Sep 1];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6701067/>
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757–72.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 2009 Nov 19;462(7271):315–22.
- Liu M-Y, Yang Y-L, Chang Y-C, Chiang S-H, Lin S-P, Han L-S, et al. Mutation spectrum of *MMACHC* in Chinese patients with combined methylmalonic aciduria and

- homocystinuria. *Journal of Human Genetics*. 2010 Sep;55(9):621–6.
- Luciano RL, Wilson AC. HCF-1 Functions as a Coactivator for the Zinc Finger Protein Krox20. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):51116–24.
- Ma X, Adelstein RS. A Point Mutation in Myh10 Causes Major Defects in Heart Development and Body Wall Closure. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Jun;7(3):257–65.
- Machida YJ, Machida Y, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Dutta A. The Deubiquitinating Enzyme BAP1 Regulates Cell Growth via Interaction with HCF-1. *J Biol Chem*. 2009 Dec 4;284(49):34179–88.
- Madrid A, Chopra P, Alisch RS. Species-Specific 5 mC and 5 hmC Genomic Landscapes Indicate Epigenetic Contribution to Human Brain Evolution. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:39.
- Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biol*. 2012 Jun 15;13(6):R44.
- Manzanares W, Hardy G. Vitamin B12: the forgotten micronutrient for critical care. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Nov;13(6):662–8.
- Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial one-carbon metabolism maintains redox balance during hypoxia. *Cancer Discov*. 2014 Dec;4(12):1371–3.
- Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*. 2003 Mar 1;26(3):137–46.
- McDonald MK, Fritz J-A, Jia D, Scheuchner D, Snyder FF, Stanislaus A, et al. Identification of ABC transporters acting in vitamin B12 metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Metab*. 2017;122(4):160–71.
- McManus CJ, Graveley BR. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr Opin Genet Dev*. 2011 Aug;21(4):373–9.
- Mentch SJ, Locasale JW. One Carbon Metabolism and Epigenetics: Understanding the Specificity. *Ann N Y Acad Sci*. 2016a Jan;1363(1):91–8.
- Mentch SJ, Locasale JW. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Ann N Y Acad Sci*. 2016b Jan;1363:91–8.
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and Near Stop Codons. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1635–46.
- Michaud J, Praz V, James Faresse N, JnBaptiste CK, Tyagi S, Schütz F, et al. HCFC1 is a common component of active human CpG-island promoters and coincides with ZNF143, THAP11, YY1, and GABP transcription factor occupancy. *Genome Res*. 2013 Jun;23(6):907–16.
- Miwa JM, Stevens TR, King SL, Caldarone BJ, Ibanez-Tallon I, Xiao C, et al. The protoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival

- in vivo. *Neuron*. 2006 Sep 7;51(5):587–600.
- Moestrup SK, Birn H, Fischer PB, Petersen CM, Verroust PJ, Sim RB, et al. Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8612–7.
- Moestrup SK, Kozyraki R, Kristiansen M, Kaysen JH, Rasmussen HH, Brault D, et al. The Intrinsic Factor-Vitamin B12 Receptor and Target of Teratogenic Antibodies Is a Megalin-binding Peripheral Membrane Protein with Homology to Developmental Proteins. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5235–42.
- Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, Burke H, Sutton M, Brody LC, et al. Maternal Vitamin B12 Status and Risk of Neural Tube Defects in a Population With High Neural Tube Defect Prevalence and No Folic Acid Fortification. *Pediatrics*. 2009 Mar;123(3):917–23.
- Montecucco A, Biamonti G. Pre-mRNA processing factors meet the DNA damage response. *Front Genet* [Internet]. 2013 Jun 6 [cited 2019 Sep 2];4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674313/>
- Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):23–38.
- Morel CF, Lerner-Ellis JP, Rosenblatt DS. Combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC): Phenotype–genotype correlations and ethnic-specific observations. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006 Aug 1;88(4):315–21.
- Morishita H, Miwa JM, Heintz N, Hensch TK. Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex. *Science*. 2010 Nov 26;330(6008):1238–40.
- Mosammaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:155–79.
- Mudie S, Bandarra D, Batie M, Biddlestone J, Moniz S, Ortmann B, et al. PITX1, a specificity determinant in the HIF-1 α -mediated transcriptional response to hypoxia. *Cell Cycle*. 2015 Jan 3;13(24):3878–91.
- Murai KK, Pasquale EB. Eph Receptors, Ephrins, and Synaptic Function. *Neuroscientist*. 2004 Aug 1;10(4):304–14.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009 Jan 1;417(1):1–13.
- Murray LK, Jadavji NM. The role of one-carbon metabolism and homocysteine in Parkinson's disease onset, pathology and mechanisms. *Nutrition Research Reviews*. undefined/ed;1–13.
- Nicolas JP, Guéant JL. Gastric intrinsic factor and its receptor. *Baillieres Clin Haematol*. 1995 Sep;8(3):515–31.
- Niu Y, Zhao X, Wu Y-S, Li M-M, Wang X-J, Yang Y-G. N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013 Feb;11(1):8–17.

- Oh R, Brown DL. Vitamin B12 Deficiency. *AFP*. 2003 Mar 1;67(5):979–86.
- O’Leary F, Samman S. Vitamin B12 in Health and Disease. *Nutrients*. 2010 Mar 5;2(3):299–316.
- Olteanu H, Banerjee R. Human Methionine Synthase Reductase, a Soluble P-450 Reductase-like Dual Flavoprotein, Is Sufficient for NADPH-dependent Methionine Synthase Activation. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):35558–63.
- Osenberg S, Karten A, Sun J, Li J, Charkowick S, Felice CA, et al. Activity-dependent aberrations in gene expression and alternative splicing in a mouse model of Rett syndrome. *PNAS*. 2018 Jun 5;115(23):E5363–72.
- Ovenden ES, McGregor NW, Emsley RA, Warnich L. DNA methylation and antipsychotic treatment mechanisms in schizophrenia: Progress and future directions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018 Feb 2;81:38–49.
- Padovani D, Labunska T, Banerjee R. Energetics of Interaction between the G-protein Chaperone, MeaB, and B12-dependent Methylmalonyl-CoA Mutase. *J Biol Chem*. 2006 Jun 30;281(26):17838–44.
- Pak W, Hindges R, Lim Y-S, Pfaff SL, O’Leary DDM. Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell*. 2004 Nov 12;119(4):567–78.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics*. 2008 Dec;40(12):1413–5.
- Pashmforoush M, Pomiès P, Peterson KL, Kubalak S, Ross J, Hefti A, et al. Adult mice deficient in actinin-associated LIM-domain protein reveal a developmental pathway for right ventricular cardiomyopathy. *Nat Med*. 2001 May;7(5):591–7.
- Patil DP, Chen C-K, Pickering BF, Chow A, Jackson C, Guttman M, et al. m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*. 2016 Sep 15;537(7620):369–73.
- Pendleton KE, Chen B, Liu K, Hunter OV, Xie Y, Tu BP, et al. The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*. 2017 May 18;169(5):824-835.e14.
- Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang T-C, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol*. 2015 Mar;33(3):290–5.
- Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, V Lord R, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics & Chromatin*. 2015 Jan 27;8(1):6.
- Peterson CL, Laniel M-A. Histones and histone modifications. *Current Biology*. 2004 Jul 27;14(14):R546–51.
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al.

- Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):771–6.
- Ping X-L, Sun B-F, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang W-J, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*. 2014 Feb;24(2):177–89.
- Plessl T, Bürer C, Lutz S, Yue WW, Baumgartner MR, Froese DS. Protein destabilization and loss of protein-protein interaction are fundamental mechanisms in cblA-type methylmalonic aciduria. *Hum Mutat*. 2017;38(8):988–1001.
- Pooya S, Blaise S, Garcia MM, Giudicelli J, Alberto J-M, Guéant-Rodriguez R-M, et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α , and HNF-4 α in the rat liver. *Journal of Hepatology*. 2012 Aug 1;57(2):344–51.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*. 2010 Oct;28(10):1057–68.
- Profitlich LE, Kirmse B, Wasserstein MP, Diaz GA, Srivastava S. High prevalence of structural heart disease in children with cblC-type methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2009 Dec 1;98(4):344–8.
- Prudencio M, Belzil VV, Batra R, Ross CA, Gendron TF, Pregent LJ, et al. Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat Neurosci*. 2015 Aug;18(8):1175–82.
- Pupavac M, Watkins D, Petrella F, Fahiminiya S, Janer A, Cheung W, et al. Inborn Error of Cobalamin Metabolism Associated with the Intracellular Accumulation of Transcobalamin-Bound Cobalamin and Mutations in ZNF143, Which Codes for a Transcriptional Activator. *Human Mutation*. 2016;37(9):976–82.
- Quadros EV. Advances in the Understanding of Cobalamin Assimilation and Metabolism. *Br J Haematol*. 2010 Jan;148(2):195–204.
- Quadros EV, Lai S-C, Nakayama Y, Sequeira JM, Hannibal L, Wang S, et al. Positive Newborn Screen for Methylmalonic Aciduria Identifies the First Mutation in TCblR/CD320, the Gene for Cellular Uptake of Transcobalamin-bound Vitamin B12. *Hum Mutat*. 2010 Aug;31(8):924–9.
- Quadros EV, Regec AL, Khan KMF, Quadros E, Rothenberg SP. Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999 Jul 1;277(1):G161–6.
- Quadros EV, Sequeira JM. Cellular Uptake of Cobalamin: Transcobalamin and the TCblR/CD320 Receptor. *Biochimie*. 2013 May;95(5):1008–18.
- Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse Reactions. *J Biol Chem*. 2012 Aug 3;287(32):27255–64.

- Quinlivan EP, Crider KS, Zhu J-H, Maneval DR, Hao L, Li Z, et al. Hypomethylation of serum blood clot DNA, but not plasma EDTA-blood cell pellet DNA, from vitamin B12-deficient subjects. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e65241.
- Quintana AM, Geiger EA, Achilly N, Rosenblatt DS, Maclean KN, Stabler SP, et al. Hcfc1b, a zebrafish ortholog of HCFC1, regulates craniofacial development by modulating mmachc expression. *Dev Biol*. 2014 Dec 1;396(1):94–106.
- Quintana AM, Yu H-C, Brebner A, Pupavac M, Geiger EA, Watson A, et al. Mutations in THAP11 cause an inborn error of cobalamin metabolism and developmental abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2017 Aug 1;26(15):2838–49.
- Raux G, Gantier R, Thomas-Anterion C, Boulliat J, Verpillat P, Hannequin D, et al. Dementia with prominent frontotemporal features associated with L113P presenilin 1 mutation. *Neurology*. 2000 Nov 28;55(10):1577–9.
- Rea S, Eisenhaber F, O’Carroll D, Strahl BD, Sun Z-W, Schmid M, et al. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000 Aug;406(6796):593–9.
- Richard E, Alvarez- Barrientos A, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Methylmalonic acidaemia leads to increased production of reactive oxygen species and induction of apoptosis through the mitochondrial/caspase pathway. *The Journal of Pathology*. 2007;213(4):453–61.
- Richard E, Desviat LR, Ugarte M, Pérez B. Oxidative stress and apoptosis in homocystinuria patients with genetic remethylation defects. *J Cell Biochem*. 2013 Jan;114(1):183–91.
- Richard E, Jorge-Finnigan A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Desviat LR, Gort L, et al. Genetic and cellular studies of oxidative stress in methylmalonic aciduria (MMA) cobalamin deficiency type C (cb1C) with homocystinuria (MMACHC). *Hum Mutat*. 2009 Nov 1;30(11):1558–66.
- Richard E, Monteoliva L, Juarez S, Pérez B, Desviat LR, Ugarte M, et al. Quantitative analysis of mitochondrial protein expression in methylmalonic acidemia by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteome Res*. 2006 Jul;5(7):1602–10.
- Ridge LA, Mitchell K, Al-Anbaki A, Shaikh Qureshi WM, Stephen LA, Tenin G, et al. Non-muscle myosin IIB (Myh10) is required for epicardial function and coronary vessel formation during mammalian development. *PLoS Genet* [Internet]. 2017 Oct 30 [cited 2019 Sep 30];13(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5697871/>
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):e47.
- Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*. 2010 Mar 2;11(3):R25.
- Rodriguez NR, DiMarco NM, Langley S, American Dietetic Association, Dietitians of Canada, American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance. Position of

- the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance. *J Am Diet Assoc.* 2009 Mar;109(3):509–27.
- Rosenblatt DS, Aspler AL, Shevell MI, Pletcher BA, Fenton WA, Seashore MR. Clinical heterogeneity and prognosis in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria (cblC). *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 1997;20(4):528–38.
- Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2009;108(1):43–51.
- Roundtree IA, He C. RNA epigenetics—chemical messages for posttranscriptional gene regulation. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2016 Feb 1;30:46–51.
- Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, et al. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B₁₂ metabolism. *Nature Genetics.* 2009a Feb;41(2):234.
- Rutsch F, Gailus S, Miousse IR, Suormala T, Sagné C, Toliat MR, et al. Identification of a putative lysosomal cobalamin exporter altered in the cblF defect of vitamin B₁₂ metabolism. *Nat Genet.* 2009b Feb;41(2):234–9.
- Salinas M, Flores E, López- Garrigós M, Leiva- Salinas C. Vitamin B₁₂ deficiency and clinical laboratory: Lessons revisited and clarified in seven questions. *International Journal of Laboratory Hematology.* 2018;40(S1):83–8.
- Scalabrino G. The multi-faceted basis of vitamin B₁₂ (cobalamin) neurotrophism in adult central nervous system: Lessons learned from its deficiency. *Progress in Neurobiology.* 2009 Jul 1;88(3):203–20.
- Schaffer AE, Eggens VRC, Caglayan AO, Reuter MS, Scott E, Coufal NG, et al. CLP1 Founder Mutation Links tRNA Splicing and Maturation to Cerebellar Development and Neurodegeneration. *Cell.* 2014 Apr 24;157(3):651–63.
- Schimel AM, Mets MB. The Natural History of Retinal Degeneration in Association with Cobalamin C (cbl C) Disease. *Ophthalmic Genetics.* 2006 Jan 1;27(1):9–14.
- Schlienger J-L. Besoins nutritionnels et apports conseillés (adultes, femmes enceintes, personnes âgées, sportifs). In: *Nutrition clinique pratique* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2019 Feb 8]. p. 45–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9782294709319000036>
- Schubert HL, Hill CP. Structure of ATP-bound human ATP:cobalamin adenosyltransferase. *Biochemistry.* 2006 Dec 26;45(51):15188–96.
- Schwartz S, Mumbach MR, Jovanovic M, Wang T, Maciag K, Bushkin GG, et al. Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep.* 2014 Jul 10;8(1):284–96.
- Scotti MM, Swanson MS. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet.* 2016 Jan;17(1):19–32.
- Serefidou M, Venkatasubramani AV, Imhof A. The Impact of One Carbon Metabolism on Histone Methylation. *Front Genet* [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 2];10. Available

from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00764/full>

- Sharma U, Rando OJ. Metabolic Inputs into the Epigenome. *Cell Metabolism*. 2017 Mar 7;25(3):544–58.
- Shen S, Park JW, Lu Z, Lin L, Henry MD, Wu YN, et al. rMATS: Robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 23;111(51):E5593–601.
- Shi H, Wei J, He C. Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. *Molecular Cell*. 2019 May 16;74(4):640–50.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, et al. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*. 2004 Dec 29;119(7):941–53.
- Shorter KR, Miller BH. Epigenetic Mechanisms in Schizophrenia. *Prog Biophys Mol Biol*. 2015 Jul;118(0):1–7.
- Son N-H, Park T-S, Yamashita H, Yokoyama M, Huggins LA, Okajima K, et al. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest*. 2007 Oct;117(10):2791–801.
- Stabler. Vitamin B12 Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2013 May 23;368(21):2040–2.
- Stabler SP, Allen RH. Vitamin B12 Deficiency as a Worldwide Problem. *Annual Review of Nutrition*. 2004;24(1):299–326.
- Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency [see comments]. *Blood*. 1990 Sep 1;76(5):871–81.
- Stańczak P, Witecka J, Szydło A, Gutmajster E, Lisik M, Auguściak-Duma A, et al. Mutations in mammalian tollid-like 1 gene detected in adult patients with ASD. *Eur J Hum Genet*. 2009 Mar;17(3):344–51.
- Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer*. 2008;123(1):8–13.
- Ströhle A, Richter M, González- Gross M, Neuhäuser- Berthold M, Wagner K-H, Leschik-Bonnet E, et al. The Revised D-A-CH-Reference Values for the Intake of Vitamin B12: Prevention of Deficiency and Beyond. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018 Jan 18;0(0):1801178.
- Stucki M, Coelho D, Suormala T, Burda P, Fowler B, Baumgartner MR. Molecular mechanisms leading to three different phenotypes in the cblD defect of intracellular cobalamin metabolism. *Hum Mol Genet*. 2012 Mar 15;21(6):1410–8.
- Su Y, Deng M-F, Xiong W, Xie A-J, Guo J, Liang Z-H, et al. MicroRNA-26a/Death-Associated Protein Kinase 1 Signaling Induces Synucleinopathy and Dopaminergic Neuron Degeneration in Parkinson's Disease. *Biol Psychiatry*. 2019 May 1;85(9):769–81.

- Takahashi-Iñiguez T, García-Arellano H, Trujillo-Roldán MA, Flores ME. Protection and reactivation of human methylmalonyl-CoA mutase by MMAA protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011 Jan 7;404(1):443–7.
- Takahashi-Iñiguez T, González-Noriega A, Michalak C, Flores ME. Human MMAA induces the release of inactive cofactor and restores methylmalonyl-CoA mutase activity through their complex formation. *Biochimie*. 2017 Nov 1;142:191–6.
- Takeichi T, Hsu C-K, Yang H-S, Chen H-Y, Wong T-W, Tsai W-L, et al. Progressive hyperpigmentation in a Taiwanese child due to an inborn error of vitamin B12 metabolism (cblJ). *British Journal of Dermatology*. 2015;172(4):1111–5.
- Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA, van Bon BWM, Shen Y, Repnikova EA, et al. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 2011 Oct 7;89(4):551–63.
- Tanner SM, Li Z, Bisson R, Acar C, Öner C, Öner R, et al. Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: Founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Human Mutation*. 2004;23(4):327–33.
- Thaler RH, Benartzi S. Save More Tomorrow™: Using Behavioral Economics to Increase Employee Saving. *Journal of Political Economy*. 2004;112(S1):S164–87.
- Ubagai T, Lei KJ, Huang S, Mudd SH, Levy HL, Chou JY. Molecular mechanisms of an inborn error of methionine pathway. Methionine adenosyltransferase deficiency. *J Clin Invest*. 1995 Oct;96(4):1943–7.
- Urbanski G, Villoteau A, Valarché G, Derieppe A, Beucher AB, Belizna C, et al. Prévalence de la carence en vitamine B12 dans un service de médecine interne. *La Revue de Médecine Interne*. 2015 Dec 1;36:A74.
- Veeranki S, Winchester LJ, Tyagi SC. Hyperhomocysteinemia associated skeletal muscle weakness involves mitochondrial dysfunction and epigenetic modifications. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1852(5):732–41.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008 Nov;456(7221):470–6.
- Wang X, He C. Dynamic RNA Modifications in Posttranscriptional Regulation. *Molecular Cell*. 2014 Oct 2;56(1):5–12.
- Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2014 Feb;16(2):191–8.
- Wang Y, Liu J, Huang B, Xu Y-M, Li J, Huang L-F, et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation (Review). *Biomedical Reports*. 2015 Mar 1;3(2):152–8.
- Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*. 2008 May;14(5):802–13.

- Watanabe F, Yabuta Y, Tanioka Y, Bito T. Biologically Active Vitamin B12 Compounds in Foods for Preventing Deficiency among Vegetarians and Elderly Subjects. *J Agric Food Chem*. 2013 Jul 17;61(28):6769–75.
- Watkins D, Rosenblatt DS. Failure of lysosomal release of vitamin B12: a new complementation group causing methylmalonic aciduria (cblF). *Am J Hum Genet*. 1986 Sep;39(3):404–8.
- Watkins D, Rosenblatt DS. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am J Med Genet*. 2011 Feb 15;157(1):33–44.
- Watkins D, Rosenblatt DS. Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism. *Biochimie*. 2013 May 1;95(5):1019–22.
- Will CL, Lührmann R. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2019 Sep 2];3(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119917/>
- Willard HF, Rosenberg LE. Inherited Methylmalonyl CoA Mutase Apoenzyme Deficiency in Human Fibroblasts. *J Clin Invest*. 1980 Mar;65(3):690–8.
- Wilson A, Leclerc D, Rosenblatt DS, Gravel RA. Molecular Basis for Methionine Synthase Reductase Deficiency in Patients Belonging to the cblE Complementation Group of Disorders in Folate/Cobalamin Metabolism. *Hum Mol Genet*. 1999 Oct 1;8(11):2009–16.
- Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Jul 1;66(13):2109–21.
- Wolthers KR, Scrutton NS. Cobalamin uptake and reactivation occurs through specific protein interactions in the methionine synthase–methionine synthase reductase complex. *The FEBS Journal*. 2009;276(7):1942–51.
- Wright AJA, Dainty JR, Finglas PM. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br J Nutr*. 2007 Oct;98(4):667–75.
- Wu J, Frazier K, Zhang J, Gan Z, Wang T, Zhong X. Emerging role of m6A RNA methylation in nutritional physiology and metabolism. *Obesity Reviews* [Internet]. 2019 Sep 2 [cited 2019 Sep 19]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/obr.12942>
- Wu R, Jiang D, Wang Y, Wang X. N6-Methyladenosine (m6A) Methylation in mRNA with A Dynamic and Reversible Epigenetic Modification. *Mol Biotechnol*. 2016 Jul 1;58(7):450–9.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2656–64.
- Xue Y, Ouyang K, Huang J, Zhou Y, Ouyang H, Li H, et al. Direct Conversion of Fibroblasts to Neurons by Reprogramming PTB-Regulated microRNA Circuits. *Cell*. 2013 Jan 17;152(1–2):82–96.

- Yang YM, Ducos R, Rosenberg AJ, Catrou PG, Levine JS, Podell ER, et al. Cobalamin malabsorption in three siblings due to an abnormal intrinsic factor that is markedly susceptible to acid and proteolysis. *J Clin Invest*. 1985 Dec;76(6):2057–65.
- Yates A, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Billis K, Carvalho-Silva D, et al. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jan 4;44(Database issue):D710–6.
- You M-H, Kim BM, Chen C-H, Begley MJ, Cantley LC, Lee TH. Death-associated protein kinase 1 phosphorylates NDRG2 and induces neuronal cell death. *Cell Death Differ*. 2017 Feb;24(2):238–50.
- Yu H, Mashtalir N, Daou S, Hammond-Martel I, Ross J, Sui G, et al. The Ubiquitin Carboxyl Hydrolase BAP1 Forms a Ternary Complex with YY1 and HCF-1 and Is a Critical Regulator of Gene Expression. *Mol Cell Biol*. 2010 Nov;30(21):5071–85.
- Yu H-C, Sloan JL, Scharer G, Brebner A, Quintana AM, Achilly NP, et al. An X-linked cobalamin disorder caused by mutations in transcriptional coregulator HCFC1. *Am J Hum Genet*. 2013a Sep 5;93(3):506–14.
- Yu H-C, Sloan JL, Scharer G, Brebner A, Quintana AM, Achilly NP, et al. An X-linked cobalamin disorder caused by mutations in transcriptional coregulator HCFC1. *Am J Hum Genet*. 2013b Sep 5;93(3):506–14.
- Yue Y, Liu J, He C. RNA N6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes Dev*. 2015 Jul 1;29(13):1343–55.
- Zavadáková P, Fowler B, Suormala T, Novotna Z, Mueller P, Hennermann JB, et al. cblE Type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: Functional correction by minigene expression. *Human Mutation*. 2005;25(3):239–47.
- Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*. 2001 Sep 15;15(18):2343–60.
- Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang C-M, Li CJ, et al. ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Mol Cell*. 2013 Jan 10;49(1):18–29.
- Zhou X, Chen J, Chen J, Wu W, Wang X, Wang Y. The beneficial effects of betaine on dysfunctional adipose tissue and N6-methyladenosine mRNA methylation requires the AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ subunit. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015 Dec 1;26(12):1678–84.
- Zolezzi F, Valli M, Clementi M, Mammi I, Cetta G, Pignatti PF, et al. Mutation producing alternative splicing of exon 26 in the COL1A2 gene causes type IV osteogenesis imperfecta with intrafamilial clinical variability. *Am J Med Genet*. 1997 Aug 22;71(3):366–70.
- Zsindely N, Bodai L. Histone methylation in Huntington’s disease: are bivalent promoters the critical targets? *Neural Regen Res*. 2018 Jul;13(7):1191–2.

Ghemrawi R, Arnold C, Battaglia-Hsu SF, Pourié G, Trinh I, Bassila C, Rashka C, Wiedemann W, Flayac J, Robert A, Dreumont N, Feillet F, Guéant JL, Coelho D. SIRT1 activation rescues the mislocalization of RNA-binding proteins and cognitive defects induced by inherited cobalamin disorders. *Metabolism*. 2019 (accepted).

Résumé

Les défauts génétiques du métabolisme de la vitamine B12 ou cobalamine (cbl) conduisent à une diminution de l'activité de la méthionine synthase, de la synthèse de la SAM et de l'index de méthylation SAM/SAH, qui pourraient être responsables d'altérations de la méthylation de nombreux substrats. Les patients présentent généralement un large spectre de pathologies suggérant que divers processus cellulaires pourraient être affectés. Cependant les mécanismes moléculaires à l'origine de leur développement ne sont pas connus. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous avons utilisé des fibroblastes de patients atteints des troubles héréditaires cblC et cblG pour caractériser les modifications du transcriptome, l'épigénome et le protéome. Nos données montrent une modification de l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus développementaux, neurologiques, ophtalmologiques et cardiovasculaires. Ces associations sont cohérentes avec la présentation clinique des patients. Nous avons également mis en évidence des modifications de l'épissage alternatif de gènes ayant un rôle dans l'organisation du cytosquelette, de la réponse au stress, la méthylation et la liaison à l'ARN. L'étude des gènes différemment exprimés ou épissés a permis d'identifier un certain nombre de protéines de liaison aux ARN (RBP) notamment HuR et HNRNPL qui sont impliquées dans ces modifications. L'analyse de la méthylation de l'ADN a également révélé des modifications concernant des gènes impliqués dans des processus développementaux et neurologiques mais aucune variation de la méthylation des histones et de l'ARNm n'a été détectée. L'étude du protéome a confirmé que l'épissage alternatif était particulièrement affecté et a suggéré un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial. Nos résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies associées aux défauts génétiques cblC et cblG et soulignent l'importance des RBP dans ces processus.

Mots-clés : maladies rares, vitamine B12, épigénomique, transcriptomique, épissage alternatif, physiopathologie

Abstract

Genetic defects of vitamin B12 or cobalamin (cbl) metabolism lead to a decrease of methionine synthase activity that could result in a decrease of S-adenosyl methionine (SAM) synthesis and in the methylation index SAM / SAH that could be responsible for methylation alterations of various substrates. Patients with inherited disorders of cbl metabolism generally have a wide spectrum of pathologies suggesting that various cellular processes may be affected. However, the molecular mechanisms responsible for the development of these disorders are not well known. In order to better understand these mechanisms, we have used fibroblasts of patients with cblC and cblG genetic defects to characterize the modifications of their transcriptome, methylome and proteome. Our data show a modification in the expression of many genes involved in developmental, neurological, ophthalmologic and cardiovascular processes. These associations are consistent with the clinical presentation of the patients. We have also provided evidence of abnormal splicing of genes important for cytoskeleton organization, stress response, methylation and RNA binding. The study of differentially expressed or spliced genes has allowed us to identify various RNA binding proteins (RBP) such as HuR and HNRNPL that are involved in these modifications. The study of DNA methylation also revealed modifications in genes playing a role in developmental and neurological pathologies. No variation in methylation of histones or mRNA has been detected. The proteome study has confirmed that alternative splicing was affected and has suggested that mitochondrial metabolism was also altered. Our results contribute to a better understanding of the molecular mechanisms at the origin of the pathologies associated with the cblC and cblG defects and highlight the crucial role of RBP in these processes.

Keywords: rare disease, Vitamin B12, epigenomic, transcriptomic, alternative splicing physiopathology