



HAL
open science

Impact d'une carence en vitamines B9 et B12 sur l'épitranscriptome m A et la méthylation des protéines histones

Pauline Mosca

► **To cite this version:**

Pauline Mosca. Impact d'une carence en vitamines B9 et B12 sur l'épitranscriptome m A et la méthylation des protéines histones. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0048 . tel-03338505

HAL Id: tel-03338505

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03338505>

Submitted on 8 Sep 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 **Pauline MOSCA**

Impact d'une carence en vitamines B9 et B12 sur l'épitranscriptome m⁶A et la méthylation des protéines histones

Le 29 janvier 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Nicolas CHARLET-BERGUERANT	Directeur de recherche, IGBMC, Strasbourg
	Mme Pascale ROMBY	Directeur de recherche, IBMC, Strasbourg
Examineurs :	Mme Isabelle BEHM-ANSMANT	Chargé de recherche, ImoPA, Nancy
	M. Jean-Yves ROIGNANT	Associate Professor, Université de Lausanne, Lausanne
	M. Bruno LEHEUP	PU-PH, Université de Lorraine, Nancy, directeur de thèse
	Mme Natacha DREUMONT	Maître de Conférence, Université de Lorraine, Nancy, co-directeur de thèse

**UMR1256 INSERM «Nutrition, génétique et exposition aux risques environnementaux»
9 avenue de la Forêt de Haye-Faculté de Médecine - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy**

Remerciements

Je tiens à remercier le Pr Jean-Louis Guéant, directeur de l'unité INSERM U1256, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant ces 4 dernières années.

J'adresse également mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury, Isabelle Behm, Pascale Romby, Jean-Yves Roignant et Nicolas Charlet pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement Isabelle et Nicolas, membre de mon comité de suivi de thèse, pour leurs nombreux conseils tout au long de ma thèse et pour leur soutien, les comités ont toujours été des moments conviviaux et remotivants.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Pr Bruno Leheup, pour son investissement dans mon travail. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre réactivité, vos encouragements mais surtout pour avoir partagé vos connaissances avec moi. Travailler avec vous a été très enrichissant.

Je tiens ensuite à remercier particulièrement Natacha Dreumont, co-directrice de ma thèse. Merci pour ton soutien sans faille, ta présence à la paillasse, tes nombreux conseils et le partage de tes connaissances. Quand je pense qu'on a commencé mon travail de M2 en se disant « il n'y aura pas de thèse derrière » ! Je pense que je n'aurais pas pu trouver mieux comme encadrante, tant professionnellement que personnellement ! Merci pour tout ce que tu m'as apportée, et tout ce que tu apportes à ce laboratoire !

Je remercie ensuite tous mes collègues, pour l'ambiance de travail, pour leur disponibilité, pour la gestion du labo ... Un merci un peu plus particulier à mes copines, pour les pauses soleil, les « *after work* » et leur soutien ! Merci d'avoir toujours réussi à me faire rire, même quand rien ne fonctionnait ! Merci aux anciens, à tous ceux qui sont passés par là avant moi et qui m'ont rappelé que c'était possible !

Merci à mon binôme depuis le jour 1 dans ce labo ! Merci pour tous ses verres partagés et les sessions shopping du vendredi ! Merci pour la bonne ambiance les week-end !

Merci pour tous ces tampons faits en toute discrétion pendant le 1^{er} trimestre .. On l'a fait, on a fini !!!

Je remercie également très sincèrement ma famille, ma belle-famille et mes amis. Je pense que vous ne vous rendez pas compte de l'importance de tous nos moments à parler d'autre chose ! Merci de m'avoir dit que j'étais capable ! Merci de m'avoir écouté même si vous ne compreniez pas tout à fait ! Un merci particulier à mes parents, qui ont toujours cru en moi en m'ont toujours encouragé peu importe mes choix de vie !

Et enfin, merci à la personne sans laquelle je ne serais clairement pas là. Je vais reprendre tes mots : s'il y a bien une bonne raison de ne jamais regretter de m'être lancée, c'est bien pour toi. Merci de me soutenir, m'aider, me conseiller, me donner confiance en moi, me rassurer .. depuis la licence ! Merci de toujours me tirer vers le haut, je n'aurais même pas essayé si je n'avais pas croisé ton chemin. Et bien sûr, merci à notre fils, tes sourires sont ma force de vivre, et ont été essentiels pour traverser cette fin de thèse !

Table des matières

<i>Table des matières</i>	
<i>Table des figures</i>	
<i>Table des Tableaux</i>	
<i>Abréviations</i>	
<i>Liste des publications</i>	
<i>Liste des communications</i>	
INTRODUCTION	
CHAPITRE 1 : LES VITAMINES B9 ET B12 ET LE METABOLISME DES MONOCARBONES	1
1 <i>Rôle des vitamines B9 et B12</i>	1
1.1 La vitamine B9.....	1
1.2 La vitamine B12.....	3
1.3 Le métabolisme des monocarbones	5
2 <i>Les carences en vitamine B9 et B12</i>	7
2.1 Effet d'une carence au niveau physiologique	7
2.2 Carence et troubles neurologiques	8
3 <i>Effets d'une carence en vitamines B9 et B12 au niveau cellulaire et moléculaire</i>	11
3.1 Les modèles d'étude disponibles au laboratoire	11
3.2 Effets d'une carence au niveau cellulaire et moléculaire.....	15
CHAPITRE 2 : LES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES, EXEMPLE DES PROTEINES HISTONES	18
1 <i>Généralités</i>	18
2 <i>Les modifications de l'ADN</i>	19
2.1 Les îlots CpG.....	20
2.2 Les ADN méthyltransférases (DNMT).....	21
2.3 La régulation par les ARN non codants	23
2.4 Effets d'une carence en donneurs de méthyles.....	26
3 <i>Les protéines histones</i>	28
3.1 Les nucléosomes	28
3.2 Les modifications des protéines histones	30
3.3 Les effets d'un défaut du métabolisme des monocarbones	35
CHAPITRE 3 : LES MODIFICATIONS EPIGENETIQUES DES ARN	39
1 <i>La nutriginomique et la modification des ARN (Mosca et al., 2019)</i>	39
2 <i>Exemple des m⁶A</i>	42
2.1 L'étude des m ⁶ A	42
2.2 Les acteurs protéiques	44

2.3	Les fonctions décrites	48
2.4	m ⁶ A et neurologie	50
2.5	Rôle des micronutriments dans la méthylation m ⁶ A	53
	OBJECTIFS DE TRAVAIL	56
MATERIEL ET METHODES.....		
1	<i>Culture cellulaire</i>	57
1.1	Culture des modèles murins	57
1.2	Culture du modèle humain	57
2	<i>Clonage</i>	58
3	<i>Test de liaison à la vitamine B12 radioactive</i>	58
4	<i>Les dosages SAM/SAH</i>	58
5	<i>RT-PCR</i>	59
6	<i>Quantification de la quantité de m⁶A globale</i>	60
7	<i>Immunofluorescence</i>	61
8	<i>Western Blot</i>	62
9	<i>Immunoprécipitation (IP)</i>	63
10	<i>m⁶A RNA Immunoprécipitation (RIP)</i>	63
11	<i>RT-qPCR</i>	66
12	<i>Statistiques</i>	66
RESULTATS/DISCUSSION AXE1.....		
	CHAPITRE 1 : LA METHYLATION M ⁶ A EST PERTURBEE DANS LE MODELE D'ETUDE OT/TO	67
1	<i>Les cellules TO présentent une carence en vitamine B12 et un défaut de SAM</i>	67
2	<i>Les cellules TO présentent un défaut de la méthylation m⁶A</i>	69
3	<i>Une dérégulation des protéines writer/eraser peut également expliquer la dérégulation de la méthylation m⁶A</i>	70
4	<i>La sumoylation de la protéine METTL3 permet de réguler son activité méthyltransférases</i> 77	
5	<i>L'ARNm PRKCA est dérégulé en cas de carence en vitamine B12</i>	78
	CHAPITRE 2 : LA METHYLATION M ⁶ A N'EST PAS PERTURBEE DANS LE MODELE D'ETUDE DES FIBROBLASTES DE PATIENTS.....	83
1	<i>Les fibroblastes de patients cblG/G* ont un défaut de l'activité méthionine synthase induisant un défaut de SAM</i>	83
2	<i>La méthylation m⁶A ne semble pas être impactée dans les fibroblastes de patients CblG/G*</i>	84
3	<i>Etude du stress dans les fibroblastes de patients cblG*</i>	85
	CHAPITRE 3 : LE MODELE D'ETUDE DE FIBROBLASTES D'EMBRYONS DE SOURIS	88

1	<i>Les cellules d'embryons de souris Cd320^{-/-} présentent un défaut de SAM.....</i>	88
2	<i>La carence en vitamine B12 a un impact sur l'expression des protéines reader et eraser de la méthylation m⁶A</i>	89
3	<i>La cible PRKCA est également surméthylée et surexprimée dans le modèle de MEFs.....</i>	94
	DISCUSSION	95
1	<i>Le modèle d'étude OT/TO</i>	95
1.1	<i>Une carence en vitamine B12 entraine une hypo-méthylation globale des ARNm</i>	95
1.2	<i>Etude ciblée de la méthylation des ARNm</i>	98
1.3	<i>Limites du modèle OT/TO</i>	99
2	<i>Le modèle d'étude des fibroblastes de patients.....</i>	100
3	<i>Le modèle d'étude des MEFs.....</i>	102
	RESULTATS/DISCUSSION AXE2.....	104
1	<i>Le protocole nutritionnel MDD (methyl donor deficiency).....</i>	102
2	<i>Les marques de méthylation des histones sont altérées chez les rats MDD.....</i>	103
3	<i>L'expression des méthylases et déméthylases d'histones est altérée chez les rats MDD.....</i>	106
4	<i>Les méthylases et déméthylases des familles KMT et KDM sont régulées par les miR du cluster Dlk1-Dio3.....</i>	107
	DISCUSSION	110
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	
1	<i>La méthylation m⁶A est perturbée en cas de carence en vitamine B12 chez la souris.....</i>	116
2	<i>La méthylation des protéines histones a un effet protecteur contre la carence en donneurs de méthyles chez le rat</i>	117
	Références bibliographiques	119
	ANNEXES.....	
	<i>Annexe 1 :: Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR.....</i>	169
	<i>Annexe 2 : Nutrigenomics and RNA methylation: role of micronutrients.....</i>	184
	<i>Annexe 3 : Bi-allelic pathogenic variants in SARS1 cause neurodevelopmental delay, deafness, cardiomyopathy and decompensation during fever due to partial loss-of-function</i>	191

Table des figures

Figure 1 : Structure de l'acide folique.	1
Figure 2 : Transport et absorption des folates (d'après (Guéant et al., 2013a)).	2
Figure 3 : Structure de la vitamine B12.	4
Figure 4 : Transport et absorption de la vitamine B12 (D'après la thèse de J. Willekens 2018).	5
Figure 5 : Le métabolisme des monocarbone (d'après (Locasale, 2013)).	6
Figure 6 : Les défauts du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 (d'après (Coelho et al., 2008)).	10
Figure 7 : Les lignées cellulaires OT/TO.	13
Figure 8 : Délocalisation de la protéine HuR. D'après (Battaglia-Hsu et al., 2018)...	14
Figure 9 : Les modifications épigénétiques (Kim et al., 2011).	19
Figure 10 : La méthylation m ⁵ C (d'après la thèse de Jérémy Willekens 2018).	20
Figure 11 : Les ADN-méthyltransférases (DNMT)(Moore et al., 2013).	22
Figure 12 : Biogenèse des miR.	25
Figure 13 : Le nucléosome (Tsankova et al., 2007).	29
Figure 14 : Acétylation des résidus lysines sur les protéines histones.	31
Figure 15 : Phosphorylation des résidus Sérine, Thréonine et Tyrosine sur les protéines histones.	32
Figure 16 : Méthylation des résidus lysine et arginine des protéines histones.	34
Figure 17 : Exemple des modifications des ARN (Mosca et al., 2019).	41
Figure 18 : Modifications chimiques des ARNm (Roundtree et al., 2017).	42
Figure 19 : Technique d'étude de la méthylation.	43
Figure 20 : Le mécanisme m ⁶ A.	44
Figure 21 : Test de caractérisation des lignées OT/TO.	68
Figure 22 : Dosage SAM, SAH dans les cellules OT et TO.	69
Figure 23 : Quantité de m ⁶ A sur les ARNm des cellules OT et TO.	70
Figure 24 : Etude de la localisation des protéines impliquées dans le mécanisme m ⁶ A.	74
Figure 25 : Etude de l'expression des protéines impliquées dans le mécanisme m ⁶ A dans les cellules OT/TO.	76
Figure 26 : La protéine METTL3 semble sumoylée en cas de carence en vitamine B12.	78

Figure 27 : Etude de la méthylation m ⁶ A sur les ARNm cibles des protéines reader à domaine YTH.	80
Figure 28 : Etude des cibles NEU1 et PRKCA.	82
Figure 29 : Caractérisation des fibroblastes.	83
Figure 30 : Etude de la méthylation globale de m ⁶ A chez les fibroblastes de patients.	84
Figure 31 : Stress des fibroblastes de patients.	86
Figure 32 : Dosage SAM, SAH et indice de méthylation dans les MEFs WT ou homozygotes ^{-/-} pour Cd320.	88
Figure 33 : Etude de la localisation des protéines impliquées dans le mécanisme m ⁶ A.	91
Figure 34 : Etude de l'expression des protéines impliquées dans le mécanisme m ⁶ A dans les MEFs.	93
Figure 35 : L'ARNm de PRKCA est également surméthylé m ⁶ A dans le modèle de MEFs conduisant à une surexpression de la protéine.	94
Figure 36 : Protocole animal MDD de carence précoce en donneurs de groupements méthyles.	103
Figure 37 : Marques histones et méthylases (vert) / déméthylases (rouge) choisies pour cette étude.	104
Figure 38 : Etude des marques histones d'intérêt.	105
Figure 39 : Etude du niveau d'expression des ARNm codants pour les méthylases et déméthylases d'histones d'intérêt chez les rats issus du protocole MDD....	107
Figure 40 : Niveau d'expression de 4 miR du cluster Dlk1-Dio3 chez les rats issus du protocole MDD.	107
Figure 41 : Confirmation de nos résultats dans le modèle cellulaire C6.	109

Table des Tableaux

Tableau 1 : Les marques histones méthylées les plus décrites.....	35
Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'impact d'une dérégulation du métabolisme des monocarbones sur la méthylation des histones.....	37
Tableau 3 : Impact du régime alimentaire sur la manifestation de maladies (Mosca et al., 2019).	40
Tableau 4 : Les protéines reader des m ⁶ A.	47
Tableau 5 : Composition des tampons.	59
Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.	61
Tableau 7 : Liste des oligonucléotides.....	64
Tableau 8 : Cibles des différentes RBP à domaine de liaison à l'ARN YTH.	79
Tableau 9 : Méthylases et déméthylases prédites pour être des cibles des miR choisis dans cette étude.	108
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des variations de marques histones.	111

Abréviations

3DAA : 3-deazaadénosine
5-me-THF : 5-méthyle tétrahydrofolate
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALT : Alanine aminotransférase
AML : Leucémie myéloïde aigüe
AMPK : AMP-activated protein kinase
ARN : Acide ribonucléique
 ARNi : ARN interférant
 ARNm : ARN messenger
 ARNr : ARN ribosomique
 ARNt : ARN de transfert
 ARNcirc : ARN circulaire
 lncRNA : Long ARN non codants
 miR : microARN
 pre-miR : Precursor-miR
 pri-miR : Primary miR
 shARN : Small hairpin ARN
 snARN : Small nuclear ARN
 snoARN : Small nucleolar ARN
AST : Aspartate aminotransférase
ATP : Adénosine tri-phosphate
AVC : Accident vasculaire cérébral
BER : Base excision repair
BSA : Bovine serum albumine
Cbl : Cobalamine
 ado-Cbl : Ado-cobalamine
 CN-Cbl : Cyanocobalamine
 me-cbl : Méthyle-cobalamine
 OH-Cbl : Hydroxy-cobalamine
CblG* : Cobalamine G variant
CLPTM1 : Cleft lip and palate associated transmembrane protein 1
CpG : Dinucléotide cytosine-phosphate-guanine
CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DGCR8 : Digeorge syndrome critical region 8
DHFR : Dihydrofolate
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium
DMG : Diméthylglycine
DNMT : DNA méthyltransferase
dTMP : Désoxythymidine mono-phosphate
DTT : Dithiothréitol
dUMP : Désoxyuridine mono-phosphate

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
eIF : Eukaryotic initiation factor
FMRP : Fragile X mental retardation protein
FPG : Folate polyglutamate
FR : Folate receptor
FTO : Fat mass and obesity associated protein
G418 : Geneticine
GCPII : Glutamate carboxypeptidase II
GFP : Green fluorescent protein
GGH : γ -glutamyl hydrolase
Gly : Glycine
GTP : Guanosine tri-phosphate
HAT : Histone acétyltransférase
HCC : Carcinome hépatocellulaire
Hcys : Homo-cystéine
HDAC : Histones déacétylases
HKMT : Histone lysine méthyltransférase
HnRNP : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HPLC : Chromatographie liquide ultra haute performance
HRP : Horseradish Peroxydase
HSF : Heat shock factor
HSP : Heat shock protein
HuR : Human antigen R
IP : Immunoprécipitation
 RIP : RNA immunoprecipitation
IRES : Internal ribosome entry site
LSD1 : Lysine specific histone demethylase
m¹A : N(1)méthyle adénosine
m⁵C : 5-méthyle cytosine
m⁶A : N6 méthyle adénosine
m⁶A-seq : m⁶A sequencing
m⁷G : N(7) méthyle guanosine
MAT : Méthionine adénosyl transférase
MDD : Methyl donor deficiency
MeRIP seq : Méthyle RNA immunoprecipitation sequencing
Met : Méthionine
METTL14 : Methyltransferase like14
METTL3 : Methyltransferase like 3
mi-CLIP : m⁶A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation
MS : Méthionine synthase
MSMS : Spectrométrie de masse en tandem
MTHFR : Méthylé tétrahydrofolate réductase
NAFLD : Non alcoholic fatty liver disease
NEU1 : Neuroamidase 1

OMS : Organisation mondiale de la santé
OT : Oléosine-transcobalamine
P/S : Penicilline/ streptomycine
PABA : Acide Para-aminobenzoïque
PBS : Tampon phosphate salin
PCFT : Proton coupled folate transporter
PCR : Polymerase chain reaction
 qPCR : Quantitative polymerase chain reaction
 RT-PCR : Retro-transcription PCR
PP : Protéine phosphatase
PRKCA : Protein kinase c alpha
PRMT : Protein arginin methyl-transferase
PRRC2A : Proline rich coiled-coil 2A
PVDF : Polyvinylidène fluoride
RAG : Regeneration associated gene
RBM : RNA binding motif
RBP : RNA Binding protein
RE : Réticulum endoplasmique
RFC : Reduced folate carrier
RISC : RNA induced silencing complex
SAH : S-adénosyl homocystéine
SAM : S-adénosyl méthionine
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM : Erreur standard de la moyenne
Ser : Sérine
SHMT : Sérine hydroxyméthyle transférase
SIRT : Sirtuine
SOCS2 : Suppressor of cytokine signaling 2
SREBP : Sterol regulatory element binding protein
SRSF : Serine arginine rich splicing factor
SVF : Sérum de veau foetal
TBS : Tampon tris salin
TC : Transcobalamine
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
THF : Tetrahydrofolate
TO : Transcobalamine-oléosine
TUBB3 : Tubulin beta 3 class iii
UTR : Untranslated region
WTAP : Wilms tumor associated protein
YAP : Yes-associated protein
Zc3h13 : Zinc finger CCCH domain-containing protein 13

Liste des publications

1. Battaglia-Hsu SF*, Ghemrawi R*, Coelho D, Dreumont N, **Mosca P**, Hergalant S, Gauchotte G, Sequeira JM, Ndongue M, Houlgatte R, Alberto JM, Umoret R, Robert A, Paoli J, Jung M, Quadros E, Guéant JL(2018)

Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR

Nucleic Acids Research doi: 10.1093/nar/gky634

(Annexe 1)

2. **Mosca P**, Leheup B, Dreumont N (2019)

Nutrigenomics and RNA methylation: role of micronutrients

Biochemistry doi: 10.1016/j.biochi.2019.07.008

(Annexe 2)

3. Ravel JM, Dreumont N, **Mosca P**, Smith D, Mendes M, Wiedemann A, Coelho D, Philippe C, Tran-Mau-Them F, Thevenon J, Kuentz P, Fuchs S, Kok G, Thauvin C, Guéant JL, Salomons G, Faivre L, Feillet F

Bi-allelic pathogenic variants in *SARS1* cause neurodevelopmental delay, deafness, cardiomyopathy and decompensation during fever due to partial loss-of-function.

Soumis à Human Mutation

(Annexe 3)

Résumé : Les aminoacyl ARNt synthétases sont des enzymes exprimées de manière ubiquitaire et responsables de la liaison des acides aminés à leur molécule d'ARNt suite à une réaction d'aminocyclation. L'ARNt aminoacylé est ensuite utilisé par le ribosome lors de l'élongation pour la synthèse protéique. La sérine-ARNt-synthétase (SeRS) est une enzyme cytosolique, codé par le gène *SARS1*, qui catalyse la réaction d'aminocyclation d'une sérine sur son ARNt.

Nous rapportons le cas d'une famille avec consanguinité porteuse d'une mutation homozygote dans le gène *SARS1*. Cette mutation est associée à de l'épilepsie, une hypertrophie cardiaque, une surdité congénitale et une déficience intellectuelle. Nous

avons mis en évidence la mutation c.638G>T, p.Arg213Leu dans le gène *SARS1*. Cette mutation entraîne une sous-expression de la protéine SeRS et affecte son activité enzymatique.

Dans ce projet, j'ai réalisé la culture des fibroblastes des patients, et participé à la caractérisation fonctionnelle du variant : étude de l'impact du variant sur l'épissage de la région touchée, niveau d'expression de la protéine mutée.

4. **Mosca P**, Robert A, Meyer M, Alberto JM, Coelho D, Guéant JL, Leheup B, Dreumont N.

Altered m⁶A mRNA methylation following vitamin B12 deficiency and contribution to cerebral malfunctions.

En préparation pour soumission à Mol Nutrition Food Research en 2021

5. Willekens J, **Mosca P**, Dimofski P, Alberto JM, Renaud M, Lambert L, Leheup B, Guéant JL, Leininger B, Dreumont N.

Interplay between miRNAs and histone methylation to protect male progeny in the cerebellum following a gestational methyl donor deficiency.

En préparation pour soumission à Epigenetics en 2021

Liste des communications

1. **Mosca P**, Alberto JM, Guéant JL, Leheup B, Dreumont N
m⁶A mRNA methylation in a cellular model deficient for vitamin B12
Congrès SiFR ARN Nancy 2018 - Poster
2. **Mosca P**, Alberto JM, Guéant JL, Leheup B, Dreumont N
m⁶A mRNA methylation in a cellular model deficient for vitamin B12
The non-coding genome, institut Curie Paris 2019 – Poster
3. **Mosca P**, Alberto JM, Guéant JL, Leheup B, Dreumont N
m⁶A mRNA methylation in a cellular model deficient for vitamin B12
FHU CARTAGE et ARRIMAGE Nancy 2019 – Flash Talk
4. **Mosca P**, Alberto JM, Guéant JL, Leheup B, Dreumont N
m⁶A mRNA methylation in a cellular model deficient for vitamin B12
EMBL/EMBO The complex life of RNA Heidelberg 2020 – Poster
5. **Mosca P**, Alberto JM, Guéant JL, Leheup B, Dreumont N
Conséquences d'une carence en vitamine B12 sur la méthylation m⁶A des ARNm
FHU ARRIMAGE Nancy 2020 – Présentation orale

Introduction

Chapitre 1 : Les vitamines B9 et B12 et le métabolisme des monocarbone

1 Rôle des vitamines B9 et B12

1.1 La vitamine B9

La vitamine B9, ou acide folique, est une vitamine essentielle qui doit être apportée par l'alimentation. On la retrouve dans les légumes verts (épinards, brocolis, haricots verts ...), les graines (maïs, pois chiche ...) et dans le foie animal. L'OMS recommande une prise journalière de 0,4 mg en folates.

L'anémie de Biermer, aussi appelée anémie pernicieuse, est une anémie macrocytaire qui ne réagit pas aux traitements mis en place pour d'autres anémies. En 1931, Lucy Wills a montré que cette anémie, notamment chez la femme enceinte, pouvait être corrigée par une forte consommation de légumes et de levure (Wills, 1931). Ce n'est que 10 ans plus tard que l'acide folique fût décrit, après une extraction à partir des épinards (Mitchell et al., 1988). C'est alors que le Dr Spies démontra que la vitamine B9 était la molécule responsable de la rémission des anémies pernicieuses par la consommation de légumes et de levure préconisée par le Dr Wills (Spies, 1946).

La vitamine B9 est un folate. Ce terme est utilisé pour caractériser des molécules composées d'un anneau ptéridine pouvant être réduit ou oxydé, d'un acide para-aminobenzoïque (PABA) et d'une chaîne variable de polyglutamate servant à la localisation de la molécule dans la cellule (Figure 1)(Ducker and Rabinowitz, 2017; Fowler, 2001).

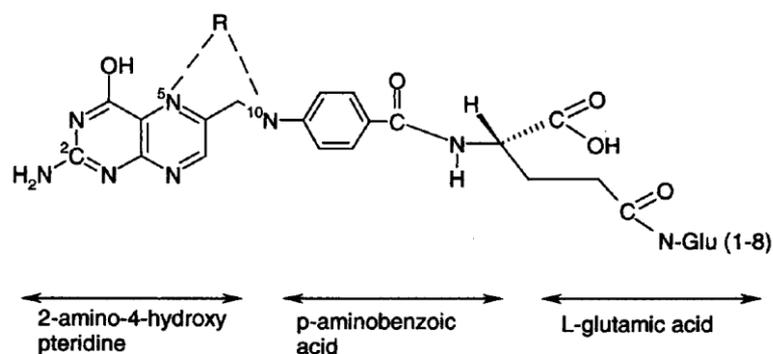


Figure 1 : Structure de l'acide folique.

La vitamine B9 est hydrosoluble. Elle est hydrolysée et absorbée par les entérocytes dans le duodénum et le jéjunum (Visentin et al., 2014). L'absorption se fait en fonction du pH : plus le pH est faible, plus l'absorption est favorisée (dans l'estomac par exemple).

Les polyglutamates des folates contenus dans l'alimentation doivent être hydrolysés par la glutamate carboxypeptidase II (GCPII), une exopeptidase de la bordure en brosse des intestins (Guéant et al., 2013a). Les monoglutamates sont ensuite absorbés par le transporteur PCFT (*proton coupled folate transporter*) qui est une pompe à protons. Ce transport représente le mécanisme physiologique de transport des folates à travers la bordure en brosse de l'intestin grêle (Qiu et al., 2006). Ensuite, les folates sont pris en charge par les RFC (*reduced folate carrier*) qui sont des transporteurs cytoplasmiques. Ils sont exprimés dans tous les tissus et transportent les folates dans la circulation systémique en conditions physiologiques. Ils sont notamment exprimés dans les épithéliums intestinaux suggérant un rôle dans le transport vectoriel des folates (Wang et al., 2001). Un autre moyen pour les folates de rejoindre la circulation est le transport par les *folate receptor* (FR), ils sont alors internalisés par endocytose (Figure 2) (Guéant et al., 2013a).

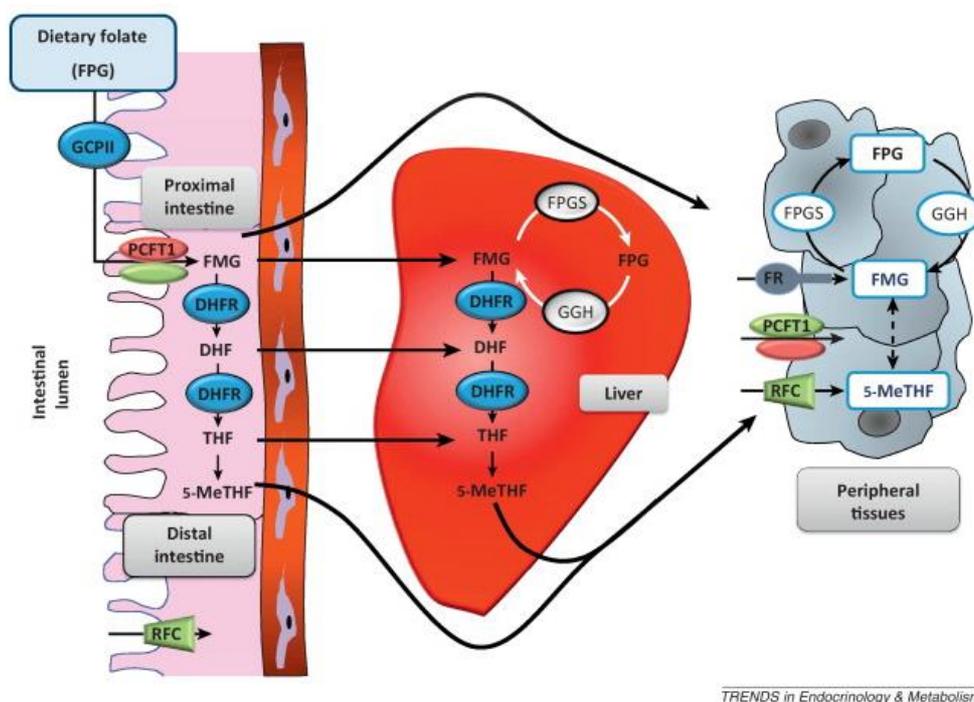


Figure 2 : Transport et absorption des folates (d'après (Guéant et al., 2013a)).

Les polyglutamates de folate (FPG) sont hydrolysés en monoglutamates (FMG) par la glutamate carboxypeptidase II (GCPII). Les monoglutamates sont absorbés par le transporteur PCFT (proton coupled folate transporter). Dans le foie, on retrouve les récepteurs RFC (reduced folate carrier), FR (folate receptor) et PCFT1. DHFR : dihydrofolate reductase, THF : tétrahydrofolate, 5-me-THF : 5-méthyle tétrahydrofolate, GGH : γ -glutamyl hydrolase.

Les folates sont stockés dans le foie sous forme de 5-méthyle-tétrahydrofolate (5-me-THF) et éliminés dans les selles et les urines. Au niveau moléculaire, ils sont importants pour le bon fonctionnement du métabolisme des monocarbones, c'est-à-dire pour la synthèse de certains acides aminés, des purines et pour le transfert d'un groupement méthyle au cycle de la méthionine (1.3)(Guéant et al., 2013a). La vitamine B9 est souvent étudiée de pair avec la vitamine B12 puisque cette dernière est le cofacteur de la méthionine synthase.

1.2 La vitamine B12

La vitamine B12 (ou cobalamine) a également été découverte en réponse à l'anémie pernicieuse. Cette dernière a pu être corrigée par la consommation de foie en 1926 (prix Nobel de médecine attribué au Dr Whipple en 1934). Ce n'est que des années plus tard que la vitamine B12 a été révélée comme étant l'un des facteurs clés des rémissions de ces anémies. Cette découverte a été suivie par la cristallisation de cette vitamine par le Dr Hodgkin (prix Nobel de chimie en 1964). Par ailleurs, les Dr Castle et Gräsbeck ont découvert et caractérisé le facteur intrinsèque (FI), indispensable à la bonne absorption de la cobalamine en 1965 (Gräsbeck et al., 1965).

La vitamine B12 a une structure proche de l'hème, avec un atome de cobalt central à la place de l'atome de fer. Elle est composée d'un noyau corrine et de deux chaînes axiales, l'une d'entre elles étant variable et définissant la forme de la vitamine (Figure 3). En effet, la vitamine B12 existe sous 4 formes différentes ; l'hydroxy-cobalamine qui est la forme inactive transportée dans les cellules, la méthyle-cobalamine qui est la forme cytoplasmique, notamment utilisée dans le métabolisme des monocarbones, l'ado-cobalamine qui est la forme mitochondriale et la cyano-cobalamine qui est une forme synthétique (Watkins and Rosenblatt, 2011).

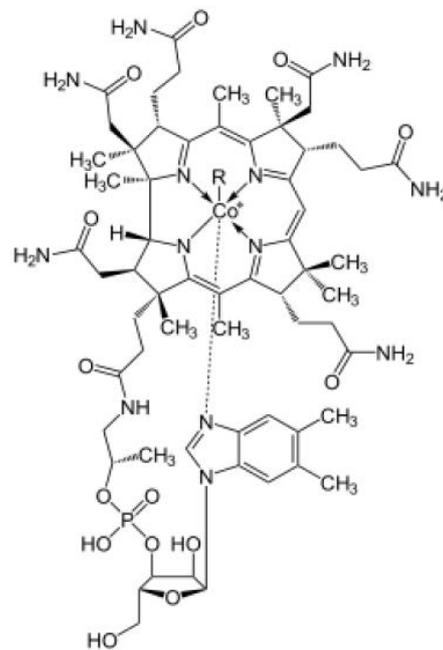


Figure 3 : Structure de la vitamine B12.

La vitamine B12 est constituée d'un atome central de Cobalt formant un noyau tétrapyrrolique. Un radical libre (R) se situe au niveau de l'extrémité supérieure du noyau corrine et permet les différentes formes de cobalamine : Ado-cbl (ado-cobalamine), Me-cbl (méthyle-cobalamine), OH-cbl (hydroxy-cobalamine) et CN-cbl (cyano-cobalamine).

La cobalamine est apportée par l'alimentation, son apport journalier varie entre 2 et 6 μg . Dans l'organisme, l'absorption de la vitamine B12 dépend d'une série de Cobalamine-*Binding Proteins* et de leurs récepteurs. La cobalamine arrive, pour la plupart du temps, couplée dans l'organisme à des protéines et est transférée au niveau de l'estomac, dans un environnement acide. Elle sera libérée par la pepsine et la gastrine puis couplée à l'haptocorrine. Elle sera ensuite transportée dans l'intestin grêle, l'haptocorrine sera dégradée par les protéases pancréatiques et la cobalamine sera alors couplée au facteur intrinsèque. Ce dernier sera reconnu par le récepteur CUBAM au niveau des entérocytes de l'iléum, pour permettre l'absorption par endocytose de la cobalamine. Cette dernière traversera ensuite le système porte et sera transportée dans le sang couplée à la transcobalamine (TC), dégradée par les lysosomes une fois la cobalamine délivrée dans la cellule (Figure 4) (Watkins and Rosenblatt, 2011). C'est à ce niveau que la vitamine B12 pourra exercer son rôle de cofacteur de la méthionine synthase dans le métabolisme des monocarbone (Figure 5).

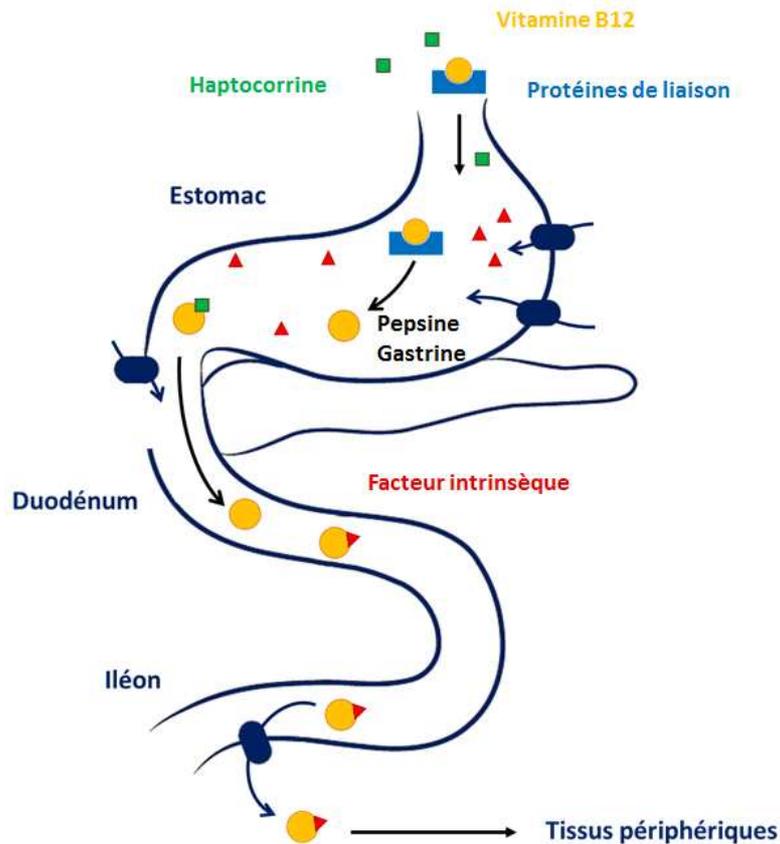


Figure 4 : Transport et absorption de la vitamine B12 (D'après la thèse de J. Willekens 2018).

Dans l'organisme, la vitamine B12 est apportée par l'alimentation complexée à des protéines de transport. Les enzymes digestives vont les dégrader. La cobalamine sera ensuite couplée à l'haptocorrine. Dans le duodénum, la vitamine B12 se complexe avec le facteur intrinsèque. Au niveau de l'iléon, le complexe B12-facteur intrinsèque est finalement absorbé par les entérocytes pour rejoindre le système porte.

1.3 Le métabolisme des monocarbone

Le métabolisme des monocarbone a principalement lieu dans le cytoplasme. Il est composé de 2 cycles principaux : le cycle des folates et le cycle de la méthionine, couplés à la synthèse du glutathion (Figure 5). Il est impliqué dans la synthèse des nucléotides et le métabolisme des acides aminés.

Dans le cycle des folates, les folates sont réduits en tétrahydrofolates et méthylés en 5-me-THF grâce au groupement méthyle libéré par la conversion d'une sérine en glycine. Le 5-me-THF est par la suite utilisé pour la production de méthionine *via* une réaction de méthylation de l'homocystéine. La vitamine B12 est le cofacteur de la méthionine synthase, enzyme responsable de la conversion de l'homocystéine en

méthionine. Cette réaction est particulièrement importante car une accumulation de l'homocystéine est un facteur de risque pour des maladies cardiovasculaires et neurologiques (Moretti and Caruso, 2019; Refsum et al., 1998). La méthionine est ensuite convertie par la méthionine-adénosyl-transférase (MAT) en S-adénosyl méthionine (SAM), qui est le donneur universel de groupement méthyle. La SAM est une molécule indispensable pour les réactions de méthylation de l'ADN, des protéines, des lipides et des ARN. Elle est ensuite convertie en SAH (S-adénosyl homocystéine), le précurseur de l'homocystéine (Salbaum and Kappen, 2012). Une diminution de la quantité de SAM, et/ou une altération du *ratio* SAM/SAH (l'indice de méthylation) a été associée à des altérations épigénétiques et épigénomiques (Guéant et al., 2013a; Mentch and Locasale, 2016).

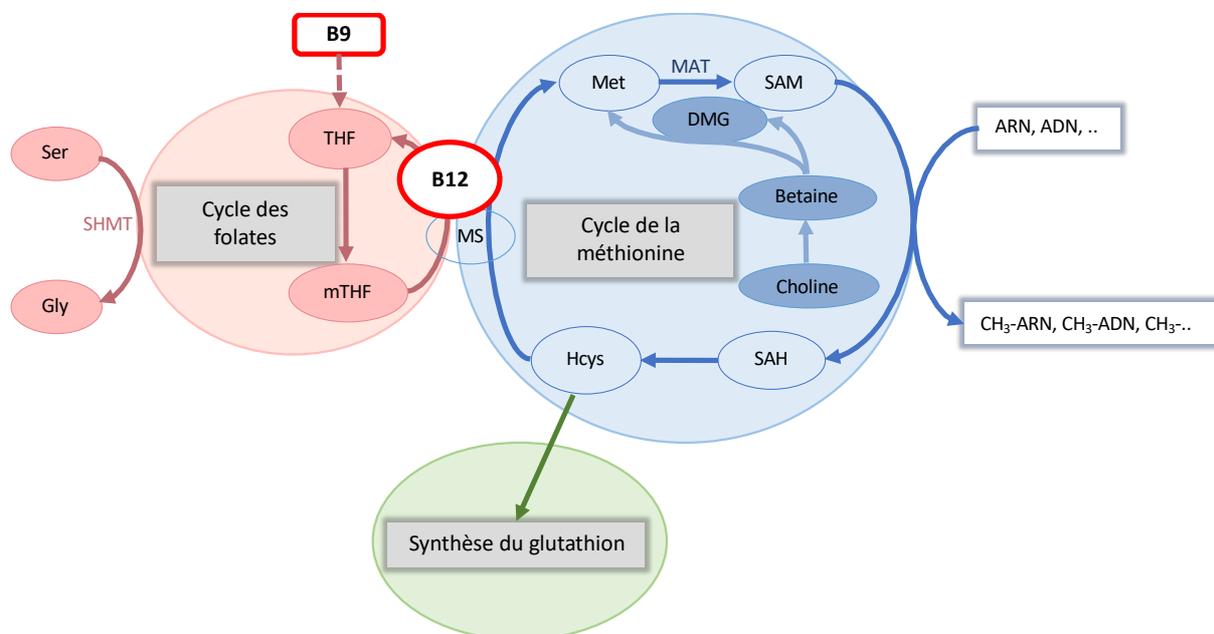


Figure 5 : Le métabolisme des monocarbone (d'après (Locasale, 2013)).

La vitamine B12 est le cofacteur de la méthionine synthase (MS). Ces molécules se trouvent à l'interface du cycle de la méthionine et du cycle des folates. Le cycle des folates apporte le groupement méthyle qui permet la conversion de l'homocystéine (Hcys) en méthionine (Met). La méthionine est le précurseur de la S-adénosyl méthionine (SAM) qui permettra la méthylation des molécules telles que l'ADN ou l'ARN. La perte du groupement méthyle produit la S-adénosyl homocystéine (SAH), précurseur de l'homocystéine. Ser : Sérine ; Gly : Glycine ; SHMT : sérine hydroxyméthyle transférase ; THF : tétrahydrofolate ; mTHF : 5-méthyle tétrahydrofolate ; MAT : méthionine adénosyl transférase ; DMG : diméthyle glycine.

2 Les carences en vitamine B9 et B12

2.1 Effet d'une carence au niveau physiologique

Chez l'adulte, une carence en vitamine B9 est associée au développement d'anémie, mais également à un risque accru de développer des maladies chroniques telles que le cancer, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives (Guéant et al., 2013b).

La vitamine B12 étant quant à elle exclusivement apportée par une alimentation d'origine animale, les carences touchent notamment les personnes ayant une alimentation végétane mais également les femmes enceintes (pour lesquelles les besoins sont augmentés) ainsi que les personnes âgées (qui développent des problèmes d'absorption des nutriments). Les carences en cobalamine provoquent principalement des désordres au niveau hématologique (anémie pernicieuse), cardiaque et neurologique (Guéant et al., 2013b).

2.1.1 Carence et cancer

La carcinogenèse a été mise en lien avec un faible niveau de folate induisant des cassures de l'ADN par incorporation d'uracile (Berger et al., 2008). En effet, la carence induit un stress thymidilate qui (1) favorise l'incorporation de dUMP (molécule proche structurellement de dTMP) (2) et induit un défaut du mécanisme de réparation BER (*base excision repair*). Par ailleurs, le métabolisme des monocarbones étant perturbé en cas de carence, la méthylation de l'ADN se trouve également affectée. Ces deux mécanismes favorisent l'apparition des cancers colorectaux, pancréatiques, ovariens, du sein, du col de l'utérus, des poumons et du cerveau (Duthie, SJ, 2011).

2.1.2 Carence et maladies cardiovasculaires

Une carence en vitamine B9 et B12 va perturber l'indice de méthylation du métabolisme des monocarbones et donc la méthylation de certaines cibles. Il a été montré que le niveau de méthylation d'enzymes d'acétylation va être perturbé, induisant des dérégulations de l'expression de certains gènes qui vont provoquer des dysfonctions vasculaires (Kalea et al., 2018). Cette carence a également pour conséquence une accumulation de l'homocystéine (Figure 5). Une hyperhomocystéinémie a été associée à de l'hypertension, ainsi qu'à des maladies cardio- et cérébro-vasculaires (Blom and Smulders, 2011). En effet, c'est en 1969 que le Dr

Kilmer McCully a découvert les méfaits de l'homocystéine après un dosage des métabolites dans le sang de deux patients qui présentaient des lésions vasculaires (McCully, 1969). Au laboratoire, il a été montré que cette hyper-homocystéinémie est responsable du dysfonctionnement systolique du ventricule gauche (Guéant-Rodriguez et al., 2007). Il a également été montré que la carence en donneurs de méthyles peut être responsable d'une malformation du myocarde. En effet, on retrouve un myocarde plus épais, induisant une augmentation de la taille des cardiomyocytes responsable d'hypertrophie cardiaque (Garcia et al., 2011). Plus récemment, il a été montré qu'une concentration élevée de SAH dans le plasma est corrélée à un risque accru de développer une coronaropathie (Huang et al., 2017). D'ailleurs, un défaut génétique (mutation hétérozygote de la protéine kinase G1) causant une pathologie aortique peut être corrigé par la prise d'un analogue de la vitamine B12 : la cobinamide (Schwaerzer et al., 2019).

Par ailleurs, une supplémentation en vitamine B9 et B12 permet de diminuer le risque de développer des troubles cardio-vasculaires (Schnyder et al., 2001, 2002) et plus précisément, une supplémentation en folate permet de diminuer le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) de 10% et le risque de développer une maladie cardio-vasculaire de 4% (Li et al., 2016b).

2.2 Carence et troubles neurologiques

Le défaut neurologique le plus décrit en cas de carence en acide folique est la mauvaise fermeture du tube neural chez le fœtus, menant à une *spina bifida*. En 1976, il a été montré qu'une carence en micronutriments (notamment en folate) dans le sérum des femmes enceintes était associée à des malformations du tube neural pendant le premier trimestre de grossesse (Smithells et al., 1976). De nos jours, les femmes enceintes devraient être supplémentées dès qu'elles énoncent un désir d'enfant et pendant le premier trimestre de leur grossesse (Wallingford et al., 2013). Il a également été montré qu'une carence en folate dans les spermatozoïdes du père augmente le risque de développement d'une *spina bifida* pour le fœtus (Ngo et al., 2010). Cette observation permettrait d'expliquer le manque de résultat d'une supplémentation en folate de certaines femmes enceintes (Safi et al., 2012).

Par ailleurs, la carence en folate, qui augmente le taux d'homocystéine dans le sang, conduit à une diminution de la prolifération de progéniteurs neuronaux dans le gyrus denté, ce qui affecte les capacités d'apprentissage et de mémorisation (Kruman et al.,

2005). Il a également été montré qu'une carence en vitamine B9 affecte les fonctions cellulaires des cellules neurales *via* des effets épigénomiques ainsi qu'une augmentation de la N-homocystéinylation de protéines neurales (Akchiche et al., 2012; Kruman et al., 2005; Zhang et al., 2009). L'effet bénéfique d'une supplémentation en vitamine B9 sur la neurogenèse *via* la méthylation de l'ADN a également été publié (Iskandar et al., 2010).

Par ailleurs, un faible niveau de 5-me-THF dans le fluide cébrospinal est responsable du syndrome de déficience en folate au niveau cérébral chez l'homme. Les patients présentent un défaut de transport des folates à travers la barrière sang/cerveau menant à des défauts de myélinisation et donc à des troubles du développement et du comportement (Pérez-Dueñas et al., 2011).

De plus, une déficience précoce en donneurs de méthyles a été associée à des défauts du comportement. Il a été montré que 21 jours après la naissance (J21), des rats nés d'une mère carencée en vitamine B9, B12, B2 et en choline 1 mois avant l'accouplement et jusqu'au sevrage présentaient une accumulation d'homocystéine dans les neurones et les astrocytes, au niveau de l'hippocampe, le cervelet et le striatum, provoquant l'entrée en apoptose des cellules. Malgré un retour à une alimentation normale, ces observations ont également été faites à J80. Les structures cérébrales impliquées sont importantes pour les fonctions motrices mais également mnésiques, ce qui explique les défauts de comportements observés (Blaise et al., 2007). Une hyperhomocystéinémie due à un régime B12 déficient a également été montrée comme responsable de défaut de perception de l'espace et de la mémoire chez des souris (Troen et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré qu'une exposition brève à l'hypoxie à la naissance pouvait prévenir les défauts comportementaux dus à une carence en vitamine B12 chez le rat (Martin et al., 2010).

Enfin, il a été montré que les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une carence en vitamine B12 (Román et al., 2019). Certains patients sont génétiquement prédisposés à développer cette maladie neurodégénérative (mutation du gène *MTHFR* (*méthyle tétrahydrofolate réductase*)), l'équipe de Roman *et al.* a pu montrer qu'une supplémentation en vitamine B12 chez ces patients est critique pour prévenir l'avancée de la maladie. Il en serait de même pour la maladie de Parkinson (McCarter et al., 2020). En effet, un faible niveau de vitamine B12 a été associé à une perte des capacités ambulatrices et une perte de la mémoire plus rapide (McCarter et al., 2019).

Carence dues à un défaut génétique

Il existe également des défauts génétiques qui peuvent toucher chacune des étapes du métabolisme intracellulaire de la cobalamine, aussi bien dans le cytoplasme que dans la mitochondrie, et ainsi engendrer une carence en vitamine B12 (Figure 6).

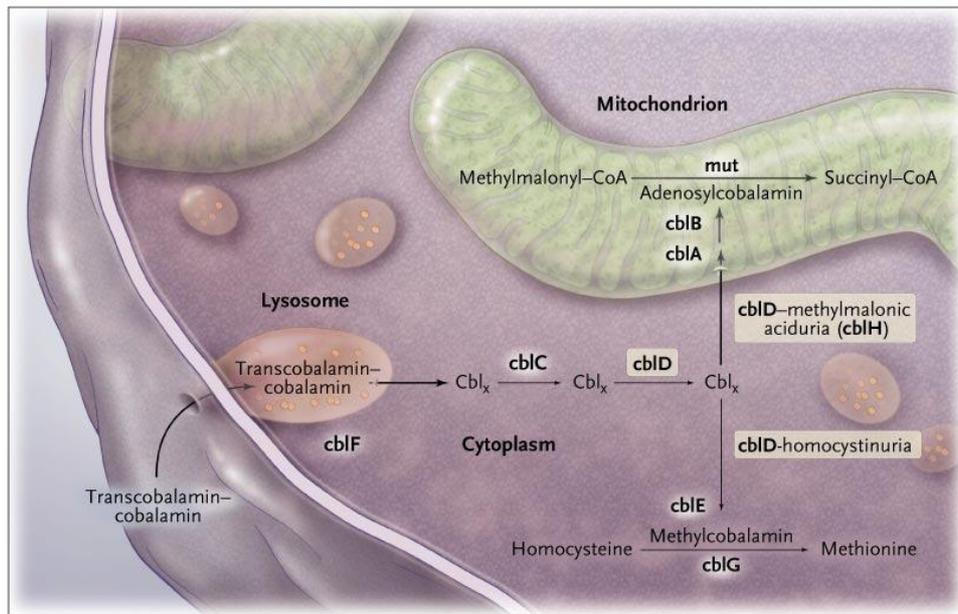


Figure 6 : Les défauts du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 (d'après (Coelho et al., 2008)).

La cobalamine est transportée dans la cellule liée à la transcobalamine. Les patients CblF et CblJ présentent un défaut au niveau de la libération de la vitamine B12 dans le cytoplasme. Les patients CblC, CblD, et CblE ont des défauts au niveau de la conversion de l'hydroxycobalamine en méthylecobalamine ou ado-cobalamine. Les patients CblB et CblA ont un défaut au niveau du métabolisme mitochondrial de la cobalamine et les patients CblG ont une déficience en méthionine synthase, enzyme clé de la conversion de l'homocystéine en méthionine.

A ce jour, 9 groupes ont été recensés :

- cblF : défaut du transport de la cobalamine par les lysosomes jusqu'au cytoplasme
- cblC et cblD : défaut des étapes entre le relargage par les lysosomes et la réduction de la cobalamine en méthylecobalamine (encore peu décrits)
- cblD-homocystinurie : défaut de transport vers le cycle de la méthionine
- cblE : déficience en méthionine réductase
- cblG : déficience en méthionine synthase

- cblH : défaut de transport vers la mitochondrie
- cblA et cblB : défaut du métabolisme de la cobalamine dans la mitochondrie.

La plupart des gènes responsables des défauts présentés sur la Figure 6 sont connus, à l'exception des gènes responsables des défauts cblD, cblF et cblH (Coelho et al., 2008). Les conséquences sont très variées : on observe des troubles de la vigilance avec léthargie, une hypotonie, un retard du développement, une épilepsie et une anémie (Coelho et al., 2008).

3 Effets d'une carence en vitamines B9 et B12 au niveau cellulaire et moléculaire

3.1 Les modèles d'étude disponibles au laboratoire

3.1.1 Les modèles animaux

Les modèles génétiques : le modèle des souris Cd320^{-/-}

Nous disposons au laboratoire d'un modèle de souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas le récepteur CD320. Il a été développé dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Quadros (*State University of New York, NY*) et consiste en une invalidation du gène codant pour le récepteur CD320, responsable de l'internalisation de la vitamine B12 dans les cellules, notamment au niveau du cerveau (Figure 6). La carence est visible uniquement au niveau cérébral. Les souris Cd320^{-/-} présentent une hypo-méthylation globale de l'ADN (Lai et al., 2013), ainsi que des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation, avec notamment une altération de la voie de signalisation du récepteur aux glucocorticoïdes (Dreumont et al., 2020). On retrouve également dans les tissus cérébraux de ces souris, la délocalisation de certaines RBPs telles que HuR (Battaglia-Hsu et al., 2018).

Les carences nutritionnelles : le modèle MDD

Au laboratoire, un modèle de carence précoce en donneurs de méthyles a été développé : le modèle MDD (*methyl donor deficiency*). Dans ce modèle de carence nutritionnelle, des rates sont soumises à un régime déficient en donneurs de méthyles, notamment les vitamines B9 et B12, un mois avant l'accouplement puis pendant la gestation ainsi que la lactation. Il a été montré que les ratons développent une hyper-homocystéinémie, associée à un petit poids et une petite taille à la naissance qui

semble perdurer dans le temps (Blaise et al., 2005). Au niveau comportemental, les rats présentent un défaut de coordination motrice, de locomotion ainsi que des troubles de l'apprentissage et de la mémoire (Blaise et al., 2007; Pourié et al., 2015). Au niveau moléculaire, la plasticité synaptique est altérée dans le cervelet (Willekens et al., 2019). En effet, le régime MDD perturbe les modifications épigénomiques des récepteurs à œstrogène α ce qui provoque une altération de l'expression et de la phosphorylation des synapsines (Pourié et al., 2015).

3.1.2 Les modèles cellulaires

Les cellules de neuroblastome murin génétiquement modifiées : le modèle OT/TO

Un modèle cellulaire unique a été mis en place au laboratoire. Ce modèle est basé sur la transfection stable d'une protéine chimère dans des cellules de neuroblastome murin N1E-115. La protéine chimère est composée du récepteur avec la plus grande affinité pour la cobalamine, la transcobalamine, et de l'oléosine, protéine provenant des plantes (pour éviter toute interaction non spécifique), qui se lie au réticulum endoplasmique (Pons et al., 2009). Deux constructions ont été développées (Figure 7)

:

- la construction OT (contrôle) : la transcobalamine est fusionnée du côté C-terminal de l'oléosine. La protéine chimère n'est pas fonctionnelle, elle se lie au réticulum endoplasmique (RE) mais ne peut pas lier la vitamine B12, qui est disponible pour servir de cofacteur à la méthionine synthase dans le cytoplasme, et à la mutase dans la mitochondrie.
- la construction TO (conditions -B12) : la transcobalamine est fusionnée du côté N-terminal de l'oléosine. La protéine chimère est fonctionnelle, elle se lie au RE et lie la vitamine B12. Cette dernière est donc séquestrée sur le RE, diminuant les ressources en cobalamine de la cellule (Figure 7).

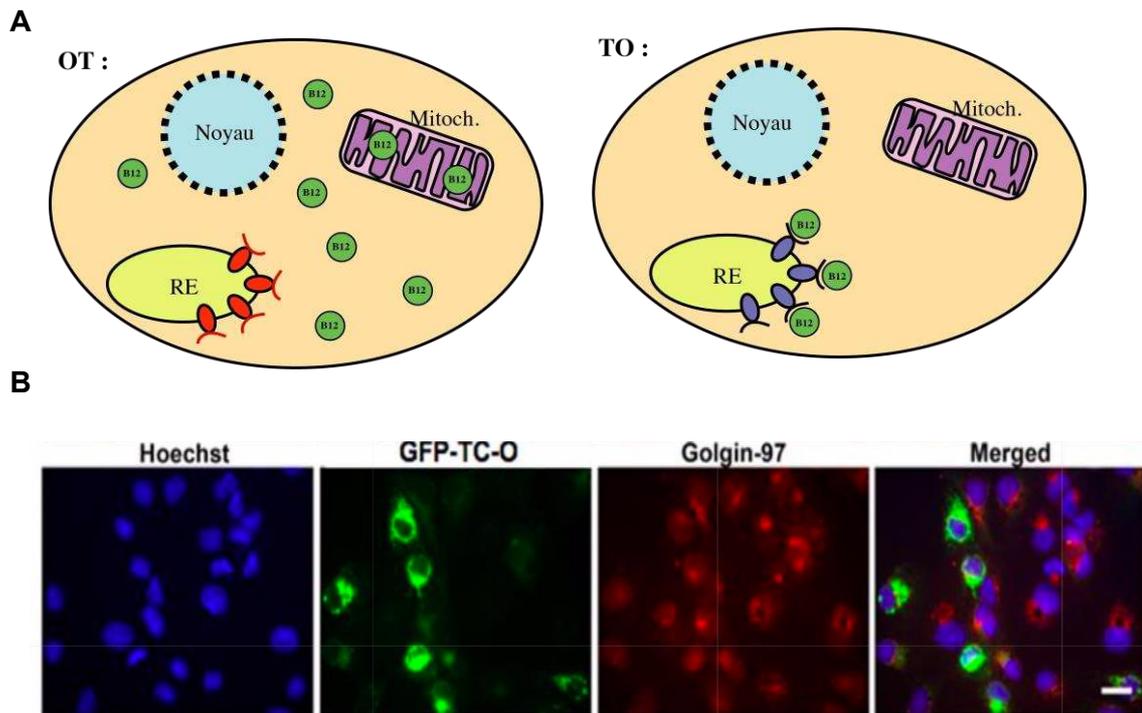


Figure 7 : Les lignées cellulaires OT/TO.

A. La lignée OT est transfectée avec une protéine chimère ne séquestrant pas la cobalamine qui reste disponible dans le cytoplasme et la mitochondrie. La lignée TO est transfectée avec une protéine chimère qui lie la vitamine B12 au réticulum endoplasmique. Il n'y a plus de disponibilité en vitamine B12 dans la cellule.

B. Dans la lignée TO, si on fusionne la GFP à la protéine chimère, on remarque que la GFP colocalise avec le réticulum endoplasmique (d'après (Pons et al., 2009)).

Ce modèle a déjà été utilisé au laboratoire. Il a notamment été montré qu'en cas de carence, certaines protéines de liaison à l'ARN (RBP) sont délocalisées. C'est le cas pour la protéine HuR, qui serait une *reader* de la modification m⁶A (Figure 8) (Battaglia-Hsu et al., 2018).

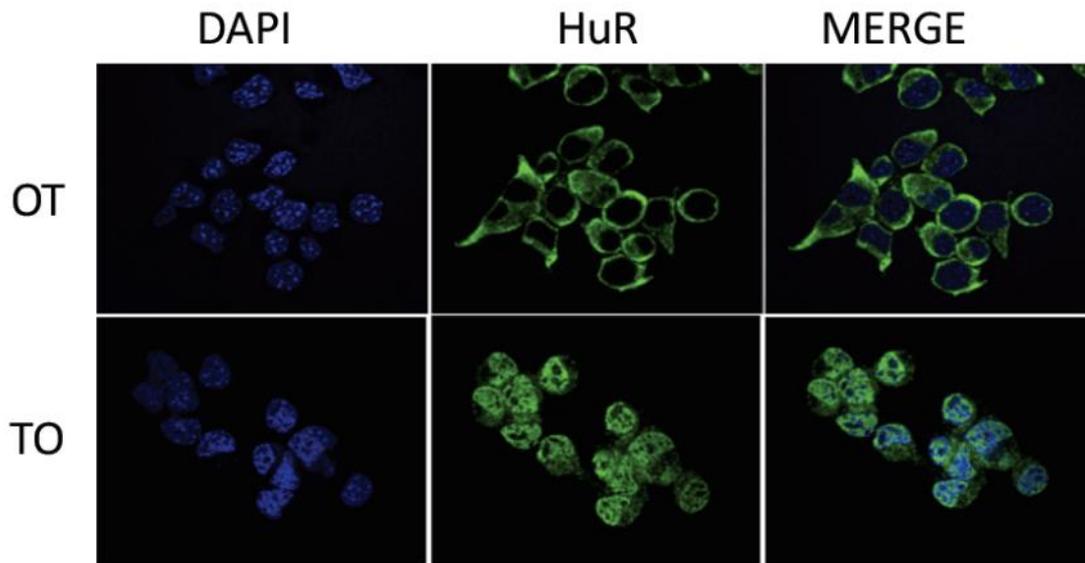


Figure 8 : Délocalisation de la protéine HuR. D'après (Battaglia-Hsu et al., 2018).

En cas de carence en vitamine B12 (TO) la protéine reader HuR est nucléaire alors qu'elle est cytoplasmique en condition contrôle (OT).

Les fibroblastes de patients atteints du défaut génétique CblG : le modèle de cellules humaines

Les fibroblastes sont des cellules provenant du même feuillet embryonnaire que les tissus neuronaux, l'ectoderme primitif. C'est pour cela qu'ils sont utilisés dans cette étude. Nous disposons au laboratoire de fibroblastes dits contrôles (pas de défauts liés au métabolisme de la cobalamine) ; et des fibroblastes de patients ayant le défaut CblG, défaut de l'activité de la méthionine synthase (avec une activité résiduelle). Ce défaut est retrouvé chez une cinquantaine de patients dans le monde, 41 mutations différentes ont été identifiées. Nous disposons également de fibroblastes de patients CblG* (cobalamine G variant), ces patients ne produisent pas la forme active de la méthionine synthase (Huemer et al., 2015).

Ces modèles d'étude disponibles au laboratoire nous permettent donc d'étudier les modifications épigénétiques et leurs perturbations suite à un défaut du métabolisme des monocarbone, induit par (1) une carence nutritionnelle ou (2) un défaut génétique, chez le rat, la souris et l'Homme.

3.2 Effets d'une carence au niveau cellulaire et moléculaire

Au niveau moléculaire, une carence en donneurs de méthyles, implique une altération de la synthèse de méthionine ainsi qu'une accumulation de l'homocystéine. Il a également été montré qu'une carence en vitamine B12 empêchait la croissance de cellules neuronales. Ces observations ont été faites dans la lignée de neuroblastome murin OT/TO génétiquement modifiée pour mimer une carence en vitamine B12 uniquement. La prolifération de ces cellules était diminuée (Battaglia-Hsu et al., 2009). En cas de carence en donneurs de méthyles, et notamment en vitamines B9 et B12, la production de SAM est perturbée, provoquant des modifications au niveau épigénétique et épigénomique. En effet, un défaut de cobalamine a été montré comme responsable d'une perturbation de la méthylation de l'ADN ; les îlots CpG (cytosine-phosphate-guanine) sont méthylés par les DNMT (*DNA methyltransferase*), qui ont besoin de la SAM comme cofacteur pour réguler l'expression des gènes (Glier et al., 2014). Il a été montré au laboratoire que la protéine SIRT1 (sirtuine 1), qui est une déacétylase, voyait son expression diminuer en cas de carence en vitamine B12. La diminution de l'expression de SIRT1 induit un défaut d'acétylation de la protéine HSF1 (*heat shock factor*) qui provoque un stress du réticulum endoplasmique (Ghemrawi et al., 2013). L'hyper-acétylation de cette dernière atténue la réponse aux *heat shock*, ce qui diminue l'activité des chaperones essentielles à la croissance cellulaire.

3.2.1 Une carence en vitamines B9 et B12 induit un défaut de localisation des RBP

Par ailleurs, il a été montré qu'une carence en cobalamine avait un impact sur la localisation de certaines RBPs, notamment des protéines HuR, HnRNPA1, SRSF1 et RBM10 (Battaglia-Hsu et al., 2018). En effet, ces protéines sont retrouvées dans le cytoplasme des fibroblastes de patients ayant un défaut du métabolisme de la cobalamine alors qu'elles sont décrites comme nucléaires. L'ajout de SAM ou de vitamine B12 dans le milieu de culture de ces cellules peut restaurer la localisation nucléaire de ces protéines. Les modifications post-traductionnelles de ces protéines ont été étudiées afin de découvrir la raison de leur délocalisation. L'inhibition de la méthylation n'entraîne pas de délocalisation des RBP dans les cellules contrôles. En revanche, il a été montré qu'un défaut du métabolisme de la cobalamine provoque une surexpression de la phosphatase PP2A (Battaglia-Hsu et al., 2009). Le traitement des cellules de patients ayant un défaut du métabolisme de la cobalamine à l'acide

okadaïque (inhibiteur de PP2A) restaure la localisation de la RBP HuR (Battaglia-Hsu et al., 2018). Cette étude a également été faite sur le modèle génétiquement modifié OT/TO mimant une carence en vitamine B12. Dans ces cellules, la protéine HuR est cytoplasmique dans la lignée contrôle et nucléaire dans la lignée carencée en vitamine B12 (Battaglia-Hsu et al., 2018). Ce défaut de localisation serait dû au stress cellulaire imposé par la pression de sélection.

3.2.2 Une carence en vitamines B9 et B12 induit un stress du RE

Des premières études avaient montré qu'une accumulation en homocystéine dans des cellules neuronales était responsable de dérégulation de la transcription de certains gènes, notamment *hsp70*, qui est sous-exprimée en cas d'exposition à l'homocystéine. Cette observation a été corrélée à une diminution de la stabilité de la protéine HSP70 qui est une protéine liée au stress du RE. Il a donc été admis qu'une accumulation d'homocystéine était responsable d'un stress du RE plus important, lui-même pouvant être une cause des pathologies observées en cas de carence en vitamines B9 et B12 (Althausen and Paschen, 2000). Il avait également été montré qu'une hyper-homocystéinémie induisait l'expression de la protéine Herp. Cette protéine va s'associer aux membranes du RE pour jouer son rôle de chaperone, elle est donc surexprimée en condition de stress du RE (Kokame et al., 2000). Plus tard, il a été montré que cette protéine est régulée par la synoviolin, une ubiquitine ligase du RE (Maeda et al., 2018), et qu'une sous-expression de Herp réduit l'hyper-homocystéinémie (Lin et al., 2018).

Par ailleurs, une hyper-homocystéinémie dans des hépatocytes est responsable d'une surexpression du cholestérol et de triglycérides *via* le stress du RE. En effet, une accumulation d'homocystéine induit un stress du RE responsable de l'activation des SREBPs (*sterol regulatory element binding protein*). L'activation de ces protéines augmente l'expression de gènes responsables de la synthèse des triglycérides et du cholestérol démontrant ainsi le rôle du stress du RE dans l'accumulation du cholestérol et donc l'impact d'une accumulation de l'homocystéine sur les hépatocytes (Werstuck et al., 2001).

Plus récemment, il a été montré qu'une inhibition du stress du RE par la tétraméthylpyrazine protège de l'hyper-homocystéinémie *via* les canaux BK_{CA} (Sun et al., 2019). Le sulfure d'hydrogène aurait également un rôle bénéfique sur le stress du RE induit par hyper-homocystéinémie dans des cellules musculaires (Majumder et al.,

2019). Enfin, l'intermedin¹⁻⁵³ inhiberait également le stress du RE et protégerait donc des effets de l'hyper-homocystéinémie notamment dans l'athérosclérose (Ren et al., 2020).

Pour conclure, nous avons pu montrer au laboratoire qu'au niveau moléculaire, une carence en vitamines B9 et B12 provoque d'une part, un défaut de localisation des RBP et d'autre part un stress du RE *via* une hyper-homocystéinémie. Ces deux effets pourraient expliquer au moins en partie les effets phénotypiques observés chez les patients carencés, notamment les troubles neurologiques et cardiovasculaires précédemment décrits.

Chapitre 2 : Les modifications épigénétiques, exemple des protéines histones

La perturbation du métabolisme des monocarbones par une carence en vitamines B9 et B12 a un impact sur l'indice de méthylation (rapport SAM/SAH) *via* notamment une diminution de la quantité de SAM, le donneur universel de groupement méthyle. La méthylation de nombreuses molécules peut modifier le phénotype des cellules de manière héréditaire, sans modifier la séquence d'ADN. Au laboratoire, il a été montré que les modifications post-traductionnelles de certaines protéines sont perturbées par la carence telles que la phosphorylation et/ou l'acétylation (Battaglia-Hsu et al., 2018). Il en est de même pour les protéines histones qui sont très sujettes à ce type de modifications, et qui permettent de réguler la compaction de la chromatine *via* une organisation en nucléosome, dans le but de favoriser ou réprimer l'expression des gènes.

1 Généralités

Les modifications épigénétiques sont des modifications dynamiques, c'est-à-dire qu'elles peuvent être transitoires, elles vont être médiées par des protéines qu'on appellera *writer* qui vont « écrire » la modification, une méthylation par exemple, et *eraser* qui vont « l'effacer », une déméthylation par exemple. Les modifications sont donc réversibles et elles ne modifient pas la séquence en nucléotides. Enfin, certaines modifications épigénétiques peuvent être transmises d'une génération à l'autre (Franzago et al., 2019). Ce caractère peut donner lieu à ce qu'on appelle la programmation fœtale ; l'exposition d'une mère à un risque environnemental (une carence en donneurs de méthyle par exemple) peut avoir des conséquences sur les modifications épigénétiques du génome de son enfant (une perturbation de la méthylation du génome) (Guéant et al., 2013a). Les 3 principaux mécanismes de l'épigénétique sont (1) la méthylation de l'ADN, notamment au niveau des îlots CpG, (2) les modifications post-traductionnelles des protéines, notamment des protéines histones, organisées en nucléosomes, elles permettent entre-autre la compaction/décompaction de la chromatine et (3) la régulation par les ARN non codants (miR par exemple) (Figure 9).

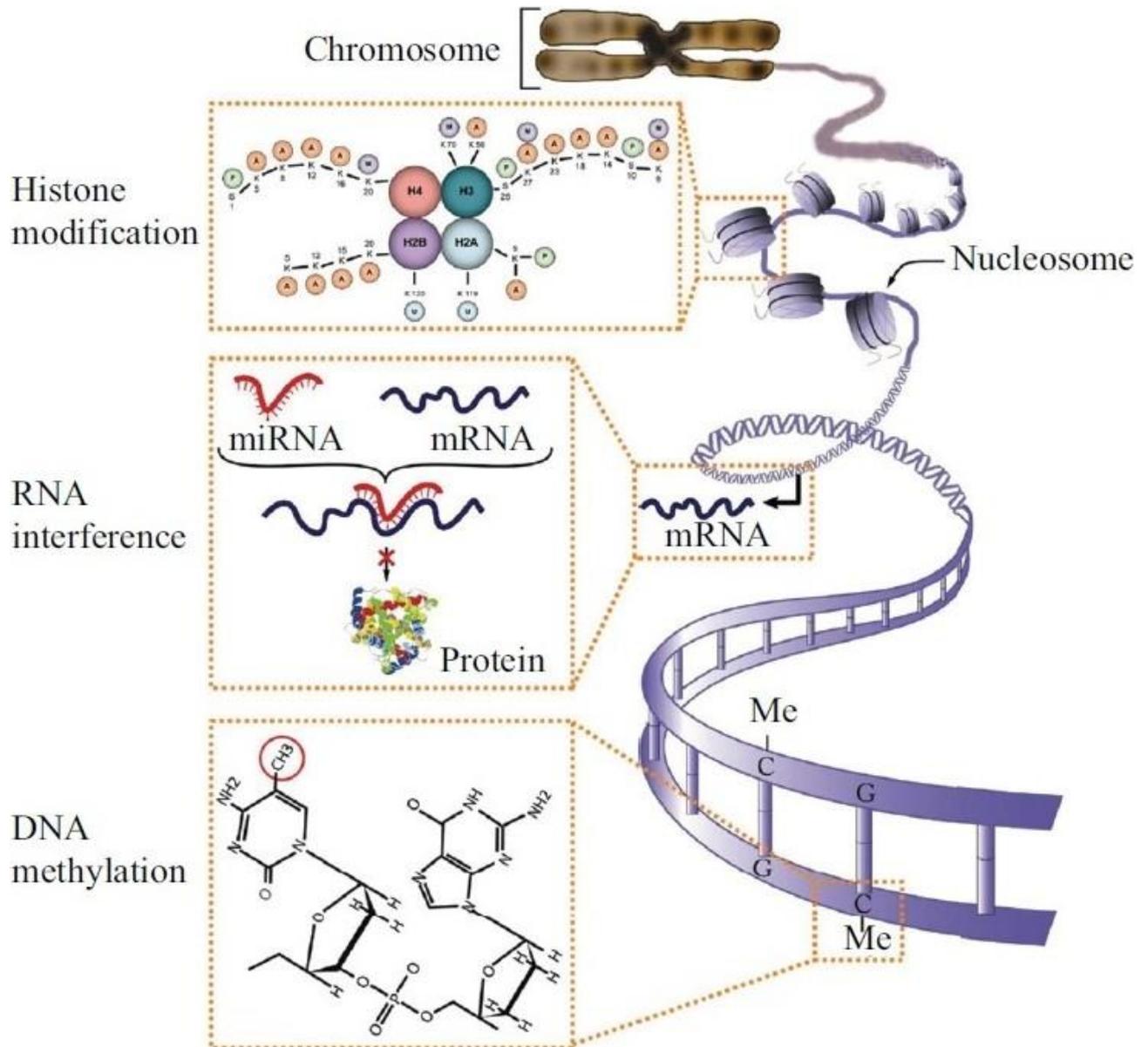


Figure 9 : Les modifications épigénétiques (Kim et al., 2011).

Il existe 3 types de modifications épigénétiques (1) les modifications des protéines histones qui modulent la compaction de l'ADN via leur organisation en nucléosome, (2) la régulation par les ARN non codants, ici est donné l'exemple des microARN qui vont cibler les ARNm et entrainer leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction, (3) la méthylation de l'ADN, les m^5C (5-méthyle cytosine) vont permettre également un remaniement de la chromatine ou le recrutement de facteurs de transcription.

2 Les modifications de l'ADN

La méthylation m^5C (5-méthyle cytosine) est la modification épigénétique la plus décrite. C'est la première modification mise en évidence dans le domaine de

l'épigénétique. Le Dr Ruppel l'a découverte en 1898 mais pensa d'abord à un nouvel acide aminé. Ce n'est que dans les années 1950 que le Dr Wyatt comprit qu'il s'agissait en fait d'une méthylation de la cytosine (Wyatt, 1950). Les m^5C sont souvent retrouvées dans les séquences répétées du génome, on parlera d'îlots CpG (Cytosine-Guanine, le « p » représente le phosphate entre les 2 nucléotides) méthylés (Figure 10).

2.1 Les îlots CpG

Les îlots CpG sont des portions de l'ADN qui contiennent une proportion 5 fois plus élevée de dinucléotides Cytosine-Guanine. La méthylation m^5C (Figure 10) est une marque épigénétique conservée entre les plantes et les animaux (Law and Jacobsen, 2010).

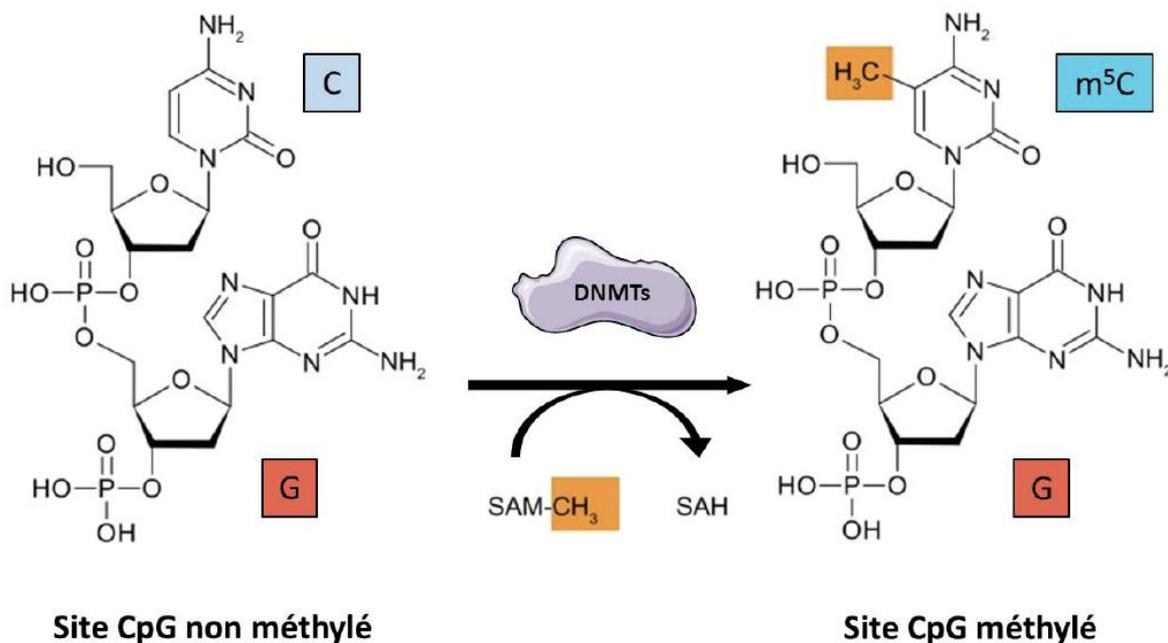


Figure 10 : La méthylation m^5C (d'après la thèse de Jérémy Willekens 2018).

Un site CpG est composé d'une cytosine reliée à une guanosine par une liaison phosphate. La cytosine va être méthylée par l'intermédiaire d'une DNA méthyltransférase (DNMT) qui va transférer le groupement méthyle de la SAM à la position 5 de la cytosine.

Chez l'homme, 6-8% des sites CpG présents au niveau des gènes neuronaux sont soumis à la méthylation (Illingworth et al., 2008). Les sites CpG sont retrouvés majoritairement au niveau des séquences répétées, dans les régions inter-géniques et au niveau des promoteurs (Law and Jacobsen, 2010). En règle générale, si le site

CpG est méthylé et qu'il se situe au niveau du corps d'un gène, l'expression du gène sera activée par le recrutement des facteurs de transcription (Yang et al., 2014). Au contraire, lorsque la méthylation des sites CpG se situe au niveau des promoteurs des gènes, ces régions se condensent en hétérochromatine et le recrutement des facteurs de transcription est inhibé, l'expression des gènes est donc réprimée (Shukla et al., 2011).

La méthylation CpG de l'ADN a un rôle important dans le développement du cerveau et la neurogenèse chez l'homme, elle est finement régulée pendant le développement du cerveau et la spécification des régions neurales (Ladd-Acosta et al., 2007). Le méthylome des neurones du gyrus denté de souris montre que 75% des méthylations sont des m⁵C (Guo et al., 2011). C'est la méthylation la plus présente dans les tissus neuronaux des mammifères, elle est notamment très importante pour la solidification de la mémoire (Song et al., 2011).

La méthylation des îlots CpG est une méthylation dynamique, qui se fait par l'intermédiaire de la SAM comme donneur de groupement méthyle et d'ADN méthyltransférases (DNMT) comme catalyseurs de la réaction.

2.2 Les ADN méthyltransférases (DNMT)

Il existe, chez les mammifères 3 DNMT principales en ce qui concerne la méthylation de l'ADN, DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (Lyko, 2018). L'activité catalytique de ces enzymes se trouve dans leur domaine C-terminal. Malgré leurs structures similaires, ces 3 DNMT possèdent un domaine N-terminal spécifique qui leur confère leur fonction dans la cellule (Jurkowska et al., 2011). DNMT1 est la méthyltransférase la plus active, elle est notamment impliquée dans la réparation des dommages liés à la méthylation de l'ADN. Elle est souvent considérée comme une méthylase d'entretien, son substrat étant l'ADN hémi-méthylé, elle intervient notamment lors de la réplication de l'ADN (Mortusewicz et al., 2005). DNMT3a/b sont quant à elles nécessaires lors des différentes étapes du développement et sont considérées comme des méthylases *de novo* (Okano et al., 1999) (Figure 11).

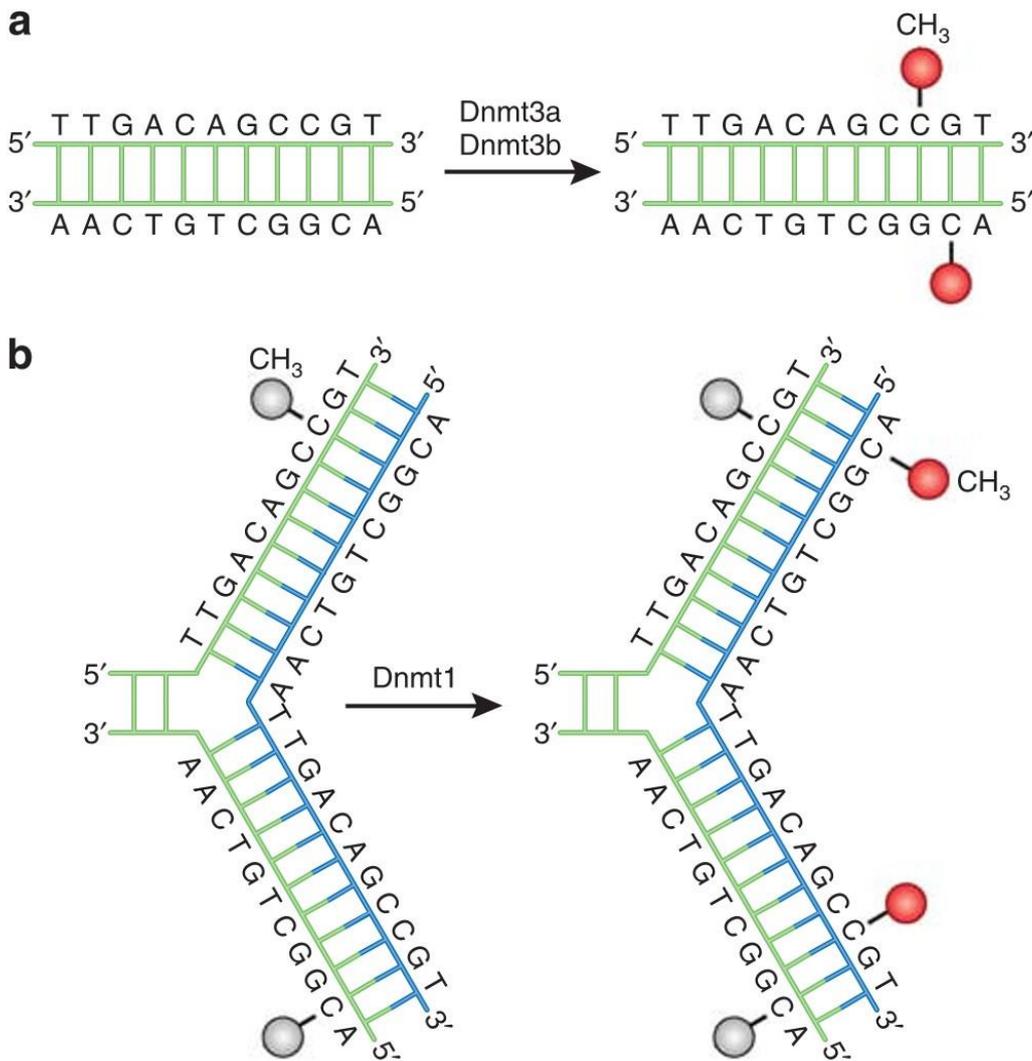


Figure 11 : Les ADN-méthyltransférases (DNMT)(Moore et al., 2013).

a. *Dnmt3a* et *Dnmt3b* méthylent de novo un brin d'ADN sur une cytosine.

b. *Dnmt1* méthyle le brin complémentaire lors de la réplication, c'est une méthylation d'entretien.

L'activité de ces enzymes est régulée par des modifications post-traductionnelles, notamment par la méthylation. Il a été montré que la méthylation de DNMT1 est responsable de sa dégradation. *A contrario*, la phosphorylation de cette dernière la protège contre la dégradation (Estève et al., 2009, 2011; Wang et al., 2009). Par ailleurs, la phosphorylation de DNMT3a favorise la méthylation de l'hétérochromatine (Deplus et al., 2014).

Le rôle principal de ces enzymes a longtemps été décrit comme étant l'inhibition de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN, notamment au niveau des promoteurs, la méthylation conduisant au remaniement de la chromatine (Klose and

Bird, 2006). Néanmoins, il a été montré que certains facteurs de transcription avaient plus d'affinité pour les séquences d'ADN méthylées, ce qui confère un rôle dans l'activation de la transcription à ces enzymes (Yin et al., 2017).

Les DNMT, et donc la méthylation de l'ADN, sont indispensables pour le développement embryonnaire. En effet, une déficience en DNMT1 ou DNMT3b chez la souris induit une létalité embryonnaire (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). De plus, une délétion de DNMT3a est responsable de défauts du développement notamment du syndrome de Heyn-Sproul-Jackson (MIM n°618724) et de Tatton-Brown-Rahman (MIM n°615879) (Okano et al., 1999). Chez l'homme, une mutation dans le gène de DNMT1 a été associée au développement de neuropathies telle que de la démence, de l'ataxie cérébelleuse (MIM n°04121) ou encore de la narcolepsie (MIM n°614116) (Klein et al., 2011).

2.3 La régulation par les ARN non codants

La méthylation de l'ADN est la modification épigénétique la mieux décrite car c'est la première à avoir été découverte. Aujourd'hui, d'autres phénomènes sont considérés comme des régulations épigénétiques, notamment la régulation par les ARN non codants. Les ARN interférents (ARNi) principaux sont divisés en 2 catégories selon leur taille, les micro-ARN (miR) et les long ARN non codants (lncRNA, aussi appelés lincRNA pour *long interfering non coding RNA*). Ils exercent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, notamment en interagissant avec les acides nucléiques par complémentarité des bases. Ce rôle leur confère leur caractère de régulateur épigénétique.

2.3.1 Les miR dans la régulation épigénétique

Les miR sont des petits ARN non codants, essentiels à la régulation de l'expression des gènes. Ils sont, en moyenne, composés de 22 nucléotides (Ha and Kim, 2014). En règle générale, les miR sont transcrits à partir de la séquence d'ADN par les ARN polymérases II ou III de manière co-transcriptionnelle (Ha and Kim, 2014). La moitié d'entre eux se trouvent dans les séquences introniques, mais on peut également les retrouver dans des séquences exoniques, intergéniques ou encore en *cluster* (Kim and Kim, 2007; de Rie et al., 2017; Tanzer and Stadler, 2004). Les miR sont transcrits sous forme de pri-miR (*primary micro RNA*), comportant une structure en tige boucle (Figure 12). Ils seront alors transformés en pré-miR (*precursor of micro RNA*) par un

complexe de protéines composé de la ribonucléase Drosha et de DGCR8 (*Digeorge syndrome critical region 8*) (Denli et al., 2004). DGCR8 reconnaît la m⁶A de la séquence cible GGAC des miR et Drosha va venir cliver le pri-miR au niveau de la tige du miR (Alarcón et al., 2015a). Le pré-miR généré sera alors transporté dans le cytoplasme *via* le complexe Exportin5/Ran/GTP et pris en charge par le complexe Dicer/TRBP qui va cliver la boucle du miR, afin de générer un miR mature en conformation double brin (Denli et al., 2004; Okada et al., 2009). Le complexe AGO composé des protéines Argonaute1-4 chez l'homme, choisira ensuite quel brin va être utilisé en tant que guide selon sa stabilité, l'autre brin sera dégradé (Figure 12) (Yoda et al., 2010). Il existe d'autres voies de biogenèse des miR, elles sont dites non canoniques et concernent notamment les miR présents dans les séquences introniques, ainsi que les miR qui possèdent une coiffe m⁷G. Ces voies ne mettent que partiellement en jeu les complexes Drosha/DGCR8, Dicer et AGO (Babiarz et al., 2008; Ruby et al., 2007; Xie et al., 2013; Yang et al., 2010).

Le complexe formé par AGO et le brin guide du miR constitue le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*), c'est ce dernier qui va cibler les séquences d'ARNm à réprimer (Yoda et al., 2010). L'interaction se fait par complémentarité de séquence et donne lieu à la dégradation de l'ARNm et du miR si la complémentarité des bases est parfaite (Jo et al., 2015) ou à l'inhibition de la traduction et/ou la déadénylation si la complémentarité des bases est imparfaite (Kato et al., 2015; Lund et al., 2009). Un rôle controversé des miR a également été documenté, il semblerait que dans certains cas, un miR permettrait la surexpression d'un gène. En effet, le miR let7 semblerait activer la traduction lors de l'arrêt du cycle cellulaire (Vasudevan and Steitz, 2007).

Par ailleurs, les miR peuvent également réguler la transcription des gènes, en étant transportés dans le noyau par l'Importin-8 ou l'Exportin-1 chez l'homme. Le complexe RISC peut s'associer à des loci actifs afin de les réprimer mais ce mécanisme reste encore très peu décrit (Cernilogar et al., 2011; Nishi et al., 2013).

Les miR ne sont pas les seuls ARN non codants à exercer une régulation de l'expression des gènes par interférence et donc complémentarité des bases. Les longs ARN non codants (lncRNA) possèdent également cette fonction permettant une régulation épigénétique de l'expression des gènes.

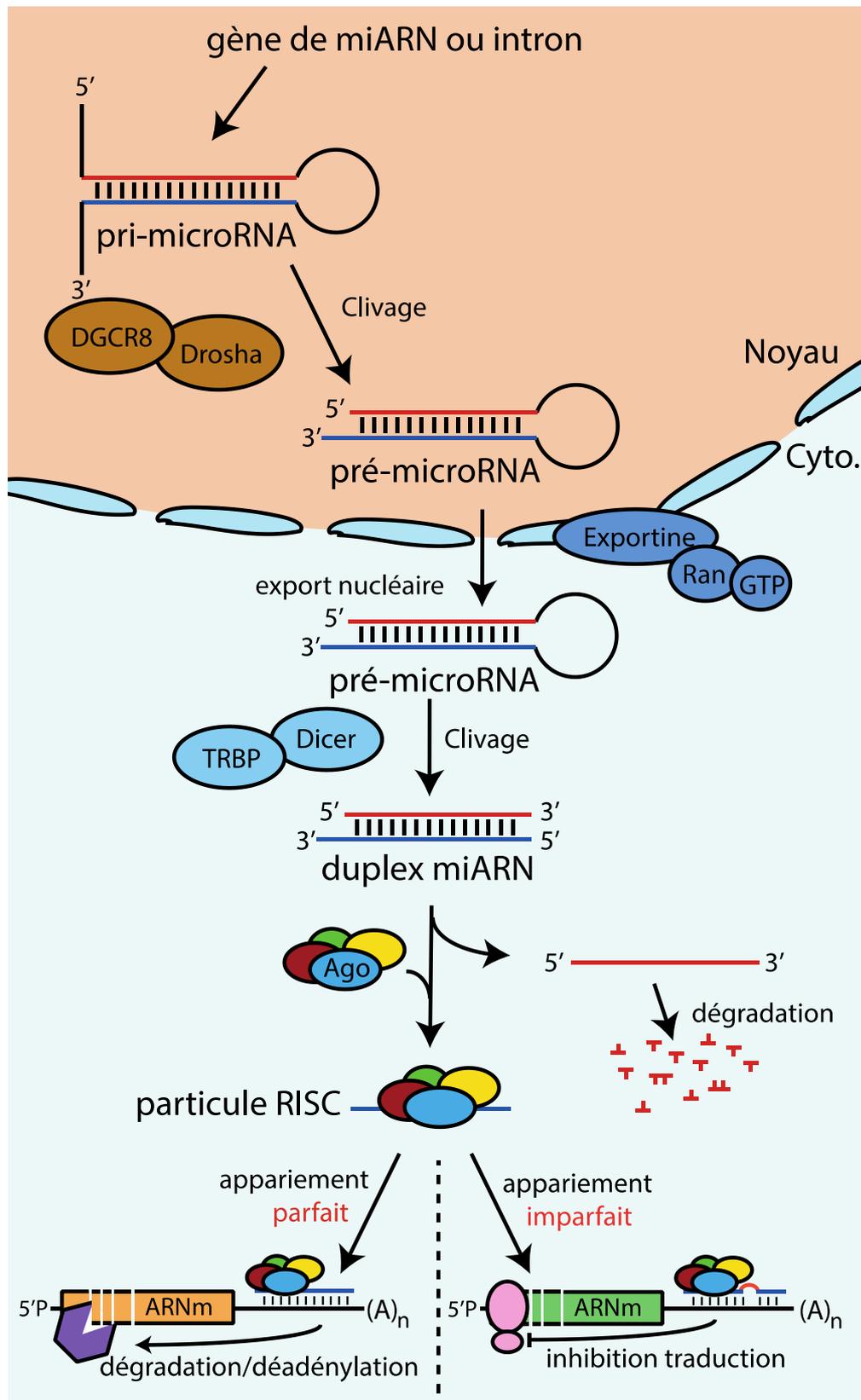


Figure 12 : Biogenèse des miR.

Les miR sont transcrits à partir d'introns ou de gènes de miR en pri-miR (primary miR) qui adoptent une conformation en tige-boucle. Le complexe protéique Drosha/DGCR8 mature ce pri-miR en pré-miR (precursor miR) qui sera transporté dans le cytoplasme par le complexe transporteur Exportine/Ran/GTP. Le complexe protéique Dicer/TRBP permet le clivage de la boucle et donc la maturation du pré-miR en duplex miR. Le complexe Ago vient ensuite interagir avec le brin guide du miR, le brin complémentaire sera dégradé. Le miR mature et le complexe protéique Ago constituent la particule RISC. La particule RISC va ensuite interagir avec un ARNm, soit avec un appariement parfait entre le miR et l'ARNm qui va conduire à la dégradation de l'ARNm et du miR, soit avec un appariement imparfait qui conduira à l'inhibition de la traduction et/ou à la déadénylation de l'ARNm.

2.3.2 Les lncRNA dans le domaine de l'épigénétique

Les longs ARN non codants (lncRNA) sont définis par leur taille (plus de 200 nucléotides). Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II et peuvent subir des étapes de maturation telles que la polyadénylation, l'épissage et le *capping* comme les ARNm (Jarroux et al., 2017). Certains d'entre eux adopteront une conformation circulaire : les circRNA (Panda, 2018). Les étapes de transcription sont similaires à la transcription d'un ARNm, avec des facteurs de transcription qui permettent une expression différentielle selon le tissu et le contexte cellulaire (Jarroux et al., 2017). Néanmoins, chez l'homme, les promoteurs de lncRNA présentent quelques particularités. En effet, il semblerait que ces promoteurs soient enrichis en dinucléotides A/T (Alam et al., 2014). Au niveau fonctionnel, les lncRNA possèdent des rôles très variés, notamment dans la régulation de l'épissage alternatif (Romero-Barrios et al., 2018), la formation de corps nucléaires (Chujo and Hirose, 2017) ou encore le *turnover* des protéines (Yang et al., 2013). Plus récemment, il a été montré que certains d'entre eux possèdent une capacité codante (Stein et al., 2018). Au niveau épigénétique, ils peuvent être l'intermédiaire du recrutement de protéines histones, engendrer une réorganisation de la chromatine (Böhmdorfer and Wierzbicki, 2015), ou encore agir comme des éponges à miR (notamment les circRNA) (Panda, 2018).

2.4 Effets d'une carence en donneurs de méthyles

Les ARN interférents sont donc impliqués de différentes manières dans les régulations épigénétiques. En effet ils exercent une régulation fine de l'expression génique en agissant au niveau des différentes étapes de la transcription à la maturation des ARN. Une carence en donneurs de méthyles (notamment en vitamine B9 et B12) perturbe

la synthèse de la SAM, essentielle aux événements épigénétiques. L'impact de la dérégulation d'évènements épigénétiques sur l'expression des miR a déjà été montré (Sato et al., 2011). En effet, de nombreuses études ont montré qu'une carence précoce en donneurs de méthyles a un impact important sur le développement neurologique de l'embryon (Balashova et al., 2018). La voie de signalisation Stat3 est impliquée dans de nombreuses étapes du développement, notamment dans la guidance des axones (Conway, 2006) et la croissance des neurites (He et al., 2005). Lors d'une carence précoce en donneurs de méthyles, miR-124 est surexprimé, ce qui conduit à une dérégulation de la voie Stat3 (Kerek et al., 2013). Celle-ci a pour conséquence un défaut de prolifération des cellules neuronales ainsi qu'une augmentation de l'apoptose, qui seraient responsables d'une atrophie des tissus neuronaux chez le fœtus (Kerek et al., 2013). En parallèle, les auteurs ont montré une diminution de la méthylation globale de l'ADN. Une supplémentation en acide folique chez la femme enceinte est bénéfique pour diminuer le risque de malformation du tube neural du fœtus. Au laboratoire, il a été montré récemment qu'une supplémentation en acide folique pendant la période de lactation des rates restaure les dérégulations observées au niveau de l'expression de miR-34a (qui cible notamment la voie NOTCH (Geoffroy et al., 2017)) et miR-23a (impliqué dans la myélinisation (Lin and Fu, 2009)), réduisant ainsi les effets observés lors d'une carence précoce, notamment concernant la taille du cerveau des rats (Geoffroy et al., 2019). Cette étude révèle également qu'une supplémentation tardive en folate corrige le niveau de méthylation de l'ADN chez les rats.

Néanmoins, une autre étude a montré les conséquences d'un apport excessif en folate sur le fœtus. En effet, il semblerait qu'une surconsommation de folate entraîne une surméthylation ainsi que des défauts de l'expression de nombreux gènes, notamment impliqués dans des processus neurologiques, augmentant le risque de développer un syndrome autistique pour le fœtus. Ces phénomènes sembleraient découler en partie d'une dérégulation du gène contenant le miR *Mirg* (Barua et al., 2015).

Par ailleurs, il a été montré qu'un régime déficient en choline et en folate avait pour conséquence une surexpression de miR-379 et miR-410 dans le foie et le plasma (Tryndyak et al., 2016). La dérégulation de ces miR provoque l'activation de progéniteurs hépatiques et de la fibrogénèse. Cette étude suggère que les miR sont des régulateurs cruciaux dans la réponse à une carence en donneurs de méthyles.

A ce jour et à notre connaissance, aucune étude concernant l'impact d'une carence en donneurs de méthyles sur les lncRNA n'a été publiée.

Les modifications épigénétiques de l'ADN, notamment la méthylation m^5C des îlots CpG, ainsi que la synthèse et la fonction des ARN non codants, plus particulièrement les miR, sont perturbées par une carence en donneurs de méthyles. Il existe un 3^e niveau de régulation épigénétique que nous allons maintenant décrire, ce sont les protéines histones.

3 Les protéines histones

L'ADN qui comprend l'information génétique est présent dans le noyau de la cellule eucaryote. Son expression est très dépendante de son organisation tri- et quadri-dimensionnelle. En effet, cette molécule mesure environ 1m, il est donc essentiel qu'elle soit compactée. Parmi les différents mécanismes de compactage, on retrouve l'organisation de l'ADN sous forme de chromatine autour des protéines histones, c'est ce qu'on appelle les nucléosomes.

3.1 Les nucléosomes

La chromatine s'organise en structures répétées de nucléosomes et chromatosomes. Les nucléosomes sont composés d'ADN et de 4 protéines présentes en 2 exemplaires (H2A, H2B, H3, H4) qu'on appelle les histones (Figure 13) (Arents et al., 1991). Entre chaque nucléosome, on retrouve une protéine histone (H1) et de l'ADN qu'on appelle *linker*, ce sont les chromatosomes (Simpson, 1978), ils permettent un niveau supplémentaire de compaction de la chromatine (Finch and Klug, 1976). La structure des nucléosomes est conservée entre les espèces.

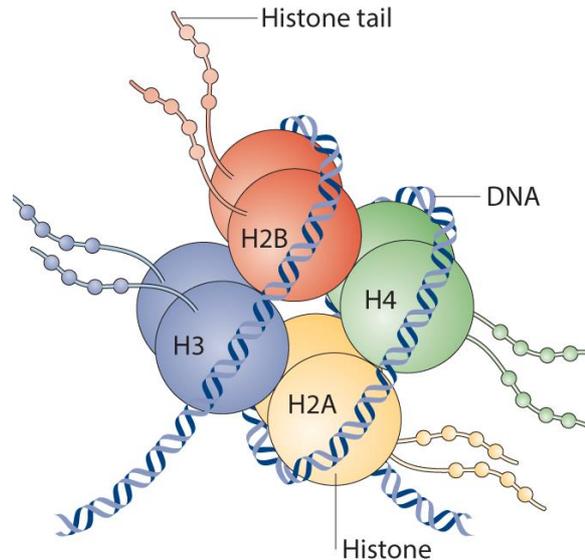


Figure 13 : Le nucléosome (Tsankova et al., 2007).

Le nucléosome est composé de 8 histones, H2A, H2B, H3 et H4 présentes chacune en homodimère. L'ADN est enroulé autour de ses protéines. Les histones possèdent une queue qui sera modifiée pour permettre la compaction/décompaction de la chromatine et donc la régulation de la transcription.

La présence des histones sur l'ADN le protège de la digestion par des nucléases, contrairement à l'ADN présent dans les parties *linker*. Les histones « core » sont des petites protéines aux propriétés basiques. Elles s'associent entre elles en homodimère, puis en hétéro-tétramère (H2A/H2B et H3/H4) et enfin en octomère. Les nucléosomes sont des structures dynamiques qui vont se former, puis se déformer pour créer un accès aux protéines de liaison à l'ADN afin d'activer la transcription (Anderson and Widom, 2000). La dynamique des nucléosomes peut être modulée par la présence de variants d'histones. En effet, il existe des variants pour les histones H3, H2A et H2B (également pour l'histone *linker* H1). Leur variabilité provient de l'altération de la séquence en acides aminés ou par l'addition de domaines. Ils sont divisés en 2 catégories, les variants de réplication et les variants de remplacement. Ces 2 catégories de variants ont un profil d'expression différent, avec par exemple, une surexpression durant la phase S du cycle cellulaire pour les variants de réplication (Marzluff et al., 2002). Ils permettent une régulation fine de la transcription dans les différents tissus et selon les différentes étapes du cycle cellulaire (Ashraf et al., 2019; Montellier et al., 2013; Schenk et al., 2011; Weber and Henikoff, 2014).

Les protéines histones possèdent une queue en N-terminal qui subira des modifications post-traductionnelles, qui vont également permettre la modulation de l'expression des gènes *via* la compaction/décompaction de la chromatine.

3.2 Les modifications des protéines histones

Les modifications des protéines histones sont les acteurs de la régulation épigénétique médiée par ces dernières. Elles vont permettre la régulation de la charge des histones afin de favoriser l'interaction avec d'autres nucléosomes ou l'ADN, affectant ainsi la structure de la chromatine. En effet, les histones sont des protéines chargées positivement, elles interagissent donc avec l'ADN qui est chargé négativement. Ces protéines contiennent une queue N-terminale qui sera la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles dont les 3 principales sont décrites ci-après (Alfrey et al., 1964).

3.2.1 Acétylations

L'acétylation des protéines histones est dynamique et se fait par l'intermédiaire des histones acétyltransférases (HAT) et des histones déacétylases (HDAC) (Figure 14) (Alfrey et al., 1964). Les HAT utilisent l'acétyl-coA comme co-substrat et acétylent préférentiellement les résidus lysines. Ainsi, la charge positive de la lysine est neutralisée, l'interaction avec un autre nucléosome est affaiblie. A l'inverse, les HDAC déacétylent les lysines sur les queues des histones, permettant ainsi de stabiliser l'architecture de la chromatine en favorisant les interactions entre les nucléosomes. De manière générale, l'acétylation d'une histone engendre donc la décompaction de la chromatine, permettant une meilleure accessibilité pour les facteurs de transcription et donc l'activation de la transcription (Yang and Seto, 2007).

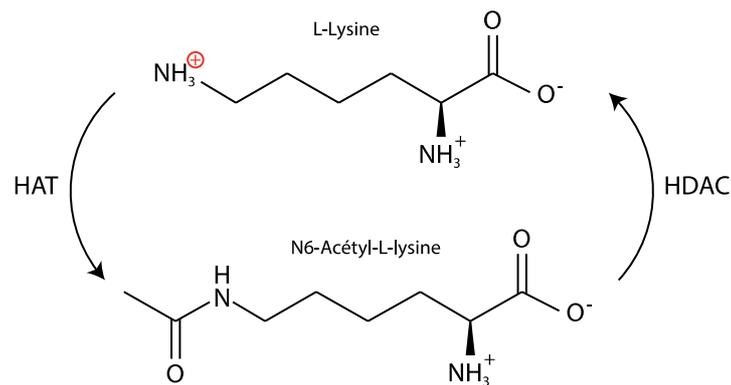


Figure 14 : Acétylation des résidus lysines sur les protéines histones.

A pH 7, une lysine présente sur une protéine histone pourra être acétylée par une HAT (histone acetyl transferase), sa charge positive sera neutralisée ce qui favorisera l'activation de la transcription par répulsion des charges (la chromatine étant chargée négativement) et donc la décompaction de la chromatine. Cette modification est dynamique, les acétyl-lysine pourront être déacétylées par des HDAC (histone deacetylase). La charge positive est retrouvée, favorisant la compaction de la chromatine et inhibant la transcription des gènes.

3.2.2 Phosphorylations

La phosphorylation des histones a lieu principalement sur les résidus sérines, thréonines et tyrosines présents au niveau de la queue des histones (Figure 15) (Bannister and Kouzarides, 2011). Elle est médiée par les enzymes kinases et phosphatases qui permettent un profil de modification dynamique capable de réguler l'expression des gènes. Les kinases ont besoin d'une molécule d'ATP pour phosphoryler leurs cibles. La phosphorylation ajoute une charge négative à l'histone, qui va perturber la structure de la chromatine. En effet, la charge négative ajoutée va augmenter la répulsion avec la charge négative de l'ADN, permettant la décompaction de la chromatine et donc la transcription des gènes.

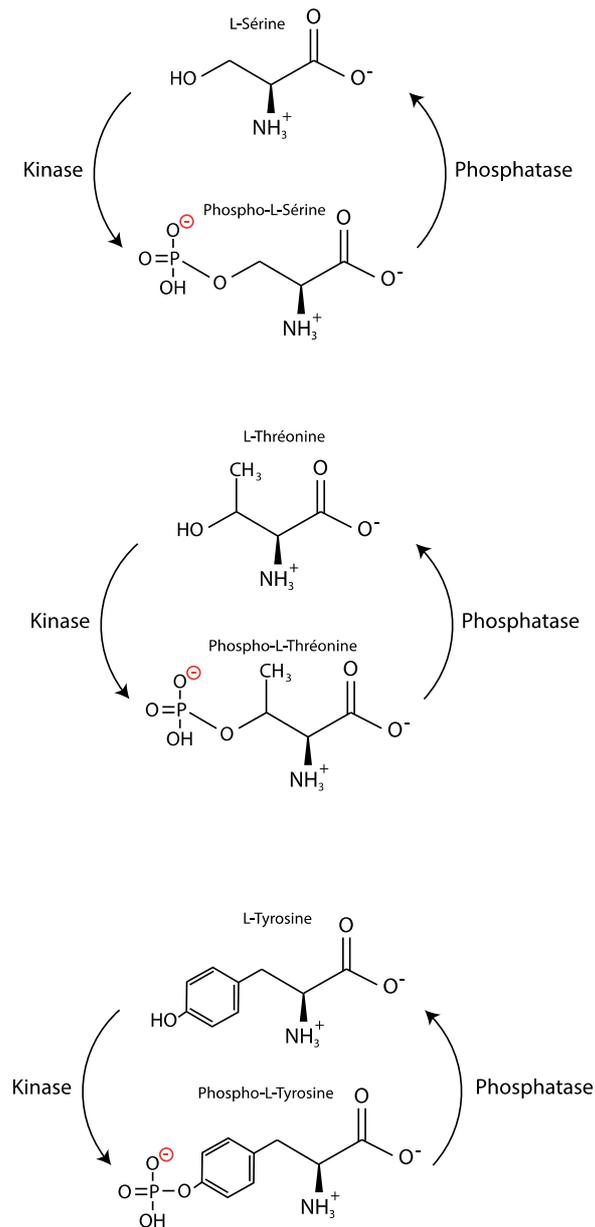


Figure 15 : Phosphorylation des résidus Sérine, Thrénine et Tyrosine sur les protéines histones.

Les enzymes permettant la phosphorylation des résidus sont des kinases, la déphosphorylation est faite par des phosphatases. A pH 7, la phosphorylation apporte une charge négative supplémentaire à l'acide aminé, favorisant la répulsion avec la chromatine, sa décompaction et donc la transcription des gènes.

3.2.3 Méthylations

La méthylation des histones a quant à elle lieu au niveau des résidus lysines et arginines (Figure 16, Tableau 1). Les résidus lysines peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés, les résidus arginines peuvent être mono- ou di-méthylés. Cette modification n'a aucun impact sur la charge des histones (Ng et al., 2009). Il existe des méthylases spécifiques pour chacun des 2 résidus, HKMT (*histone lysine methyltransferase*) pour les lysines et PRMT (*protein arginin methyltransferase*) pour les arginines (Rea et al., 2000; Wolf, 2009). La méthylation peut aussi bien être associée à l'activation ou la répression de l'expression des gènes. Il a longtemps été admis que la méthylation n'était pas une modification dynamique, mais il a ensuite été mis en évidence un certain nombre de déméthylases, réfutant cette hypothèse (Chang et al., 2007; Wang et al., 2009).

La méthylation des lysines peut aussi bien être responsable de l'activation que de la répression de la transcription. Le degré de méthylation peut être différent selon la région génomique où se trouve la lysine présente sur la protéine histone. Par exemple, la marque H4K20 mono-méthylée est observée dans le corps de gènes actifs alors que la marque H4K20 tri-méthylée est plutôt retrouvée dans des régions compactées de l'ADN (Black et al., 2012). De plus, la région génique dans laquelle se trouve la lysine méthylée a également un effet sur la régulation de la transcription. La marque H3K9 tri-méthyle, lorsqu'elle est présente au niveau des promoteurs est associée à la répression de la transcription alors que dans le corps du gène, elle active la transcription (Tableau 1) (Black et al., 2012).

Pour conclure, les modifications post-traductionnelles des acides aminés présents au niveau des queues des protéines histones peuvent avoir un rôle dans l'activation comme dans la répression de la transcription. En effet, ces modifications permettent de moduler la charge des acides aminés qui vont donc être attirés ou repoussés vers la chromatine chargée négativement. Il existe d'autres modifications telles que la sumoylation, l'ubiquitinylation ou encore la biotinylation. Ces modifications permettent également la régulation de la transcription par un phénomène de compaction/décompaction de la chromatine mais elles ne seront pas décrites ici car elles sont minoritaires.

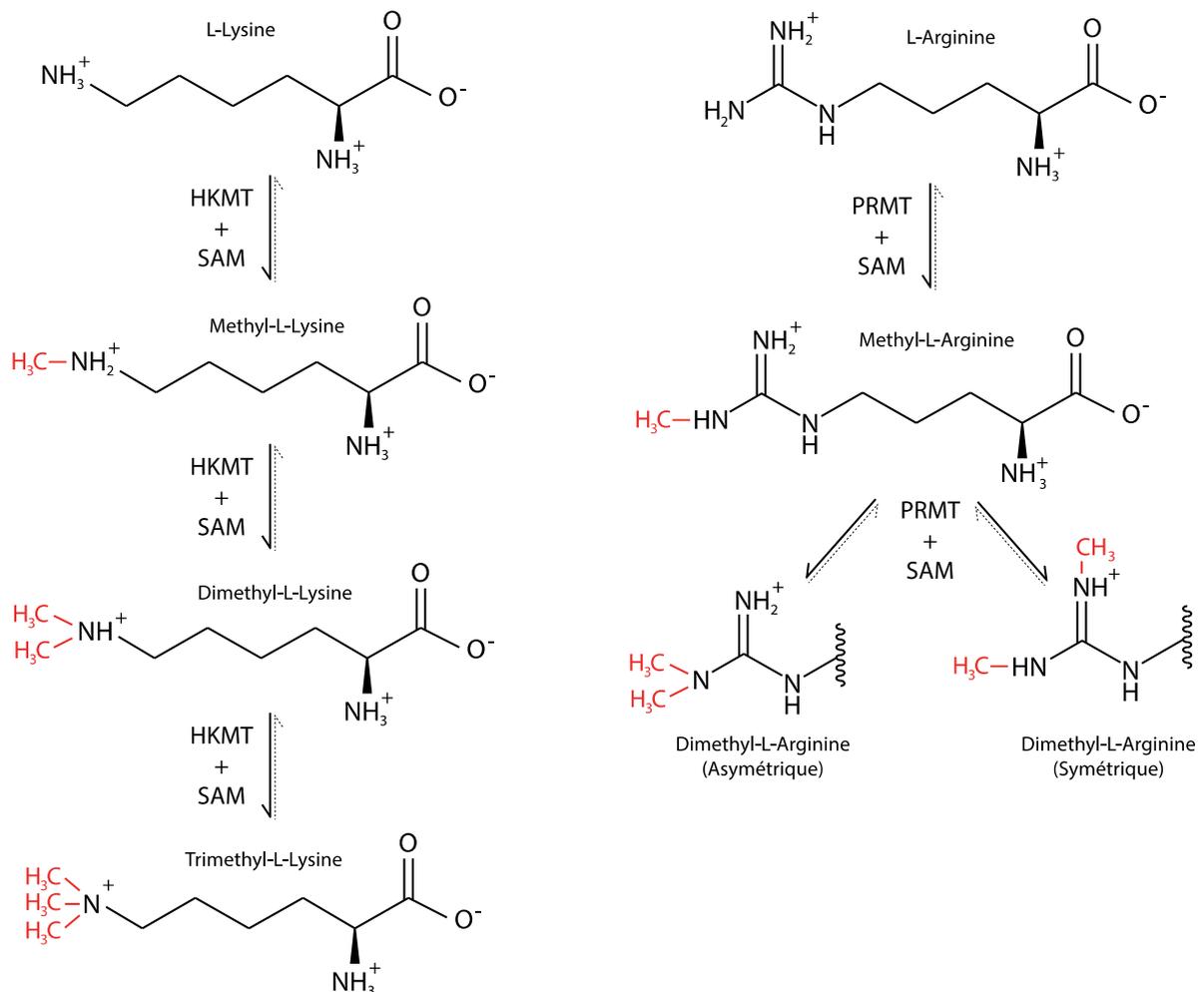


Figure 16 : Méthylation des résidus lysine et arginine des protéines histones.

Les lysines présentes sur les protéines histones peuvent être mono-, di- ou tri-méthylées par les KMT (Histone Lysine Methyl-Transferase) et la SAM. Les arginines présentes sur les protéines histones peuvent être mono- ou di-méthylées de manière symétrique ou asymétrique par les PRMT (Protein Arginin Methyl-Transferase). Les acides aminés sont présentés à pH 7.

Tableau 1 : Les marques histones méthylées les plus décrites.

Marque	Présente sur ...	Localisation	Effet sur la transcription	Références
H4K20	Hétérochromatine (me3)	Promoteur Transposons (me3)	Activation	(Barski et al., 2007)
H3K9	Hétérochromatine	Promoteur TSS (me1) Gènes non transcrits (me2/3)	Activation (me1) Répression (me2/3)	(Barski et al., 2007) (Rosenfeld et al., 2009)
H3K27	Hétérochromatine	Promoteur	Activation (me1) Répression (me2/3)	(Barski et al., 2007) (Rosenfeld et al., 2009)
H3K4	Euchromatine	Promoteur TSS (me3)	Activation (me1/3) Répression (me2)	(Benevolenskaya, 2007) (Liu et al., 2019) (Koch et al., 2007)
H3K36	Euchromatine	Séquence codante	activation	(Li et al., 2019)

3.3 Les effets d'un défaut du métabolisme des monocarbone

Les enzymes responsables de la méthylation des histones ont besoin de la SAM pour exercer leur activité. Une carence en donneurs de méthyles a donc un impact sur ces modifications. Chez *S. pombe*, un KO de la méthionine synthase induit une diminution de la SAM et de la méthylation de l'histone H3 (Hayashi et al., 2018). Cet effet est responsable de troubles de la croissance cellulaire. De manière similaire, une faible

concentration en méthionine dans le milieu de croissance de *S. cerevisiae* réduit la méthylation de H3K4 et perturbe ainsi la division cellulaire (Sadhu et al., 2013). Ces expériences ont été confirmées dans des cellules humaines, les méthylation H3K9 et H3K4 sont perturbées en cas de carence en méthionine (Sadhu et al., 2013). Des cellules de colon carencées montrent également une sous-méthylation globale des protéines histones (Haws and Denu, 2017). De plus, une restriction en méthionine a montré un impact direct sur la quantité de SAM et de méthylation de la marque H3K4, une supplémentation en méthionine a permis de restaurer la méthylation de H3K4 (Dai et al., 2018).

Par ailleurs, la présence de folate dans le noyau est indispensable pour la régulation de nombreuses enzymes, notamment de LSD1 qui est, entre autre, la déméthylase de H3K4me1/2 (Garcia et al., 2016). En effet, dans des cellules hépatiques de souris ayant subi une carence en folate, la méthylation H3K4 est augmentée car l'activité de LSD1 est réduite. Dans le foie également, il a été montré qu'un régime MDD provoque la perte progressive des marques H4K20me3, H3K9me3, H3K9ac et H4K16ac, expliquée par une dérégulation des enzymes responsables de ces modifications (Pogribny et al., 2007). Une étude avait d'ailleurs montré la corrélation entre un régime déficient en folate avec une diminution de la quantité de SAM, et une supplémentation en folate avec une restauration de la synthèse de SAM (Miller et al., 1994).

De plus, MTHFR, enzyme impliquée dans le métabolisme des folates, a également un rôle important dans le maintien de la structure de l'hétérochromatine *via* les modifications des protéines histones (Zhu et al., 2014). Une sous-expression de cette enzyme provoque une diminution de H3K9me3 et H4K20me3, qui induit l'accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire.

Parmi les donneurs de groupements méthyles, on retrouve également la choline, obtenue à partir d'un micronutriment, la bétaine. La choline a été montrée comme responsable de la régulation des marques H3K9me2/3 et H3K4me2 (Zhu et al., 2014). Une supplémentation en bétaine restaure le niveau de la marque H3K4me3 dans des cellules de neuroblastomes (Singhal et al., 2015).

Enfin, il a été montré au laboratoire, que le régime MDD, en plus d'un traitement avec un agent carcinogène (la fumonisine, FB1), provoque une diminution significative de la marque histone H4K20me3 (Pellanda et al., 2012). Cette marque est conservée et est impliquée dans la maintenance de la stabilité du génome, un défaut de H4K20me3

provoque une mauvaise organisation de l'hétérochromatine, ce qui interfère avec l'expression des gènes.

Il apparaît que les marques histones ont une régulation spécifique selon l'organisme et/ou le tissu en fonction d'une carence en folate et/ou d'une régulation de la SAM par un autre mécanisme. Il est néanmoins clair qu'une carence en donneurs de méthyles a un impact sur la modification des protéines histones, que ce soit de manière directe ou indirecte. Cependant, contrairement à la méthylation de l'ADN, les connaissances sur le lien entre carence en donneurs de méthyles et méthylation des protéines histones restent encore parcellaires.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'impact d'une dérégulation du métabolisme des monocarbones sur la méthylation des histones.

MS : méthionine synthase, Met : méthionine, MDD : methyl donor deficiency, MTHFR : méthyle tétrahydrofolate réductase.

Modèle d'étude	Régime/ Phénotype	Impact sur la méthylation des histones	Conséquence cellulaire	Référence
<i>S. pombe</i>	KO MS	↓ H3me	Trouble de la croissance	(Hayashi et al., 2018)
<i>S. cerevisiae</i>	Faible concentration en Met	↓ H3K4me	Trouble de la division	(Sadhu et al., 2013).
Leucémie myéloïde humaine	Carence en Met	↓ H3K9me et H3K4me		(Sadhu et al., 2013).
Cancer du côlon humain	Restriction en Met	↓ Méthylation globale des histones		(Haws and Denu, 2017)
Cancer du côlon humain	Restriction en Met	↓H3K4me		(Dai et al., 2018)

Cellules hépatiques de souris	Carence folate	↑H3K4me	Détérioration générale des fonctions cellulaires	(Garcia et al., 2016)
Foie de souris	MDD	↓H4K20me3, H3K9me3, H3K9ac et H4K16ac	Apparition de cancer	(Pogribny et al., 2007)
Cellules humaines cancéreuses	Kd MTHFR	↓ H3K9me3 et H4K20me3	Accumulation en phase S	(Zhu et al., 2014)
Neuroblastome murin	+ choline	↑ H3K4me3	↓ Respiration mitochondriale	(Singhal et al., 2015)
Fœtus de rats	MDD + FB1	↓ H4K20me3	Désorganisation de l'hétérochromatine	(Pellanda et al., 2012)

En résumé, une carence en donneurs de méthyles a été montrée comme responsable de dérégulation épigénétique au niveau de la méthylation de l'ADN (Kerek et al., 2013), de la méthylation des protéines histones (Serefidou et al., 2019) (Tableau 2) ainsi que de la régulation par les ARN non codants (Geoffroy et al., 2019; Kerek et al., 2013).

Chapitre 3 : Les modifications épigénétiques des ARN

Plus récemment, une nouvelle catégorie de modifications a été décrite, ce sont les modifications des ARN. Ces modifications ne sont pas considérées comme des modifications épigénétiques au sens strict du terme car elles ne sont pas transmissibles d'une génération à l'autre. Nous parlons alors de modifications épitranscriptomiques.

1 La nutriginomique et la modification des ARN (Mosca et al., 2019)

Les modifications chimiques des ARN sont connues depuis des dizaines d'années : elles sont au nombre de 171, comprenant la méthylation, la phosphorylation et l'acétylation, et ont été listées dans une base de donnée appelée MODOMICS (Czerwoniec et al., 2009). Ces modifications sont présentes sur tous types d'ARN : non codants (par exemple ARNr, ARNt mais aussi snARN ou snoARN) et codants (ARNm). Ces modifications chimiques, qui sont catalysées par de nombreuses enzymes, contribuent souvent à la stabilisation des ARN, ou modifient leur spectre d'interaction avec d'autres molécules. Par exemple, les modifications des ARNt positionnées hors de la tige contenant l'anticodon sont généralement nécessaires au maintien de l'intégrité de la structure de l'ARNt et à la spécificité des interactions, alors que les modifications présentes sur la boucle de l'anticodon contribuent à la fidélité et l'efficacité de la synthèse protéique (Agris, 2004). Cependant, dans la plupart des cas, la fonction des modifications des ARN reste à élucider.

Parmi ces modifications chimiques, certaines, réversibles peuvent être modulées par des signaux environnementaux pour réguler la fonction des ARN : c'est ce qu'on appelle désormais l'épitranscriptomique (Liu and Pan, 2015). Le régime alimentaire et le mode de vie d'un individu sont des causes déterminantes de maladies chroniques (Tableau 3). Une dérégulation de la modification m⁶A par un régime gras (*high fat diet*) par exemple est responsable de l'apparition de stéatopathie non alcoolique (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD). Les effets sont atténués par une supplémentation à la bétaine (Chen et al., 2015; Zhou et al., 2015).

La nutriginomique (étude de l'impact d'un régime alimentaire sur l'expression des gènes) est, de nos jours, un domaine en expansion. La plupart des études menées à ce sujet ont mis en évidence l'importance de la méthylation des ADN, des histones ou

des miARN. Avec les nouvelles technologies de séquençage haut-débit, de nouvelles informations concernant les modifications des ARN ont été découvertes. Ces données ont fait l'objet de la rédaction d'une revue durant ma thèse (Annexe 2)(Mosca et al., 2019).

Tableau 3 : Impact du régime alimentaire sur la manifestation de maladies (Mosca et al., 2019).

Modification	Régime	Modèle d'étude	Effets	Maladie	Référence
Υm^5U	- Taurine, 6mois - Taurine 2 mois	Chat Raies	Réduit la fréquence de Υm^5U	Défaut de développement, de vision et cardiomyopathies	(Asano et al., 2018)
Υm^5U $\Upsilon m^5(s^2)U$		Maladies génétiques avec des mutations $tRNA^{Leu^{UUR}}/tRNA^{Lys}$	Défaut d'activité respiratoire	MELAS, MERF	(Suzuki et al., 2002)
Mcm^5U mcm^5UM	- Selenium, 9-13 semaines	Cellules humaines rat	Affecte stabilité et distribution de 2 $tRNA^{[Ser]Sec}$		(Hatfield et al., 1991)
Queuosines m^5C , C38	- Queuine 2 mois	Souris Cellules humaines	Activation de la réponse UPR et stress du RE		(Tuorto et al., 2018)
m^6A	<i>High Fat</i> +/- bétaine + bétaine	Rat Souris KO AMPK1 Adipocytes	+ m^6A - accumulation de TG dans le foie et les tissus adipeux	NAFLD	(Chen et al., 2015; Zhou et al., 2015)

Les micronutriments (vitamines et minéraux) apportés par le régime alimentaire sont requis en petite quantité par l'organisme afin de réaliser diverses modifications

chimiques en tant que cofacteurs ou cosubstrats. De plus, certains d'entre eux sont essentiels à la synthèse de groupements chimiques qui modifient les ARN, notamment les groupements méthyles (Figure 17).

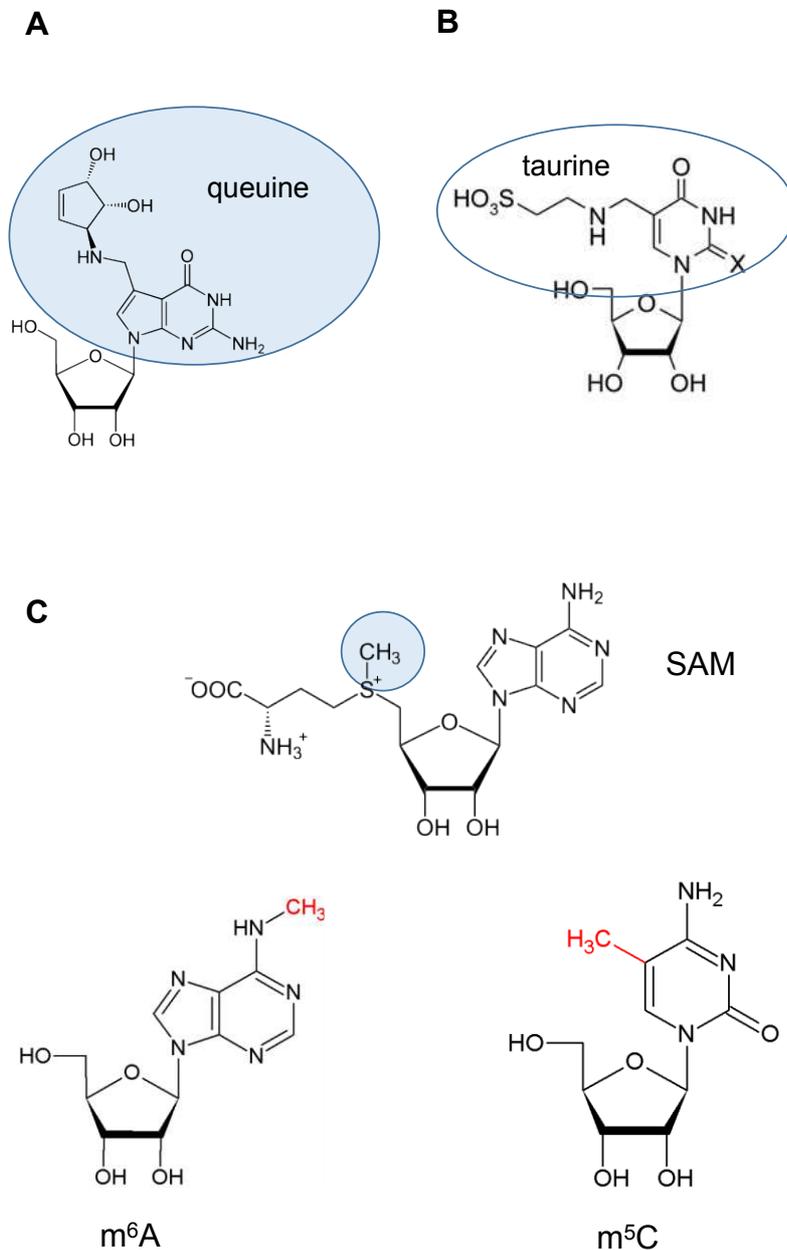


Figure 17 : Exemple des modifications des ARN (Mosca et al., 2019).

A. La Queuine est retrouvée dans l'alimentation et le microbiote intestinal et est utilisée pour la modification de la guanine en position wobble.

B. La taurine est retrouvée dans le lait maternel et l'alimentation d'origine animale. Elle permet la modification des uridines en position wobble.

C. La synthèse de la SAM est régulée par les vitamines B9 et B12 retrouvées dans les légumes verts et l'alimentation d'origine animale respectivement. Le groupement méthyle est utilisé pour la méthylation des différents nucléotides, notamment la méthylation des adénosines en position 6 (m^6A). La méthylation des cytosines en position 5 (m^5C) se retrouve sur l'ADN.

Il est important de noter que même les ARN les moins abondants, tels que les ARNm, sont modifiés par méthylation. En effet, peu après la découverte de modifications co-transcriptionnelles telles que l'ajout de la coiffe ou de la queue poly(A), des modifications internes ont également été identifiées. Parmi les quelques modifications mises en évidence, la m^6A a été la première identifiée (Desrosiers et al., 1974). Il s'agit de la modification la plus abondante qui est de ce fait, la plus étudiée. D'autres modifications (m^7G (N(7)méthyl-guanosine), 2'-O-méthylation, ou les controversées m^5C et m^1A (N(1)méthyl-adénosine)) sont moins connues en terme de fonctions ou de mécanismes (avec les protéines *writer/reader/eraser*).

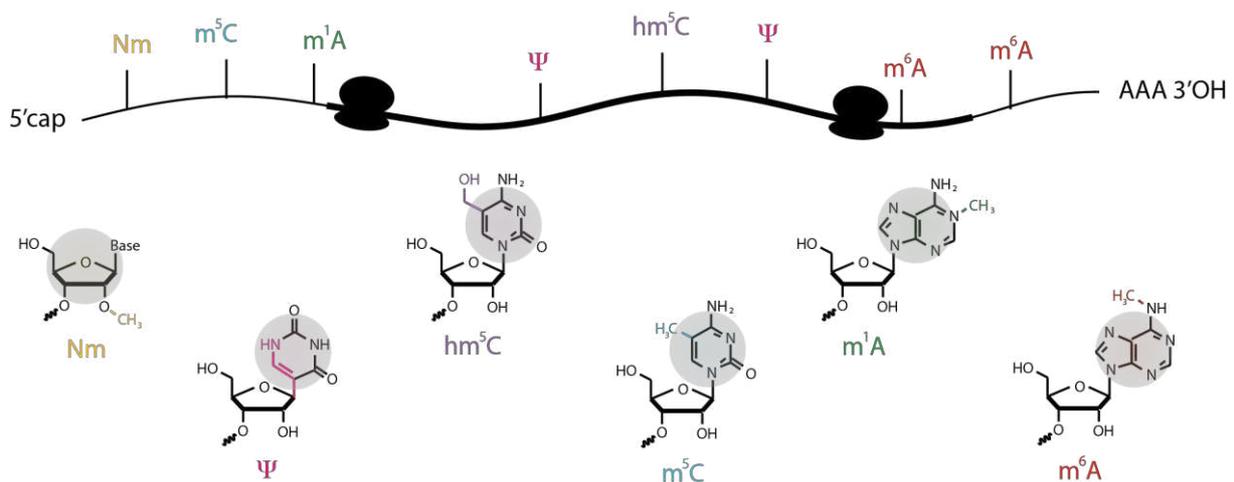


Figure 18 : Modifications chimiques des ARNm (Roundtree et al., 2017).

Représentation schématique des modifications chimiques présentes sur les bases des ARNm. Certaines modifications se retrouvent préférentiellement au niveau de la coiffe, de la partie codante ou encore des régions 5' ou 3' UTR.

2 Exemple des m^6A

2.1 L'étude des m^6A

Les m^6A ont été découvertes dans les années 1970 mais sont restées longtemps très peu décrites. En effet, la méthylation des adénosines n'induit aucun changement chimique, ni de l'appariement des bases, ce qui la rend difficile à étudier. La première

technique qui a été développée pour étudier les m^6A est la chromatographie. Les ARN sont digérés et séparés selon leurs propriétés hydrophobes qui se retrouvent modifiées par la méthylation (Figure 19) (Mongan et al., 2019). Le temps de rétention peut être confondu avec celui d'autres molécules, ce qui introduit un biais dans les analyses. Cette technique a été améliorée en utilisant une analyse par spectrométrie de masse (Figure 19) (Glasner et al., 2017) mais elle reste uniquement quantitative. Récemment, deux équipes ont mis au point une nouvelle technique appelée m^6A -seq (Dominissini et al., 2012) ou MeRIP-seq (Meyer et al., 2012). Cette technique se base sur la reconnaissance d'une m^6A par un anticorps. Les ARN totaux sont fragmentés puis immunoprécipités avec un anticorps reconnaissant la m^6A (Luhrmann et al., 1982). Les ARN sont ensuite analysés par séquençage (Figure 19). Ces études ont permis de montrer que les m^6A sont principalement présentes dans la région 3'UTR des ARNm et que leur séquence consensus est GGACU (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012).

Il est désormais possible de connaître la position exacte de la méthylation par la technique du mi-CLIP. Ici, les ARN sont « crosslinkés » avec l'anticorps, ce qui induit une mutation au niveau du site de la base méthylée. Un traitement à la protéinase K permet ensuite d'éliminer l'anticorps, les ARN sont ensuite rétro-transcrits et analysés par séquençage (Figure 19).

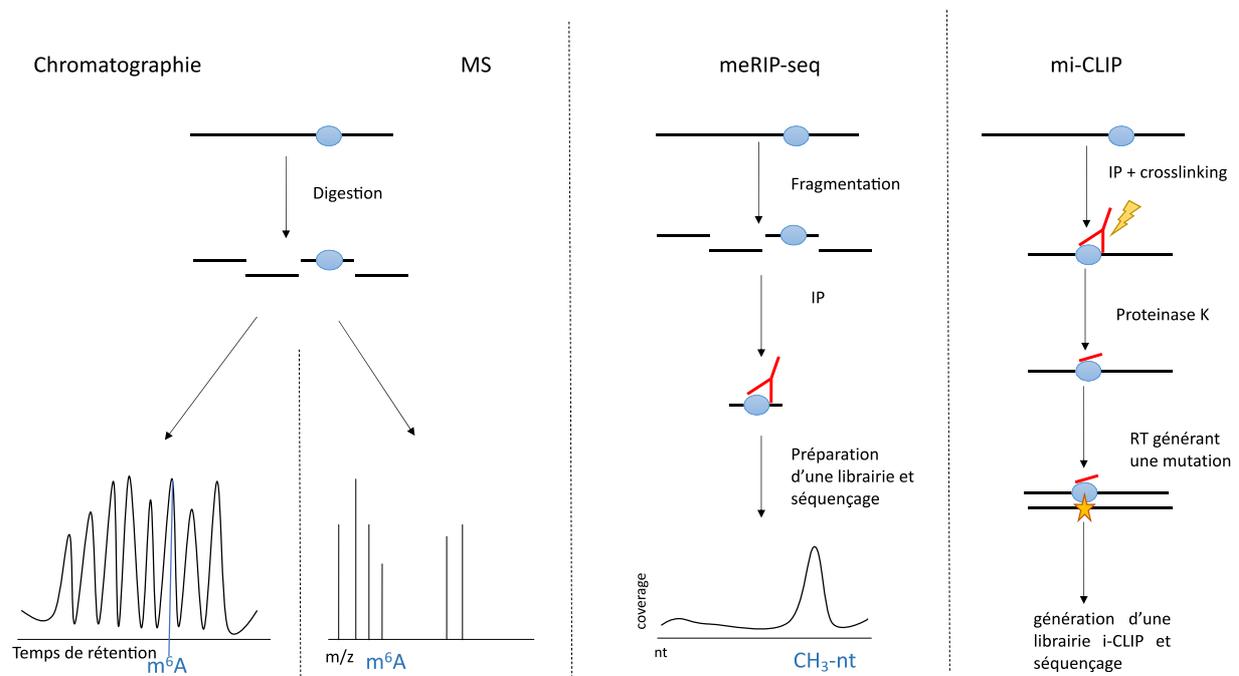


Figure 19 : Technique d'étude de la méthylation.

La première étape dans les techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse est la digestion des ARN, les ARN méthylés sont ensuite détectés selon leur temps de rétention pour la chromatographie ou selon leur masse et leur charge pour la spectrométrie. Pour le MeRIP-seq, les ARN sont fragmentés, un anticorps reconnaît la modification et les fragments immunoprécipités seront séquencés. La méthode mi-CLIP a une étape de « cross-linking » de l'anticorps à la m^6A en plus, induisant une mutation qui sera détectée par séquençage.

2.2 Les acteurs protéiques

La dynamique des m^6A peut être comparée à la dynamique de la méthylation des ADN avec un mécanisme de type *writer*, *reader*, *eraser* (Figure 20).

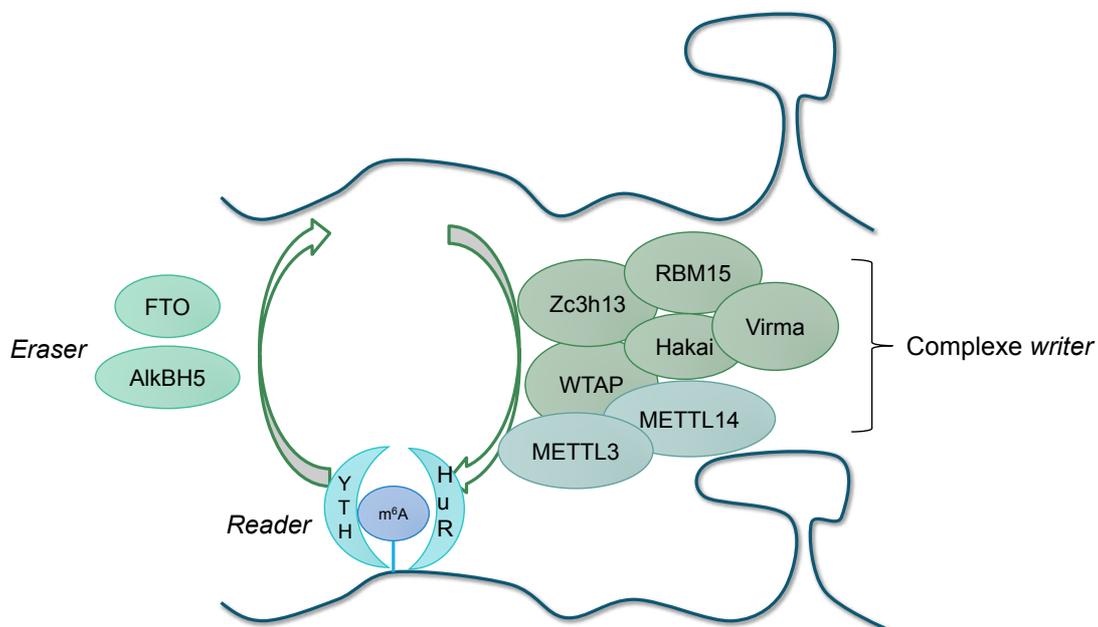


Figure 20 : Le mécanisme m^6A .

Le complexe de protéines *writer* (méthylase) est composé de METTL3, METTL14, WTAP, RBM15, Hakai, Virma, Zc3h13. Les protéines *reader* peuvent être des protéines à domaine YTH ou d'autres protéines de liaison aux ARN telles que HuR. Les 2 protéines *eraser* sont des déméthylases : FTO et ALKBH5.

2.2.1 Les writers

Le complexe *writer* est composé de 7 protéines, comportant les deux méthyltransférases METTL3 et METTL14. Ces protéines sont associées à une sous-unité régulatrice, composée de WTAP (*wilms tumor associated protein*), Hakai, Virma,

Zc3h13 (*zinc finger CCCH domain-containing protein 13*) et RBM15 (*RNA Binding motif 15*).

La méthyltransférase METTL3 a été la première à être identifiée comme responsable de la méthylation m⁶A (Narayan and Rottman, 1988). METTL3 est une méthyltransférase SAM dépendante conservée chez les mammifères (Schapira, 2016). Un KO de cette protéine provoque une perte significative de méthylation m⁶A, notamment au niveau des queues poly(A) (Geula et al., 2015).

La deuxième *writer* mise en évidence est WTAP. Elle a été découverte chez la levure en interaction avec METTL3 (Agarwala et al., 2012). Sa fonction principale dans ce mécanisme est de localiser le complexe *writer* dans les *speckles* pour permettre la méthylation m⁶A (Ping et al., 2014).

Une des principales questions concernant la méthylation m⁶A est la spécificité de l'adénosine à méthyler. Malgré une séquence consensus connue (DRACH), les m⁶A ne sont retrouvées que sur certains ARNm et dans des régions spécifiques (Meyer and Jaffrey, 2014). La découverte des protéines RBM15 et RBM15B a permis d'apporter une réponse à ces questions. En effet, ces protéines se lient aux régions riches en uracile, proches des régions à méthyler et sont à la base du recrutement des autres protéines du complexe pour la méthylation m⁶A (Patil et al., 2016).

Le rôle de METTL14 a longtemps été controversé. La protéine purifiée est capable de synthétiser des m⁶A (J et al., 2014), pourtant, des études cristallographiques ont montré que la protéine active au niveau catalytique dans le complexe est METTL3 et que METTL14 ne possède pas de domaine de liaison pour la SAM (Śledź and Jinek, 2016). Il est désormais admis que la protéine METTL14 permet l'interaction de METTL3 avec l'ARN et le positionnement du groupement méthyle pour son transfert à l'adénosine (Śledź and Jinek, 2016).

Enfin, Zc3h13 a récemment été montrée comme étant impliquée dans la liaison de RBM15 à WTAP chez la drosophile et la souris (Knuckles et al., 2018).

Les rôles exacts de Virma (également appelée KIAA1429) et Hakai n'ont pas encore été découverts même si des études prouvent leur implication dans le complexe *writer* (Růžička et al., 2017; Schwartz et al., 2014).

2.2.2 Les readers

Les protéines de lecture *reader* sont des protéines de liaison à l'ARN. On retrouve notamment HuR (ou ELAVL1) qui est impliquée dans la stabilité des ARNm (Meyer

and Jaffrey, 2014) (Tableau 4). Parmi les protéines *reader*, on retrouve également les protéines à domaines YTH (Tableau 4). Ces protéines peuvent être nucléaires et/ou cytoplasmiques et sont impliquées dans différents mécanismes de la maturation des ARN (Liao et al., 2018). Elles possèdent un domaine de liaison à l'ARN avec une « poche » permettant l'interaction avec la m⁶A, ces domaines structuraux sont conservés dans toutes les protéines YTH chez les eucaryotes (Xu et al., 2015).

Chaque protéine *reader* est généralement associée à une fonction. En effet, les acteurs protéiques du mécanisme m⁶A colocalisent avec les facteurs d'épissage dans les *speckles* (Ping et al., 2014). Cependant, les m⁶A ne sont pas retrouvées au niveau des jonctions d'épissage sur les ARNm, ce qui laissait penser qu'elles ne sont pas impliquées dans les réactions d'épissage (Meyer et al., 2012). Néanmoins, en 2016, une équipe a montré que les m⁶A avaient un rôle dans l'épissage alternatif. Leurs fonctions seraient médiées par la protéine *reader* YTHDC1, qui recruterait SRSF3 afin d'inhiber l'action de SRSF10 pour permettre des événements d'inclusion d'exon (Xiao et al., 2016).

La présence de m⁶A permet également des événements de traduction de manière coiffe-indépendante *via* la *reader* YTHDF1 ; les m⁶A se comporteraient comme des IRES (*internal ribosome entry site*) pour recruter le ribosome (Meyer et al., 2015). YTHDF3 permettrait de moduler cette traduction, elle agirait en coopération avec YTHDF1 et/ou YTHDF2 (Shi et al., 2017). De plus, une équipe a montré que des ARN circulaires (circARN) connus comme étant des ARN non codants, pourraient finalement produire des protéines grâce à cette traduction coiffe-indépendante médiée par les m⁶A (Legnini et al., 2017). Par ailleurs, la protéine *reader* YTHDC2 possède un site de liaison à la petite sous-unité du ribosome, permettant de faciliter la traduction des ARNm méthylés m⁶A (Kretschmer et al., 2018). Enfin, une autre protéine *reader* des m⁶A, eIF3, permet l'initiation de la traduction en évitant le recrutement de eIF4, et notamment eIF4e qui se lie à la coiffe, afin de recruter le complexe d'initiation de la traduction généralement indispensable (Meyer et al., 2015).

Le temps de demi-vie des ARN peut également être régulé par la méthylation m⁶A, généralement *via* la protéine YTHDF2. Par exemple, il a été montré que cette dernière régule la dégradation de gènes neuronaux afin de moduler la différenciation des cellules (Heck et al., 2020).

Les m⁶A affectent également la maturation et les fonctions des miR. En effet, cette modification aide le recrutement des cofacteurs de la maturation des pri-miR en pré-

miR, DGCR8 / DROSHA, *via* la protéine *reader* HnRNPA2B1 (Alarcón et al., 2015b). Par ailleurs, il a été montré que la présence de m⁶A est enrichie dans la région 3'UTR de l'ARNm (Meyer et al., 2012). Cette région est généralement la cible des miARN, cela suggère qu'il y a un lien entre la présence de m⁶A et la régulation exercée par les miR. Cette étude a montré une corrélation entre la présence de m⁶A et les sites cibles des miR, 67% des régions 3'UTR qui contiennent des m⁶A sont aussi prédites pour être des sites d'action pour les miR, renforçant l'hypothèse d'un rôle des m⁶A dans la régulation des miR.

Tableau 4 : Les protéines *reader* des m⁶A.

Protéine <i>reader</i>	Etape de maturation ciblée	Référence
YTHDC1	Epissage	(Xiao et al., 2016)
YTHDC2	Stabilité et traduction	(Kretschmer et al., 2018)
YTHDF1	Traduction coiffe indépendante	(Meyer et al., 2015)
YTHDF2	Temps de demi-vie	(Heck et al., 2020)
YTHDF3	Stabilité et traduction	(Shi et al., 2017)
HuR	Stabilité	(Meyer and Jaffrey, 2014)
HnRNPA2B1	Régulation par les miR	(Alarcón et al., 2015b)
eIF3	Traduction	(Meyer et al., 2015)

2.2.3 Les erasers

Enfin les protéines *eraser* sont des protéines qui déméthylent les ARN. On retrouve notamment ALKBH5 et FTO (*Fat mass and obesity associated protein*). Cette dernière colocalise avec les facteurs d'épissage dans les *speckles*. Il a notamment été montré que des souris KO FTO avaient un profil de méthylation m⁶A altéré (Hess et al., 2013). Ces souris avaient déjà été étudiées, montrant une altération de la neurotransmission dopaminergique et un petit poids (Fischer et al., 2009). Cette protéine a été choisie pour notre étude car une dérégulation de FTO provoque des malformations similaires aux malformations liées à une carence en vitamine B12, notamment au niveau neurologique (défaut au niveau des neurones dopaminergiques). FTO est activée dans le cerveau en cas de diabète et augmente le risque de développer une maladie neurodégénérative telle qu'Alzheimer (Li et al., 2018a). De plus, une surexpression de FTO en cas de diabète a été associée à un risque accru de dépression (Rivera et al.,

2017), comme une carence en vitamine B12. Par ailleurs, la localisation de FTO est affectée au niveau de l'hypothalamus par l'état de jeûne des animaux (Vujovic et al., 2013), suggérant un effet possible de la carence en micronutriments.

2.3 Les fonctions décrites

De manière générale, les m⁶A sont par exemple impliquées dans la régulation de l'horloge circadienne. Une inhibition du mécanisme m⁶A (par inhibition de la méthyltransférase METTL3) induit une augmentation de la période de l'horloge circadienne. Il a été montré que les gènes impliqués (tels que *Per2*) sont sensibles aux variations de méthylation. Le temps de demi-vie des ARN est réduit en l'absence de m⁶A (Fustin et al., 2013).

2.3.1 m⁶A et cancer

Les protéines impliquées dans le mécanisme m⁶A peuvent être considérées comme oncogènes ou suppresseurs de tumeurs selon le cancer. Dans le cas du glioblastome, la méthylation m⁶A peut réguler la tumorigenèse (Cui et al., 2017). En effet, une surexpression de METTL3 ou une inhibition de FTO réduisent de manière drastique la croissance des cellules souches de glioblastome. A l'inverse, une sous-expression des protéines *writer* METTL3 et METTL14 induit la tumorigenèse (Cui et al., 2017). Ce mécanisme implique notamment l'ARNm de l'oncogène ADAM19, qui s'accumule s'il n'est pas méthylé, entraînant le renouvellement des cellules souches de glioblastome et donc la tumorigenèse.

Le rôle des m⁶A a également été montré dans la leucémie myéloïde aigüe (AML). En effet, METTL3 est surexprimée en cas d'AML, dans ce cas la méthylation a pour rôle le maintien de la pluripotence et l'inhibition de la différenciation cellulaire en favorisant la traduction de l'oncogène c-myc (Barbieri et al., 2017).

Dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), METTL3 est également surexprimée conduisant à une surméthylation m⁶A du suppresseur de tumeur SOCS2. Cette dernière sera alors reconnue par YTHDF2 et dégradée, entraînant le développement de HCC (Chen et al., 2018). Dans le cancer du sein, la tumeur est favorisée par le microenvironnement hypoxique, qui favorise l'expression de la déméthylase ALKBH5. Le facteur de pluripotence NANOG est alors déméthylé favorisant sa stabilité et donc la maintenance des cellules cancéreuses (Zhang et al., 2016).

En ce qui concerne les cancers du pancréas et de la prostate, c'est la protéine YTHDF2 qui est surexprimée régulant la prolifération et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses. En effet, pour le cancer pancréatique, YTHDF2 active la voie de signalisation AKT/GSK3 β /cyclin D1 et se lie aux m⁶A se trouvant sur l'ARNm de YAP afin de la réprimer (Chen et al., 2017). Dans le cancer de la prostate, une sous-expression de YTHDF2 inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses *via* le miR-493-3p qui est négativement corrélé à YTHDF2 (Li et al., 2018b).

La voie AKT est également ciblée dans le cancer de l'endomètre. METTL14 est mutée dans ces cellules cancéreuses, menant à un défaut de méthylation m⁶A de PHLPP2 qui régule négativement AKT par phosphorylation (Liu et al., 2018).

Enfin, dans le cancer du col de l'utérus, la protéine *eraser* FTO est surexprimée ce qui diminue la quantité de β -caténine *via* une diminution de la méthylation de son ARNm conférant aux tissus cancéreux une résistance à la chimio-radio-thérapie (Zhou et al., 2018).

2.3.2 m⁶A et virus

Le rôle des m⁶A a été également montré dans la réplication nucléaire des virus. Pour le virus du SIDA par exemple, une sous-expression des *writers* METTL3 et METTL14 permet de réduire la réplication du virus (Tirumuru et al., 2016). Il a également été montré qu'une sous-expression des protéines *reader* à domaine YTH inhibe la réplication (Kennedy et al., 2016; Lichinchi et al., 2016a). Concernant les maladies relevant de l'entérovirus 71, la mutation des sites m⁶A a permis le ralentissement de la production du virus. Les expériences de sous-expression de METTL3 ou surexpression de FTO ont confirmé ce résultat (Hao et al., 2019).

Par ailleurs, une diminution de la quantité de SAM, et donc de m⁶A par traitement au 3DAA (3-deazaadenosine) dans des cellules infectées par le virus de la grippe, diminue la quantité d'ARNm et donc la virulence du virus (Courtney et al., 2017).

Certains virus de l'herpès ont également des m⁶A dans leur génome. Pour le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi, la protéine *reader* YTHDC1 est essentielle pour l'épissage de ORF50, indispensable pour la réplication du virus et une sous-expression de YTHDF2 diminue le nombre de virions (Hesser et al., 2018). Le virus de l'herpès d'Epstein-Barr est aussi partiellement régulé par m⁶A. En effet, la protéine

METTL14 est surexprimée de manière drastique lorsque le virus est en latence puis sous-exprimée en phase lytique, ce qui facilite la tumorigenèse (Lang et al., 2019).

Le cycle de vie du virus de l'hépatite B est négativement régulé par m⁶A. Une sous-expression des protéines *writer* METTL3 et METTL14 augmente la synthèse protéique (Imam et al., 2018). Ce virus peut conduire au développement d'hépatocarcinome pour lesquels METTL14 a été montrée comme agissant en suppresseur de tumeur en modulant la méthylation m⁶A de miR-126 (Ma et al., 2017).

La prolifération des cellules semble également être contrôlée par m⁶A pour le papillomavirus. Une étude a montré qu'une surexpression de METTL3 ou une sous-expression de FTO inhibait le développement des cellules infectées par ce virus (Wang et al., 2017).

Enfin, la réplication du virus Zika est aussi dépendante de la méthylation m⁶A. Pour Zika, une sous-expression des protéines *writer* augmente la production du virus (Lichinchi et al., 2016b).

2.4 m⁶A et neurologie

La méthylation m⁶A est importante dans le neurodéveloppement. Il a été montré que les m⁶A sont particulièrement enrichies dans le cerveau (Meyer et al., 2012). De nombreux transcrits, connus pour être modifiés, ont été associés à de nombreux désordres neurologiques, allant de l'autisme (Washbourne, 2015) à la maladie d'Alzheimer (Han et al., 2020) par exemple. Il a également été montré qu'une mutation de la protéine FTO, induisait une diminution du volume du cerveau chez l'homme (Ho et al., 2010).

2.4.1 Rôle des m⁶A dans le développement du cerveau

La régulation du développement du cerveau et notamment du cervelet se fait de manière m⁶A dépendante. En effet, la méthylation m⁶A est contrôlée de manière spatio-temporelle, les acteurs de la méthylation ont également une expression spatio-temporelle spécifique durant le développement du cervelet (Ma et al., 2018). Par ailleurs, une délétion de la protéine METTL3 est létale pour l'embryon. Si METTL3 est inactivée dans le cerveau des embryons uniquement, les souris montrent des défauts du développement. Au niveau moléculaire, METTL3 méthyle des ARNm dont la stabilité est importante pour le développement du cervelet, et des ARNm qui doivent

subir un épissage alternatif pour le bon développement des synapses (Wang et al., 2018).

2.4.2 Rôle des m⁶A dans la plasticité synaptique

Il a été montré qu'une délétion de la protéine *reader* YTHDF2 est létale dans les étapes tardives de l'embryogenèse chez la souris (Li et al., 2018c). Des neurones *YTHDF2*^{-/-} sont incapables de produire des neurites fonctionnels : les ARNm responsables de la différenciation des neurones semblent être dégradés. Les embryons de souris *YTHDF1*^{-/-} quant à eux se développent normalement mais les souris présentent par la suite des difficultés d'apprentissage lorsque l'hippocampe est stimulé (Shi et al., 2018). La ré-expression de YTHDF1 dans l'hippocampe de ces souris rétablit les défauts synaptiques engendrés par le KO. Ces dernières présentent des défauts de densité post-synaptique, et il a été montré qu'une sous-expression de YTHDF1 dans des neurones de l'hippocampe réduit la transmission synaptique (Merkurjev et al., 2018). La protéine FMRP, protéine clé du syndrome du X fragile, s'est révélée être une protéine *reader* de m⁶A. Elle permet la régulation de la traduction d'ARNm dans les synapses en réponse notamment à l'activation des récepteurs à glutamate (Bassell and Warren, 2008). Les auteurs ont montré une altération des fonctions synaptiques en l'absence de FMRP. Plus récemment, il a été rapporté que la régulation de la traduction de certains ARNm, notamment ceux menant au syndrome du X fragile, était en fait médiée par YTHDF2, elle-même reconnu par FMRP (Zhang et al., 2018a). La plasticité synaptique peut également être modulée *via* la protéine anti-*reader* G3BP, associée aux granules de stress. En effet, des souris *G3BP*^{-/-} montrent des défauts de comportement, notamment dans la mémoire spatiale et ont une augmentation de la plasticité synaptique (Martin et al., 2013).

Dans la maladie d'Alzheimer, le processus de modulation synaptique est une clé des études concernant cette maladie. La méthylation m⁶A est augmentée dans le cortex et l'hippocampe de souris modèles pour la maladie (Han et al., 2020). Les chercheurs ont constaté que METTL3 est également surexprimée alors que FTO est sous-exprimée chez ces souris ; les niveaux de m⁶A sur les ARNm importants pour la croissance synaptique sont différents (elles peuvent être surreprésentées ou sous-représentées selon l'ARNm chez les souris développant la maladie d'Alzheimer).

La plasticité synaptique est dépendante de l'expression de nombreux gènes et de la traduction d'ARNm localement produisant des protéines importantes pour les

synapses. Les modifications des ARN, et plus particulièrement les m⁶A sont désormais connues comme étant des régulateurs de ces mécanismes.

2.4.3 Rôle des m⁶A dans la régénération des axones

De nombreuses études ont montré l'importance de la régulation de la transcription pour la croissance des axones (Liu et al., 2011; Moore and Goldberg, 2011; Tedeschi and Bradke, 2017). Plus récemment, les modifications épigénétiques ont également été montrées comme essentielles à ce mécanisme (Cho et al., 2013; Finelli et al., 2013; Gaub et al., 2011; Puttagunta et al., 2014; Weng et al., 2017). De plus, le rôle de l'épitranscriptome et notamment de la méthylation m⁶A a été mis en évidence. En effet, le niveau de m⁶A est augmenté dans le système nerveux périphérique afin d'augmenter la traduction protéique de certains ARNm, notamment des gènes associés à la régénération (RAG), *via* YTHDF1 (Weng et al., 2018).

2.4.4 Rôle des m⁶A dans l'apprentissage et la mémoire

La présence en excès de METTL3 dans l'hippocampe a été liée à une meilleure capacité d'apprentissage et une meilleure consolidation de la mémoire à long terme (Zhang et al., 2018b). La délétion conditionnelle (système CRE-LOX) de METTL14 dans des cellules neuronales de striatum (impliquées dans le mouvement volontaire et les comportements appétitifs) murines entraîne une diminution de la méthylation m⁶A, sans altérer ni la prolifération ni la morphologie des cellules, mais en augmentant l'excitabilité des neurones et en diminuant leur comportement striatal (difficulté de réponses sensorimotrices par exemple) (Koranda et al., 2018).

Le rôle de la protéine FTO a également été mis en évidence dans la formation de la mémoire hippocampique chez la souris. En effet, FTO est exprimée dans le noyau et les dendrites des neurones hippocampiques. La présence de cette protéine est dépendante du contexte neuronal, une plus forte sous-expression étant observée au niveau des synapses. Une sous-expression artificielle de FTO par shARN ou la technologie CRISPR/Cas9 a augmenté la mémoire de la peur chez les souris (Walters et al., 2017). Enfin, la protéine PRRC2A, qui semble être une protéine *reader* spécifique des cellules neuronales, semble contrôler la spécification des oligodendrocytes ainsi que la myélinisation (Wu et al., 2019). Un défaut de PRRC2A induit des défauts cognitifs chez la souris.

La méthylation m⁶A est donc importante au niveau moléculaire pour la maturation des ARN. En effet, les m⁶A permettent le recrutement de nombreuses protéines responsables de la régulation de la transcription, l'épissage, la stabilité ou encore la traduction des ARNm. Une dérégulation de cette marque épitranscriptomique a des conséquences phénotypiques notamment démontrées dans le cas de cancer ou de maladies neurodégénératives.

2.5 Rôle des micronutriments dans la méthylation m⁶A

Les micronutriments ne sont pas produits par le corps humain, ils doivent être apportés par l'alimentation. Même s'ils ne sont nécessaires qu'en petites quantités, les carences en micronutriments peuvent avoir de graves conséquences à tous les stades de la vie, allant du développement de l'enfant au vieillissement. De manière globale, plus de 2 milliards de personnes souffrent d'une carence pour au moins un nutriment. La moitié d'entre eux sont des enfants âgés de 6 mois à 5 ans. Il est admis qu'une bonne alimentation permet d'éviter et/ou de retarder l'apparition de ces maladies. L'apport en micronutriments, et plus particulièrement en vitamines B9 et B12, a notamment été montré comme retardant l'évolution des maladies neurodégénératives (Zhang et al., 2017).

Dans le cas de la m⁶A, son niveau varie effectivement selon les apports en nutriments (Li et al., 2016a; Yang et al., 2018). En effet, la protéine FTO a été identifiée comme étant une déméthylase de m⁶A (Gerken et al., 2007; Zhang et al., 2019). Cette protéine a un rôle central dans les maladies du métabolisme (Cao et al., 2016). Des polymorphismes dans le premier intron de son gène ont été associés à un risque accru de développer une obésité chez l'enfant ou chez l'adulte (Frayling et al., 2007; Meyre et al., 2010). Chez les sujets homozygotes pour ce variant allélique, il existe un risque accru de prise alimentaire *ad libitum*, et chez l'enfant des comportements associés au développement de l'obésité. Des souris transgéniques ont permis de montrer le rôle de FTO dans la régulation de la prise de poids : des souris qui surexpriment FTO sont obèses alors que celles qui la sous-expriment sont maigres (Fischer et al., 2009). Différentes études ont montré que le régime alimentaire (restriction ou régimes riches en lipides ou en glucides) affecte la quantité de m⁶A en affectant FTO ou METTL3. Il a également été montré que le jeûne implique une augmentation de la quantité de l'ARNm de FTO ainsi que de sa quantité protéique dans des hypothalamus de rats

(Vujovic et al., 2013). De plus, FTO est délocalisée dans le cytoplasme de certains neurones à cause d'un défaut de phosphorylation.

De manière importante, FTO est impliquée dans la NAFLD, la maladie chronique du foie la plus répandue dans le monde. Le caractère hépato-protectif de la bétaine (Tableau 3) a été montré dans un modèle animal de NAFLD (Ji and Kaplowitz, 2003; Kharbanda et al., 2005). La bétaine étant également une molécule permettant la synthèse de la SAM, elle peut être responsable de modulation de l'expression des gènes à travers les modifications épigénétiques. Ainsi, une supplémentation en bétaine empêche l'augmentation du taux de triglycérides, AST et ALT dans le sérum dans un modèle de rat développant une NAFLD induite par un régime riche en lipides durant 6 semaines (Chen et al., 2015). La supplémentation en bétaine permet de restaurer le taux de SAM dans le foie, résultant en une augmentation de la quantité de m⁶A et une expression réduite de FTO (Chen et al., 2015). Des résultats similaires ont été trouvés dans le tissu adipeux de souris nourries avec un régime riche en lipide pendant 8 semaines. Une supplémentation en bétaine restaure le taux de m⁶A et l'expression de gènes responsables de l'altération de l'oxydation des acides gras et de la lipogénèse causées par le régime (Zhou et al., 2015). Le mécanisme semble impliquer la voie AMPK (AMP-activated protein kinase) puisque chez les souris *Ampk*^{-/-}, la supplémentation en bétaine n'a aucun effet. Cependant le mécanisme précis n'a pas encore été élucidé, et un rôle direct de la bétaine sur la méthylation des ARNm n'est pas encore écarté.

Par ailleurs, la plupart des ARN-méthyltransférases utilisent la molécule SAM comme donneur universel de groupement méthyle. Le niveau de MAT2A (la synthétase de SAM, Figure 5) est régulé via une structure tridimensionnelle en épingle dans la 3'-UTR, selon la disponibilité en méthionine des cellules. Cette régulation se fait *via* la méthylation m⁶A qui promeut un épissage alternatif avec une rétention d'intron (Pendleton et al., 2017). De plus, la protéine *reader* YTHDC1 va permettre la dégradation de l'ARNm de MAT2A à travers la disponibilité de SAM (Shima et al., 2017). En cas de forte présence de SAM, l'ARNm de MAT2A sera méthylé, la protéine YTHDC1 recrutée et l'ARNm dégradé. Ici, la réaction de méthylation n'est pas catalysée par METTL3 mais par METTL16. Cette découverte d'un mécanisme de *feedback* montre l'importance de la régulation du niveau de SAM.

Ces données suggèrent que les méthylations des ARN sont importantes pour la maturation de ces derniers ainsi que pour le métabolisme cellulaire. Une perturbation des modifications épigénétiques due à un régime carencé en micronutriments, tels que les vitamines B, peut entraîner des conséquences pathologiques pour la cellule et l'organisme. Une prise alimentaire adéquate, en particulier en micronutriments est essentielle pour assurer une bonne régulation épitranscriptomique.

Objectifs de travail

L'épigénétique est une discipline en pleine expansion. De nombreuses études ont montré que la régulation fine de l'expression des gènes se fait par des mécanismes épigénétiques, définis classiquement par (1) la méthylation de l'ADN qui permet la compaction ou décompaction de la chromatine ainsi que le recrutement de facteurs de transcription, (2) les modifications post-traductionnelles des protéines histones qui modulent également la compaction de la chromatine, (3) la régulation de l'expression des gènes par les ARN non codants, par ARN interférence notamment. Très récemment, une nouvelle notion est venue s'ajouter aux trois précédemment décrites et qui sont les plus étudiées, il s'agit de l'épitranscriptome. Sans être une modification épigénétique *stricto sensu*, l'épitranscriptome (les modifications chimiques des ARNm) module le recrutement des protéines responsables des étapes de maturation de ces derniers.

Les vitamines B9 et B12 sont importantes pour le bon fonctionnement du métabolisme des monocarbones, responsable de la synthèse de SAM, le donneur universel de groupement méthyle. Ainsi, cette molécule est essentielle pour la méthylation de nombreuses molécules telles que l'ADN, les protéines et les ARN, et donc pour les modifications épigénétiques. Il est désormais admis qu'une carence en vitamines B9 et/ou B12 a des conséquences au niveau neurologique, avec un risque accru de développer les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, de la dépression ou de la schizophrénie (Arora et al., 2019; Balashova et al., 2018; McCarter et al., 2019). Il est également connu qu'une carence en vitamine B9 augmente le risque de *spina bifida in utero*, c'est pourquoi les femmes sont supplémentées en vitamine B9 en période péri-conceptionnelle.

Dans ce contexte, mon projet de thèse se propose de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des phénotypes observés en cas de carence en vitamines B9 et B12, tels que les défauts d'apprentissage ou de locomotion chez la souris, d'un point de vue épigénétique.

Pour cela, le travail a été divisé en 2 parties :

1) L'étude de l'épitranscriptome m⁶A

Dans un premier temps, notre hypothèse de travail est que la modulation de la méthylation m⁶A pourrait avoir un impact sur les étapes de maturation des ARNm et donc des effets délétères pour la cellule. Nous avons décidé d'étudier la modification m⁶A des ARNm car c'est la plus fréquente et la mieux décrite pour les ARNm. Dans cette partie, nous nous sommes concentrée sur une carence stricte en vitamine B12 grâce à un modèle unique développé au laboratoire. Après étude du niveau de SAM, nous avons étudié par western blot, qPCR et immunofluorescence les acteurs protéiques du mécanisme m⁶A en cas de carence, ainsi que les modifications post-traductionnelles de la méthyltransférase METTL3 afin d'identifier les raisons d'une éventuelle perturbation de la méthylation m⁶A en cas de carence en donneurs de méthyles. Cette méthylation a été étudiée de manière globale sur les ARNm ainsi qu'au niveau local, sur des ARNm cibles des protéines *reader* à domaine YTH. Nous avons vérifié nos résultats dans un modèle de fibroblastes humains disponibles au laboratoire ainsi que dans un modèle de fibroblastes d'embryons de souris carencées développé durant ma thèse.

2) L'étude de la méthylation des protéines histones

Le modèle d'étude est un modèle de rats ayant subi une carence précoce (gestationnelle et pendant les 21 premiers jours de vie) en donneurs de méthyles. Cette étude s'inscrit dans le cadre de l'étude de la programmation fœtale suite à une carence en vitamines B9 et B12. Dans la continuité du travail de thèse de Jérèmy Willekens au laboratoire, nous avons étudié par western blot des marques histones choisies en fonction de précédents résultats ainsi que de la littérature. Nous avons vérifié l'expression des ARNm des méthylases et déméthylases responsables de ces marques histones. Nous proposons également l'étude d'un cluster de miR montré comme responsable de la régulation de l'expression des méthylases et déméthylases. Enfin, nous avons vérifié nos résultats dans un modèle cellulaire de rat avec des expériences de surexpression de miR.

Pris dans son ensemble, mon projet de thèse a donc eu pour but d'améliorer et d'enrichir les connaissances théoriques permettant d'établir un lien entre défauts de synthèse en donneurs de méthyles, et apparition de maladies neurodégénératives, *via* des modulations épigénétiques engendrées par ces déficits en SAM.

Matériel et méthodes

1 Culture cellulaire

1.1 Culture des modèles murins

Les cellules génétiquement modifiées OT/TO : Les cellules N1E-115 (ATCC®CRL-2263™) proviennent d'un neuroblastome murin. Les cellules sont transfectées de manière stable et expriment soit la protéine chimère Transcobalamine-Oléosine (TO : modèle de déficience en vitamine B12), soit Oléosine-Transcobalamine (OT : modèle contrôle) (Figure 7).

Les embryons de souris Cd320 (MEFs) : Les fibroblastes d'embryons de souris contrôles ou *Cd320*^{-/-} ont été générés suivant le protocole publié de Tan and Lei en 2019 (Tan and Lei, 2019). Deux souris WT ainsi que 2 souris KO *Cd320*^{-/-} ont été croisées ensemble et les embryons ont été récupérés à E15.5. Le cœur et le foie sont éliminés et le tissu mésenchymateux est haché finement et placé dans la trypsine pendant 24h à 4°C. Après une incubation de 10 min à 37°C et une centrifugation à 500 xg, les cellules (ci-après dénommées MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*)) sont reprises dans du milieu de culture et mises en culture. Les cellules subissent une crise de croissance à partir de passage 6. Une fois la crise de croissance terminée, les cellules sont immortalisées.

Les cellules sont cultivées dans le milieu *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM Sigma ®) avec 4,5 g/L de glucose, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de pénicilline et streptomycine (P/S). La pression de sélection des cellules OT/TO uniquement est maintenue par l'ajout de G418 (1 mg/mL) dans le milieu de culture. Les cellules prolifèrent à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

1.2 Culture du modèle humain

Les fibroblastes (contrôles ou CblG/CblG*) proviennent du Centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme de la région Grand-Est, du CHRU de Nancy, de l'Hôpital universitaire pour enfants de Zürich et de l'Université McGill. Les cellules sont cultivées dans le milieu *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM Sigma ®) avec 4,5 g/L de glucose, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de pyruvate

et 1% de pénicilline et streptomycine (P/S). Les cellules sont passées 1 fois par semaine, le milieu est changé tous les 3 jours.

2 Clonage

Les cellules N1E-115 sont transfectées au JetPei® (Polyplus), selon les recommandations du fournisseur, avec la construction correspondante (OT ou TO). Le clonage est réalisé grâce à des anneaux de clonage. Les lignées sont vérifiées une fois par mois (vérification de la présence des constructions par RT-PCR et de la fonctionnalité de la construction par un test de liaison à la vitamine B12 radioactive).

3 Test de liaison à la vitamine B12 radioactive

Les cellules sont lavées dans du PBS 1X, comptées et reprises dans du TBS 1X (Tableau 5) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 µg/mL; Sigma-Aldrich®). Les échantillons sont soniqués 3 fois 10s dans la glace pour lyser les cellules, et centrifugés à 14 000 xg à 4°C pendant 30 min pour précipiter les membranes cellulaires. Le culot est dissout dans 500 µL de TBS 1X (Tableau 5). De la Cobalamine marquée au [⁵⁷Co] (ICN Pharmaceuticals®) est ensuite ajoutée aux échantillons (50 000 cpm). Après 20 min d'agitation à 4°C et un cycle de centrifugation de 15 min à 15 000 xg à 4°C, la radioactivité est comptée dans les culots et dans les surnageants au CobralI (Packard). La quantité de [⁵⁷Co] Cobalamine comptée est normalisée par rapport au nombre de cellules.

4 Les dosages SAM/SAH

Les cellules sont récupérées à confluence et lavées au PBS. Après centrifugation, les cellules sont conservées à -80°C. Le dosage SAM/SAH se fait par spectrométrie de masse réalisée par le service de Biochimie au CHU de Brabois Vandœuvre-lès-Nancy. Les métabolites sont séparés par chromatographie liquide ultra haute performance (HPLC). La détection se fait par spectrométrie de masse en tandem (MSMS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) positif. 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.

5 RT-PCR

Les ARN sont extraits avec le kit nucleospin® RNA plus (Macherey-Nagel) ou au Trizol™ en suivant les recommandations du fournisseur. La qualité des ARN est vérifiée par migration sur un gel d'agarose 1% non dénaturant. La quantité des ARN est mesurée par densité optique à 260 nm. La pureté est évaluée à l'aide des ratios des absorbances 260/280 et 260/230 (> 2).

RT : 1 µg d'ARN total (Vf=10 µL) est dénaturé 2 min à 95°C et remplacé immédiatement dans la glace. Les ARN sont rétro-transcrits en utilisant 1 µL (200U/uL) de l'enzyme M-MLV (Invitrogen), 4 µL de tampon 5X, 2 µL de DTT 100 mM (20 mM final), 1 µL d'oligo(dT)₁₂₋₁₈ (5 µM final) et 1µL de dNTP à 10 mM (0,5 mM final) dans un volume final de 20µL. Le mélange est incubé à 37°C pendant 50 min et chauffé à 70°C pendant 15 min pour dénaturer l'enzyme.

PCR :

La RT est diluée au 1/5^e. Deux µL d'ADNc sont incubés avec la Taq Platinum (ThermoFisher Scientific®) et son tampon supplémenté avec 1,5 mM de Mg²⁺ selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons sont amplifiés dans un thermocycleur (C1000 Thermal Cycler Biorad). Les conditions sont les suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie de 34 cycles de 30 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 55°C et 30 sec d'élongation à 72°C. Après une élongation finale de 15 min à 72°C, le produit PCR est déposé sur un gel d'agarose 2%.

Tableau 5 : Composition des tampons.

Tampon Gerdy	5 mM Tris-HCl pH 7,6 2 mM EDTA 0,5 % SDS
Tampon NaCl	150 mM NaCl 50 mM Tris
Tampon de migration	25 mM Tris 192 mM glycine 0,1 % SDS

	pH 8,3
Tampon de transfert Bjerrum Schafer-Nielsen	48 mM Tris 39 mM glycine 10% éthanol 0,0375 %SDS pH 9,2
Tampon de lavage (TBS)	20 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4 (+ 1mL Tween 20 : TBST)
PBS (10X)	Fournisseur : Sigma
Tampon d'ImmunoPrécipitation	10 mM Tris- HCl pH7,6 150 mM NaCl 0,1 % NP-40
Tampon d'éluion	10 mM Tris-HCl pH 7,6 450 mM NaCl 0,4% SDS
Tampon de fragmentation	100 mM Tris-HCl pH 6,8 2 mM MgCl ₂

6 Quantification de la quantité de m⁶A globale

Les ARNm sont purifiés avec le kit de purification des ARNm Dynabeads (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. La méthylation globale m⁶A de ces ARNm est ensuite analysée avec le kit EpiQuick m⁶A *RNA Methylation Quantification* (EpiGentek) selon les recommandations du fournisseur. Les ARNm se fixent au fond des puits grâce à une solution de fixation. La méthylation m⁶A est détectée par des anticorps de « capture » et de « détection ». Le signal est quantifié par colorimétrie, la quantité de m⁶A est proportionnelle à la densité optique.

7 Immunofluorescence

Deux cent mille cellules sont ensemencées dans une plaque 6 puits contenant des lamelles traitées avec de la poly-L-lysine. Après deux jours d'incubation, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 10 min. Après 3 étapes de lavage au PBS 1X, les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS-Triton (0,01%) pendant 5 min. Après lavage, les épitopes des protéines sont bloqués par une solution de BSA 3% diluée dans du TBS (Tableau 5) pendant 1h. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 6) pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages au PBS-Tween 0,1 %, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor (Tableau 6). Après lavage et incubation de 5 min avec du DAPI (200 ng/mL), les lamelles sont montées sur lame avec un milieu de montage fluoromount (Thermofisher®). Les cellules sont observées soit au microscope à fluorescence (Olympus BX51WI) équipé d'une caméra Progres MF Cool, soit au microscope confocal (Nikon Eclipse Ti).

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés.

Anticorps	Poids moléculaire (kDa)	Fournisseur	Référence
Anti METTL3	64	Proteintech	15073-1-AP
Anti METTL3	64	Novus	NB100-77311
Anti-METTL14	52	Sigma	HPA038002
Anti-WTAP	50	Proteintech	10200-1-AP
Anti-FTO	58	Abcam	ab92821
Anti-HuR	32	Millipore	07-468
Anti-YTHDF1	60	Proteintech	17479-1-AP
Anti-YTHDF2	62	Proteintech	24744-1-AP
Anti-YTHDC1	84	Proteintech	14392-1-AP
Anti-Sumo1		Abcam	ab32058
Anti-Cdc2	30	Cell signaling	28439s
Anti-Phospho-Cdc2		Cell signaling	9114s

Anti-PRKCA	75	Abcam	ab32376
Anti-H3		Abcam	ab10799
Anti-H3K36me2	15,5	Abcam	ab9049
Anti-H3K36me3		Abcam	ab9050
Anti-H3K4me2		Abcam	ab10158
Anti-H3K9me3		Abcam	ab8898
Anti-H4	11,4	Abcam	ab10158
Anti-H4K20me3		Milipore	07-463
Anti-β-actine-HRP	45	Abcam	ab197277
Anti-α-tubuline-HRP	50	Abcam	Ab185067
Âne anti lapin IgG-HRP		Santa Cruz	SC2313
Âne anti souris IgG-HRP		Santa Cruz	SC2314
Alexa Fluor 488 âne anti souris IgG		Abcam	150105
Alexa Fluor 488 âne anti lapin IgG		Abcam	150065

8 Western Blot

Les cellules sont reprises dans du PBS 1X et après centrifugation (3 min à 300 xg) le culot est stocké à -80°C. Les culots sont repris dans 2 volumes de tampon Gerdy (Tableau 5) pour le modèle murin génétiquement modifié et soniqués 3 fois 10s, ou 2 volumes de tampon NaCl (Tableau 5) pour les cellules humaines et les cellules d'embryons de souris, laissés sur glace 30 min puis centrifugés 30 min à 12 000 xg à 4°C. La concentration protéique est déterminée par la méthode à l'acide bichoninique (Interchim®).

Les échantillons sont séparés sur un gel SDS-PAGE 10%. Les protéines sont transférées sur une membrane de PolyVinylidène Fluoride (PVDF) de 0,45 μ m (activée à l'éthanol 100%) grâce au transblot turbo (BioRad®) pendant 25 min à 25 V. Les membranes sont bloquées 1 h dans du lait 5% ou de la BSA 5% (dilués dans du TBST (Tableau 5)). Elles sont ensuite incubées 1h avec l'anticorps primaire (Tableau 6) à température ambiante. Après 3 étapes de lavage (10 min dans du TBST sous agitation), les membranes sont incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (Tableau 6) qui est couplé à la HRP (horseradish peroxydase). Le signal est révélé par chimioluminescence par le système ECL (BioRad®) et l'acquisition se

fait grâce à l'appareil fusion Fx7. Les analyses densitométriques sont réalisées sur le logiciel Image J.

9 Immunoprécipitation (IP)

Les cellules sont lysées dans du tampon d'IP (Tableau 5) supplémenté de 1% d'Igepal (NP-40), incubées 30 min sur glace puis centrifugées 30 min à 12 000 xg à 4°C. La quantité protéique est dosée par la méthode BCA (Interchim®). Cinq cent μg de protéines sont incubées avec 2 μL d'anticorps anti-METTL3 (Novus) (Tableau 6) pendant 1 h à 4°C sous agitation. Vingt-cinq μL de billes sont ajoutées et incubées sur la nuit à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées 4 fois avec du PBS 1X supplémenté de 20mM de N-Ethylmaleimide (Sigma). Les billes sont ensuite incubées avec 25 μL de SDS, 3 min à 95°C. Vingt-cinq μL de tampon Leammli (biorad) supplémenté au DTT (20X) sont ajoutés et les billes sont incubées 3 min à 95°C. Les billes sont ensuite éliminées.

L'analyse se fait par Western Blot.

10 m⁶A RNA Immunoprécipitation (RIP)

Vingt-cinq μL de Dynabeads® protéine G (ThermoFisher Scientific) sont lavées dans du tampon d'IP puis incubées pendant 1h30 à température ambiante avec 1 μg d'anticorps anti-m⁶A ((202003 Synaptic system; (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012)). Un μg d'ARN est ensuite incubé avec les billes en présence de RNase Out® (Thermofisher Scientific) dans un volume final de 250 μL de tampon d'IP (Tableau 5), pendant 2h30 à 4°C sur une roue. Les billes sont ensuite lavées cinq fois avec du tampon d'IP. Les ARN sont extraits avec du Phénol-Chloroforme et du tampon d'élution (Tableau 5) et précipités en ajoutant 2,5 volumes d'éthanol 100% et 0,5M d'acétate d'ammonium pendant une nuit à -80°C. Après 30 min de centrifugation à 4°C à 15 000 xg , les ARN sont lavés à l'éthanol 70% et repris dans 20 μL d'eau miliQ.

Huit μL d'ARN immunoprécipités ou 100 ng d'INPUT sont rétro-transcrits avec 2 μL de mix Takara® dans un volume final de 10 μL . Le mix est incubé 15 min à 37°C et 5 s à 80°C.

Les ADNc ainsi obtenus sont dilués au 1/5^e. Le premix SYBR green, le Rox (Takara®) et 10mM d'amorces (Tableau 7) sont ajoutées à 2 µL d'ADNc (Vf=20 µL) selon les recommandations du fournisseur. Les qPCR sont réalisées sur l'appareil StepOne Plus et les résultats sont analysés avec le logiciel StepOne (ThermoFisher®). La première étape du programme est l'activation de l'enzyme pendant 30 sec à 95°C, suivi de 45 cycles de 5 sec à 95°C et 15 sec à 60°C. La fluorescence est mesurée après l'étape d'élongation. L'analyse est faite par la méthode du « *fold enrichment* ».

Tableau 7 : Liste des oligonucléotides.

Gène	Hôte	Référence/Séquence
RPS14-SENS	Souris	5'-TGCCACATCTTTGCATCCTTC-3'
RPS14-ANTISENS	Souris	5'-ACTCATCTCGGTCAGCCTTCA-3'
CLPTM1-SENS	Souris	5'-ACAGAGGCAGGAGGGAAGCA-3'
CLPTM1-ANTISENS	Souris	5'-GTGGCACACAGCTAGCCACA-3'
TUBB3-SENS	Souris	5'-CGGCCATCCAGGAGCTGTTC-3'
TUBB3-ANTISENS	Souris	5'-CGGCCTCGGTGAACTCCATC-3'
NEU1-SENS	Souris	5'-GAAGGGCCGGCTCATTGTGT-3'
NEU1-ANTISENS	Souris	5'-CGCTCACTCCAGTGCCGTAG-3'
NEU1-201-SENS	Souris	5'-GCATTCAGAAACAGCGGGAGC-3'
NEU1-201-ANTISENS	Souris	5'-GTTGAAATCGTGATCGTGTTTGG-3'
NEU1-202-SENS	Souris	5'-CTTAACGAAACAGCGGGAGC-3'
NEU1-202-ANTISENS	Souris	5'-CGTGATCGTGTTTGGGCTG-3'
PRKCA-SENS	Souris	5'-GGCAGGGTCTGTGGAGGAGA-3'
PRKCA-ANTISENS	Souris	5'-TGCCCACTGAAGGCAGAGC-3'
OTG3		5'-ATGCCATAATACGACTCACTATAG GGAGAAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
miR-369-5p	Rat	MS00005768
miR-410-3p	Rat	MS00013601
miR-380-3p	Rat	MS00028084
miR-134-5p	Rat	MS00000364
KMT3A-SENS	Rat	5'-GGCAGCCTCCGTGGAAGTTT-3'
KMT3A-ANTISENS	Rat	5'-TCCTTGGACTGGGCCTGGAG-3'
KMT3B-SENS	Rat	5'-AGACAAGTCCCACGCCTCCT-3'

MATERIEL ET METHODES

KMT3B-ANTISENS	Rat	5'-GCCTGGGTGTTCTGGTCCAC-3'
KMT3C-SENS	Rat	5'-GGAAGGAGCCCTGA-3'
KMT3C-ANTISENS	Rat	5'-CCCGGCAGCTTTGTTCTCCA-3'
KMT2A-SENS	Rat	5'-TGACCAGCCCAAAGCACAGG-3'
KMT2A-ANTISENS	Rat	5'-GGCACTCAAGGTGGGCATGT-3'
KMT2C-SENS	Rat	5'-CCAGGCAGCTTTCTGGCAGT-3'
KMT2C-ANTISENS	Rat	5'-TCTGCCACCTCGTCCTGACA-3'
KMT2D-SENS	Rat	5'-CCGGAAGCCAACTGCACTGA-3'
KMT2D-ANTISENS	Rat	5'-CGGAAGGAGCGGAGAGCAAG-3'
KMT1D-SENS	Rat	5'-ATGAGCTGATGCGCCCTTCC-3'
KMT1D-ANTISENS	Rat	5'-GTTACCCGCCGTGCAGAAGT-3'
KMT2H-SENS	Rat	5'-CGACAGCAGCGAGACCTCAG-3'
KMT2H-ANTISENS	Rat	5'-GCTGCCACACCATGCACTTG-3'
KMT5A	Rat	qRnoCID0008043
KMT5B-SENS	Rat	5'-GACGAGGCAGTCCATGCCAA-3'
KMT5B-ANTISENS	Rat	5'-AAAGGCTTCGCCGGCTTTCT-3'
WHSC1-SENS	Rat	5'-GCGCCTCGACTGATGTGGAA-3'
WHSC1-ANTISENS	Rat	5'-CTCGAGTCCACCGACTGTGC-3'
KDM2A-SENS	Rat	5'-ACCGATGCCACTCTCCGACT-3'
KDM2A-ANTISENS	Rat	5'-CGAGTGGAAGACCCGACAGC-3'
KDM2B-SENS	Rat	5'-GATGGCATCCTCCGCCGAAA-3'
KDM2B-ANTISENS	Rat	5'-TCGGCGAGAGGTGAGAGGAG-3'
KDM4C-SENS	Rat	5'-CGAGCAGGTCTTGCCAAGGT-3'
KDM4C-ANTISENS	Rat	5'-CCGACTGCCCTGTGACCATC-3'
KDM3A-SENS	Rat	5'-GAACCTGATGCCACGCAGA-3'
KDM3A-ANTISENS	Rat	5'-GCCTGTTGGAGCAGGGACAA-3'
KDM3C-SENS	Rat	5'-TCCCAGGGCAGTGTTCTGT-3'
KDM3C-ANTISENS	Rat	5'-TGGTGGTAGGGCCAGCAGAT-3'
KDM5A-SENS	Rat	5'-GGGTAGGCTTGGCACCTCAC-3'
KDM5A-ANTISENS	Rat	5'-TACTGTGCCGTGGTCTTGCC-3'
KDM6A-SENS	Rat	5'-GCACAGGTTCCGGCCTACTGG-3'
KDM6A-ANTISENS	Rat	5'-TCTGGGACAGGCAGGTTGGA-3'

11 RT-qPCR

RT spécifique miR: Une queue poly(A) est ajoutée à 500 ng d'ARN total ($V_f=10 \mu\text{L}$) en utilisant 0,5 μL de poly(A) polymérase (New England Biolabs), 1 μL d'ATP, 0,5 μL de RNaseOUT, 2 μL de tampon 5X (de la M-MLV) et de l'eau. Le mélange est incubé 30 min à 37°C puis les ARN dénaturés 2 min à 95°C avant d'être replacés immédiatement dans la glace. Les ARN sont ensuite rétro-transcrits en utilisant 2 μL de tampon 5X, 2 μL de DTT 100 mM, 1 μL de M-MLV, 1 μL de primer OTG3 (Tableau 7) et 3 μL d'eau ($V_f=20 \mu\text{L}$). Le mélange est incubé 50 min à 37°C et 15 min à 70°C.

qPCR: Les ADNc ainsi obtenus sont dilués au 1/10^e. Le premix SYBR green, le Rox (Takara®) et 10mM d'amorces (Tableau 7) sont ajoutées à 2 μL d'ADNc ($V_f=20 \mu\text{L}$) selon les recommandations du fournisseur. Les qPCR sont réalisées sur l'appareil StepOne Plus et les résultats sont analysés avec le logiciel StepOne (ThermoFisher®). La première étape du programme est l'activation de l'enzyme pendant 30 sec à 95°C, suivi de 45 cycles de 5 sec à 95°C et 15 sec à 60°C. La fluorescence est mesurée après l'étape d'élongation. L'analyse est faite par la méthode du « *fold enrichment* ».

12 Statistiques

Les moyennes et les écarts-types (ou SEM) ont été calculés sur Microsoft® Excel 2016. Un F-test est fait pour vérifier l'égalité des variances, puis un T-test est réalisé pour calculer les *p*-values (**p*-value < 0,05, ***p*-value < 0,005, ****p*-value < 0,001).

Résultats/Discussion

Axe 1 : Etude de l'impact
d'une carence en vitamine B12
sur l'épitranscriptome m⁶A

Chapitre 1 : La méthylation m⁶A est perturbée dans le modèle d'étude OT/TO

Une carence stricte en vitamine B12 (et non en donneurs de méthyles, comme précédemment réalisée au laboratoire) est difficile à mettre en place sur une lignée cellulaire. Les concentrations en vitamine B12 requises par les cellules sont de l'ordre du pM. Certains milieux de culture, comme le DMEM, ne contiennent pas de vitamine B12 mais il est nécessaire de les supplémenter avec du sérum de veau foetal, qui lui en contient. La vitamine B12 est une petite molécule de 1,4 kDa mais qui est liée à des protéines de transport, comme la transcobalamine (~40 kDa), rendant la dialyse pour l'éliminer inefficace. Au laboratoire, une lignée de cellules génétiquement modifiées a été mise en place afin de contourner ce problème. Cette lignée de neuroblastome murin N1E-115 est transfectée avec une construction contenant l'Oléosine (une protéine provenant des plantes, pour éviter toute interaction non spécifique), se liant au réticulum endoplasmique, fusionnée à la transcobalamine, récepteur ayant la plus forte affinité pour la vitamine B12. La vitamine B12 se retrouve donc liée au réticulum endoplasmique, mimant un effet de carence pour la cellule (Figure 7)(Pons et al., 2009).

1 Les cellules TO présentent une carence en vitamine B12 et un défaut de SAM

Le premier objectif du projet était d'établir des clones OT (Oléosine-Transcobalamine, contrôles) et TO (Transcobalamine-Oléosine, carencés) et de vérifier l'efficacité de notre modèle cellulaire (Figure 7). En effet, nous avons pu constater que les clones (notamment OT) peuvent perdre la construction, malgré la pression de sélection au G418.

Nous avons vérifié dans un premier temps la présence de la construction dans chacune des lignées. Cette expérience est réalisée tous les mois afin de s'assurer que les cellules ne dérivent pas. Pour ce faire, une RT-PCR est réalisée pour amplifier l'ARNm chimère des constructions. Comme on peut le voir Figure 21, la construction OT est spécifiquement exprimée dans la lignée OT et la construction TO dans la lignée TO.

Le deuxième test de caractérisation du modèle est un test de liaison à la vitamine B12 radioactive. Les cellules transfectées avec la construction TO séquestrent la vitamine B12 au niveau du RE. Après lyse des cellules, incubation avec de la vitamine B12 radioactive et centrifugation, la vitamine B12 radioactive est attendue dans le surnageant des cellules contrôles (OT) et dans le culot des cellules carencées (TO). En effet, une plus grande quantité de radioactivité est comptée dans les culots cellulaires TO (Figure 21), confirmant que la protéine chimère TO est fonctionnelle. La vitamine B12 étant séquestrée au niveau du RE, elle n'est donc pas disponible pour remplir son rôle de cofacteur au niveau de la mitochondrie et du cytoplasme.

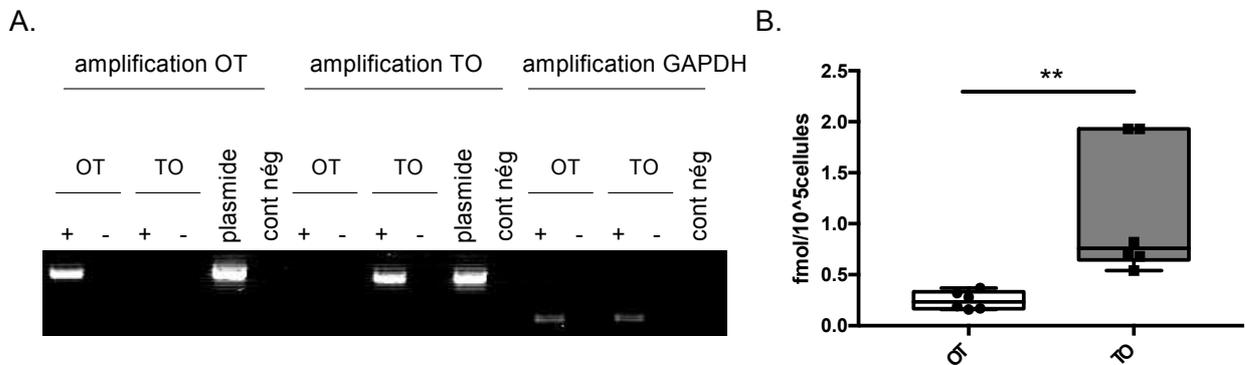


Figure 21 : Test de caractérisation des lignées OT/TO.

A. L'amplification des ARNm chimères est spécifique à chaque lignée. pOT, pTO : plasmides transfectés (contrôles positifs), cont nég : contrôle négatif. (-) : contrôle sans reverse transcriptase. La GAPDH est utilisée comme contrôle positif.

B. Test de liaison à la vitamine B12. Les résultats sont exprimés en fmol de [57Co]Cbl pour 10^5 cellules ($N=6$, $**p\text{-value} < 0,01$).

Dans le cytoplasme, la cobalamine est impliquée dans le transfert du groupement méthyle d'un folate à la méthionine, précurseur de la SAM. Une déficience en vitamine B12 devrait avoir pour conséquence une diminution de la quantité de méthionine et donc du donneur universel de méthyle, SAM (1.3). Pour vérifier cette propriété, nous avons mesuré la quantité de SAM et de SAH (Figure 22). La quantité de SAM diminue de manière significative dans la lignée TO comparée à la lignée OT (Figure 22). Ce résultat prouve l'efficacité du modèle ainsi que sa validité dans le but de tester notre hypothèse d'une sous-méthylation m⁶A.

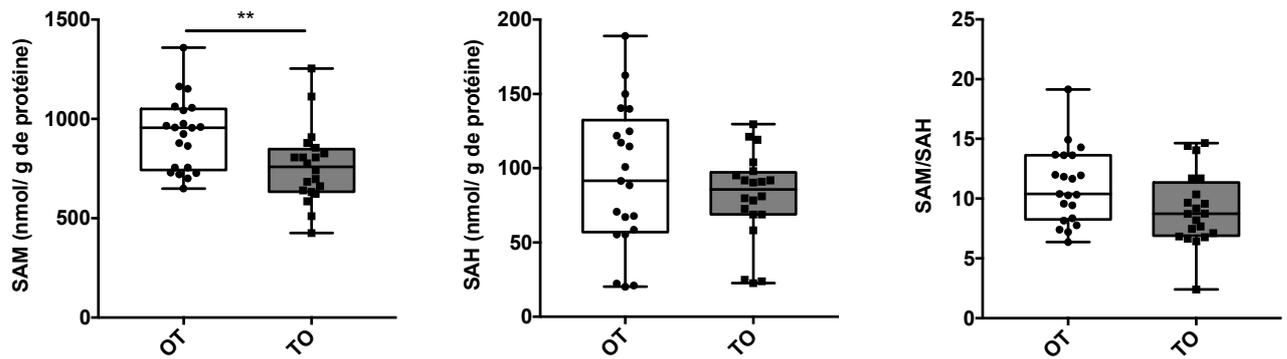


Figure 22 : Dosage SAM, SAH dans les cellules OT et TO.

Les mesures sont faites au CHU et corrigées par la quantité protéique (N=20, ** p-value < 0,01).

La lignée cellulaire TO mise au point au laboratoire permet donc de mimer une carence en vitamine B12, grâce à la séquestration de la vitamine au niveau du réticulum endoplasmique de ces cellules. La diminution de la synthèse de SAM fait de cette lignée un modèle de choix pour l'analyse des mécanismes tels que la méthylation m^6A . Elle a donc pu être utilisée afin de déterminer l'impact de la carence en B12 sur la méthylation m^6A des ARN et sur les mécanismes moléculaires permettant sa régulation.

2 Les cellules TO présentent un défaut de la méthylation m^6A

La quantité de SAM étant diminuée dans la lignée carencée (TO) (Pons et al., 2009) (Figure 22) comparée à la lignée contrôle (OT), nous avons décidé d'étudier la méthylation m^6A globale des ARNm dans ces 2 lignées. Pour ce faire, nous avons utilisé un kit colorimétrique pour mesurer le taux global de m^6A . Nous avons mesuré une diminution significative du taux global de méthylation m^6A des ARNm des cellules carencées en vitamine B12 (TO) comparées aux contrôles (OT) (Figure 23).

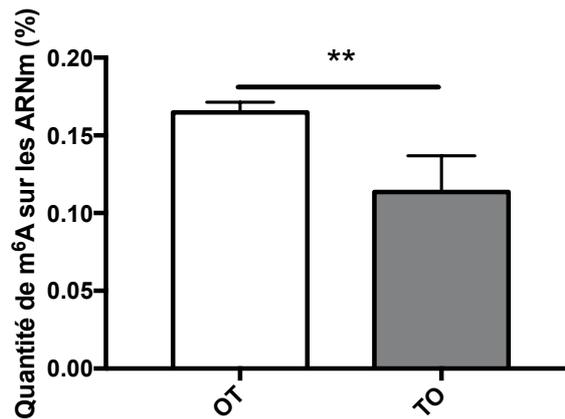


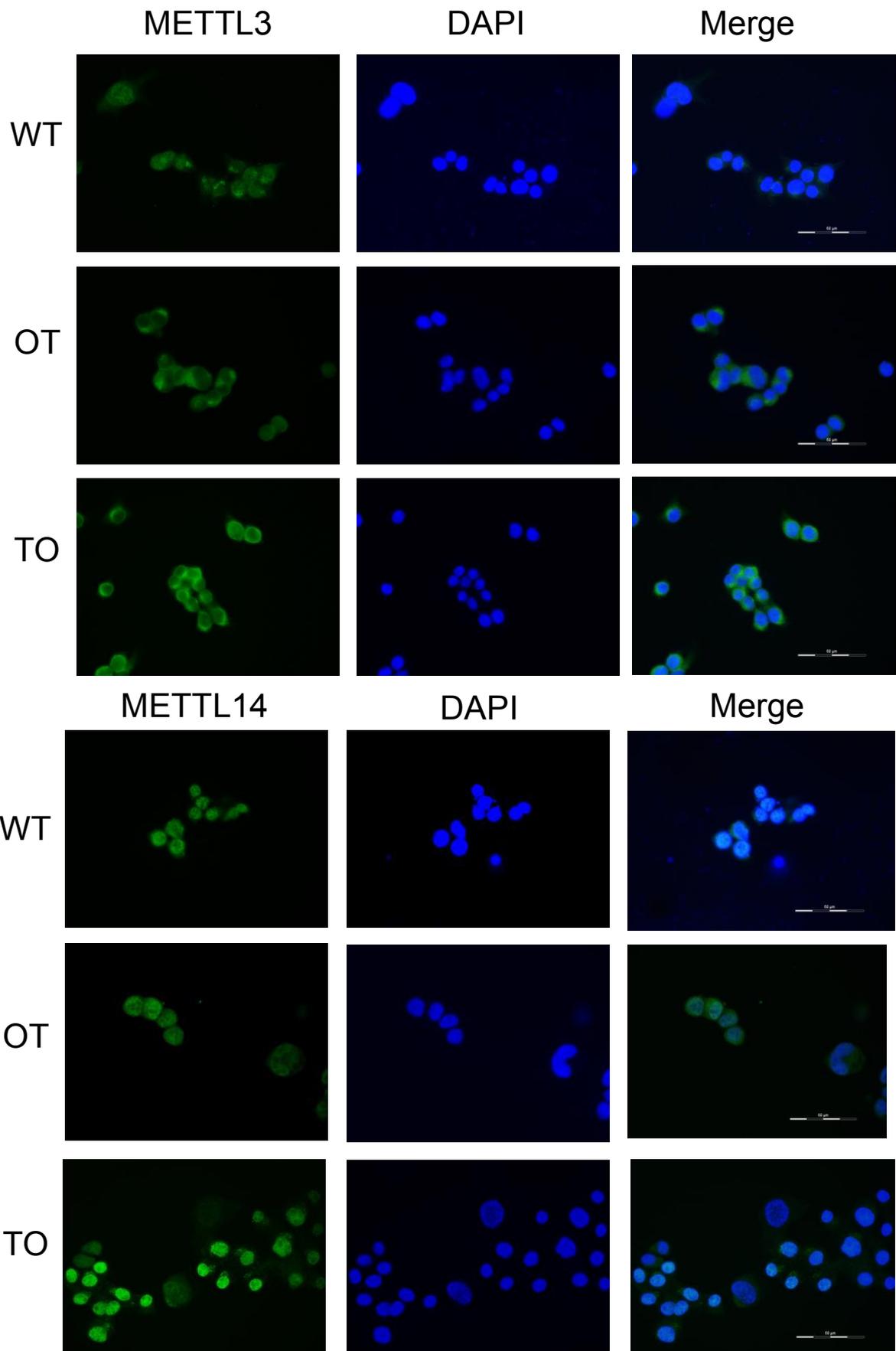
Figure 23 : Quantité de m⁶A sur les ARNm des cellules OT et TO.

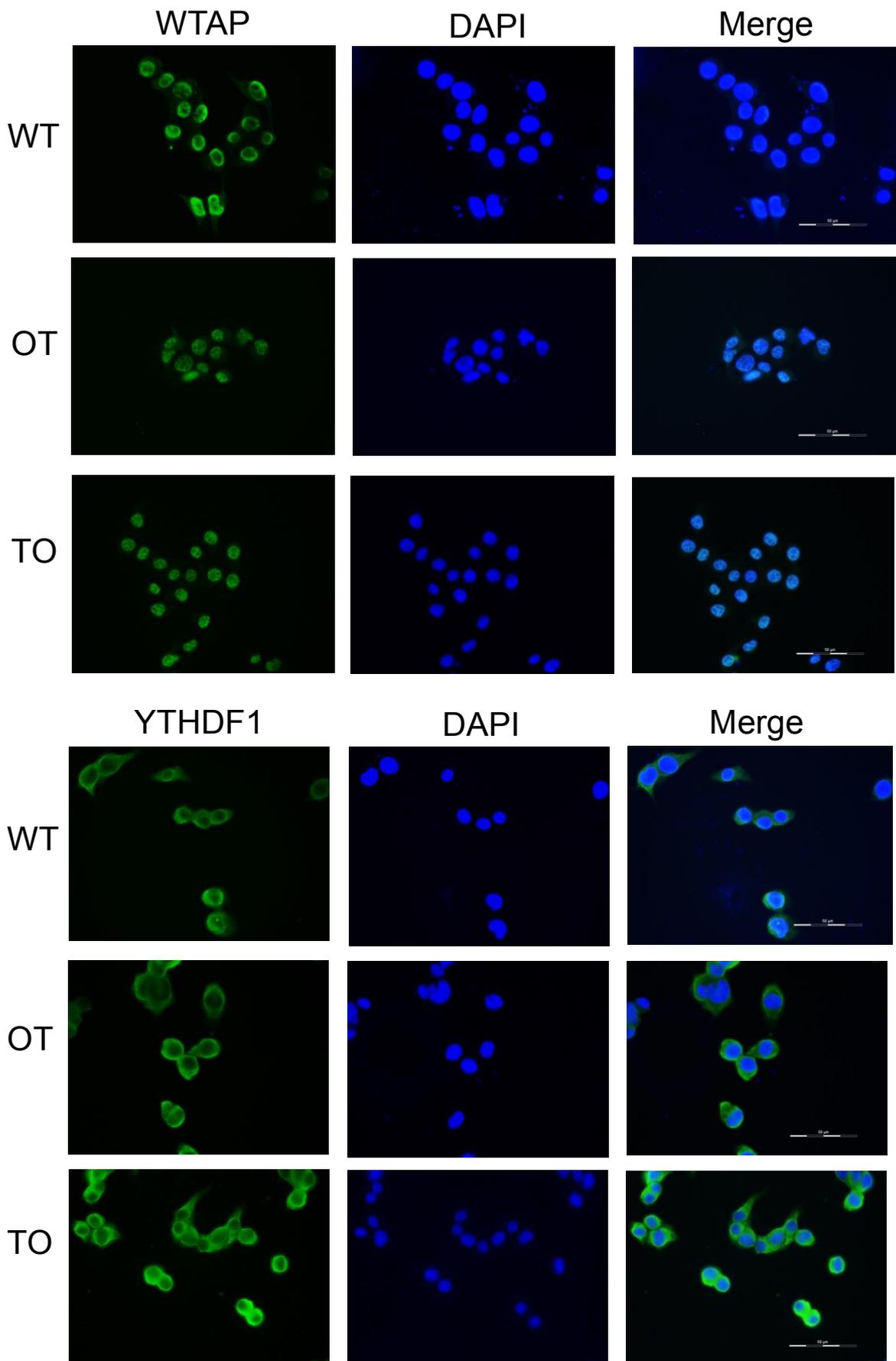
Le taux de m⁶A sur les ARNm a été mesuré à l'aide d'un test colorimétrique de type Elisa, basé sur l'utilisation d'un anticorps anti-m⁶A. (N=3, ** p-value < 0,01).

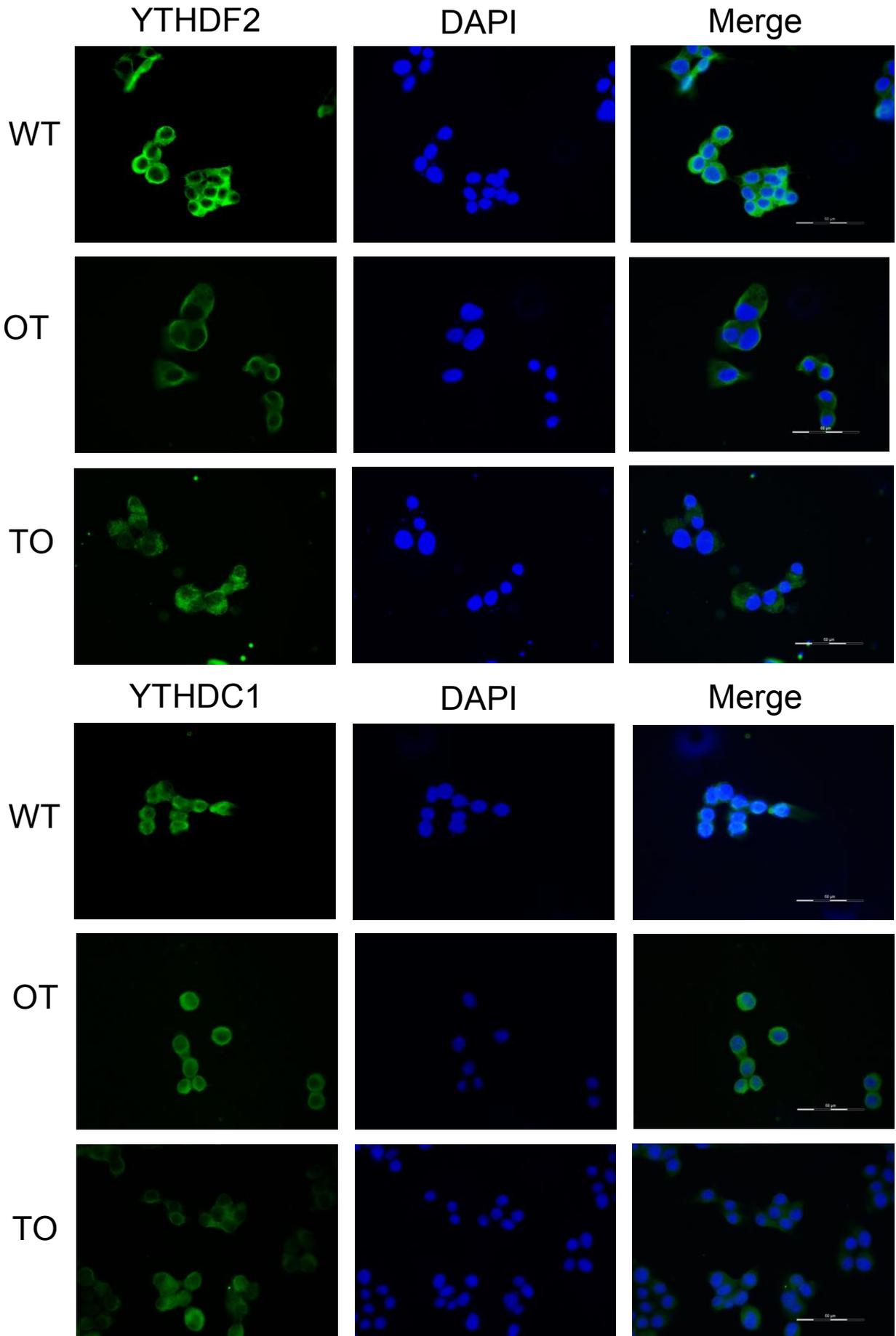
3 Une dérégulation des protéines *writer/eraser* peut également expliquer la dérégulation de la méthylation m⁶A

Une carence en vitamine B12 affecte la localisation de plusieurs RBPs telles que HuR (Battaglia-Hsu et al., 2018). Elle peut également entraîner des altérations au niveau des modifications post-traductionnelles (Battaglia-Hsu et al., 2018; Kerek et al., 2013). Nous avons donc décidé d'étudier la localisation et l'expression des protéines impliquées dans le mécanisme m⁶A, afin de déterminer si l'effet observé sur la méthylation des ARNm était causé par (i) la diminution du taux de SAM, et/ou (ii) par une délocalisation ou un changement d'expression des acteurs de cette modification suite à la carence.

Nous avons étudié la localisation des *writer* METTL3, METTL14 et WTAP qui sont des protéines nucléocytoplasmiques, des *reader* YTHDF1, YTHDF2 et de l'*eraser* FTO qui sont cytoplasmiques, ainsi que de la *reader* YTHDC1 qui est nucléaire. Aucune de ces protéines ne voit sa localisation affectée par la carence en vitamine B12 dans les clones OT et TO (Figure 24).







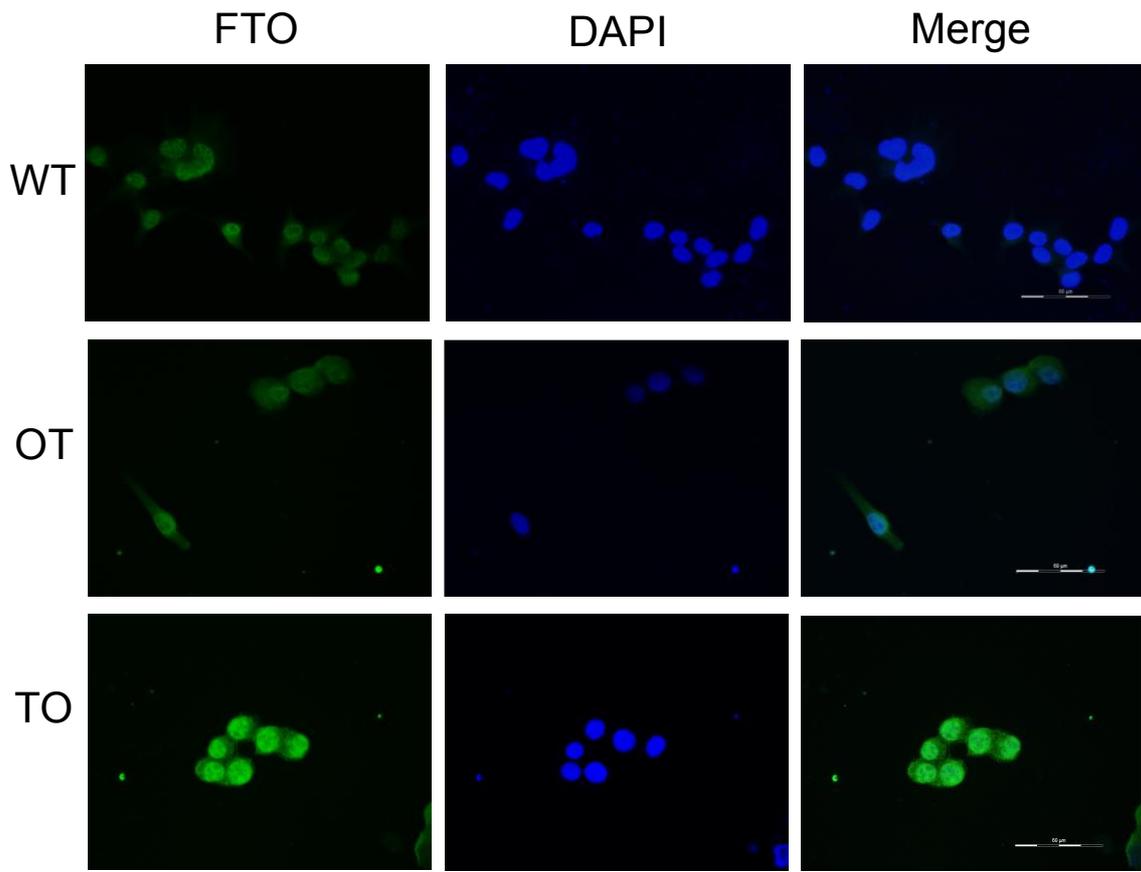


Figure 24 : Etude de la localisation des protéines impliquées dans le mécanisme m^6A .

Aucun changement de localisation n'est observé entre les cellules OT et TO. Les photos ont été prises avec un microscope à épifluorescence au grossissement $\times 60$ après un marquage aux anticorps d'intérêts et au DAPI.

Contrairement aux résultats attendus, la protéine YTHDC1 ne semble pas avoir une localisation nucléaire dans nos cellules. La pression de sélection étant maintenue par l'ajout de G418, ce traitement est responsable d'un stress du réticulum endoplasmique qui induirait une délocalisation de certaines protéines (Battaglia-Hsu et al., 2018). Nous avons étudié la localisation de cette protéine dans les cellules WT (non transfectées et cultivées en absence de G418) et nous avons montré également une localisation cytoplasmique de YTHDC1. La localisation de cette protéine n'est donc pas modifiée par la carence puisqu'elle est la même pour les 3 lignées cellulaires (WT, OT et TO).

Enfin, la stabilité protéique de ces acteurs a été étudiée afin de savoir si la diminution de la quantité de SAM est l'unique raison de la diminution de la méthylation m⁶A dans la lignée carencée (TO). Nous avons pu montrer une diminution de l'expression de la protéine *writer* METTL14 dans la lignée TO (carencée en vitamine B12) ainsi qu'une surexpression de l'*eraser* FTO (Figure 25). Une dérégulation du complexe *writer* et d'une *eraser* permettrait donc également d'expliquer la dérégulation de la méthylation m⁶A dans la lignée carencée en vitamine B12 (TO).

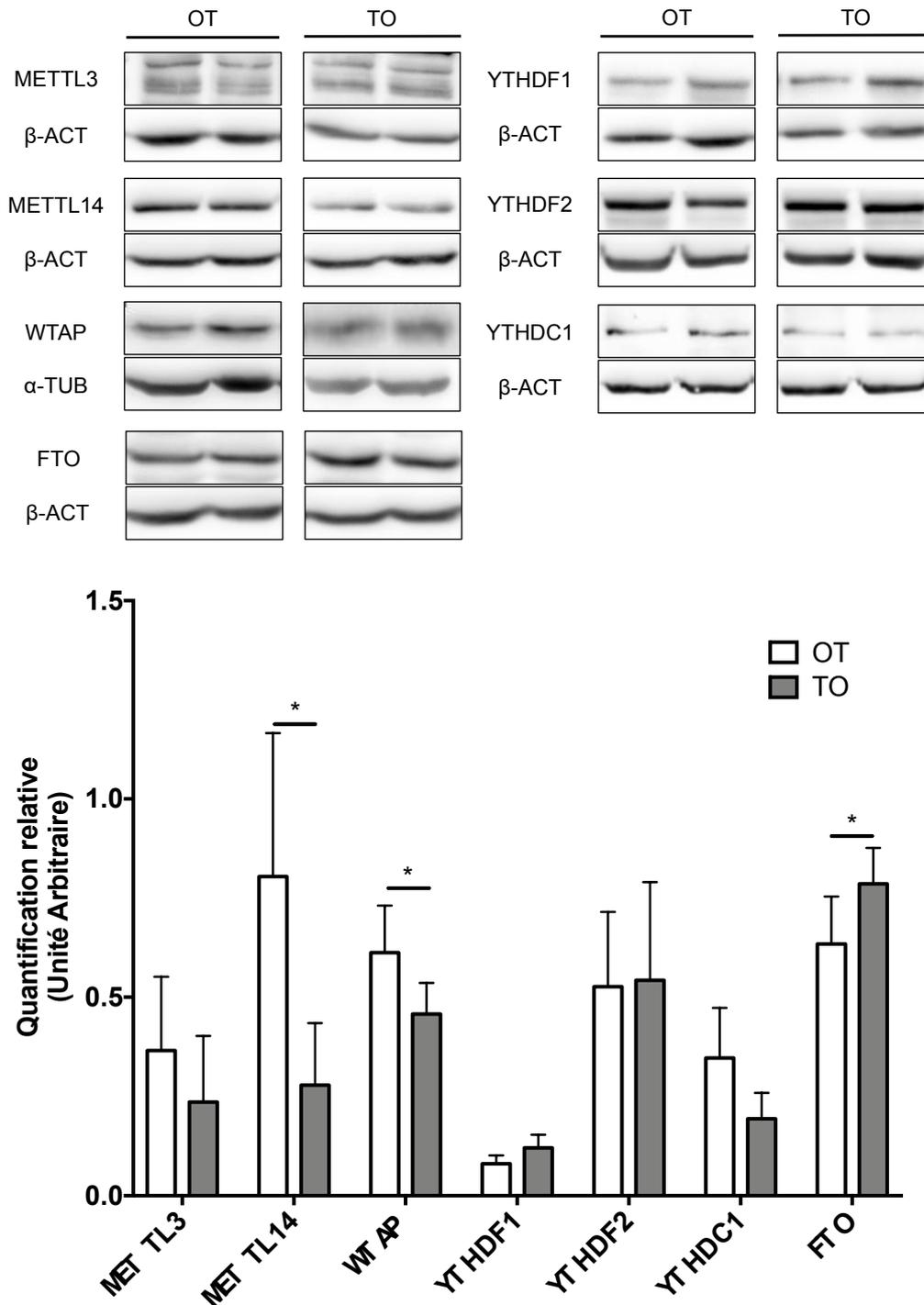


Figure 25 : Etude de l'expression des protéines impliquées dans le mécanisme m^6A dans les cellules OT/TO.

L'expression des différents acteurs du mécanisme m^6A a été analysée par western blot. Les valeurs sont corrigées par rapport à l'expression de la β -actine ou de l' α -tubuline. Les protéines METTL14 et WTAP sont sous-exprimées dans la lignée TO, la protéine FTO est surexprimée dans la lignée TO. $N \geq 3$, * p -value < 0,05.

L'expression des ARNm codants pour ces protéines a également été étudiée. Les résultats se sont révélés très variables d'une expérience à l'autre, ne permettant aucune conclusion (données non présentées).

Pour conclure, nous avons montré que la méthylation m⁶A peut également être perturbée par une dérégulation des protéines *writer* METTL14 et WTAP et de l'*eraser* FTO.

4 La sumoylation de la protéine METTL3 permet de réguler son activité méthyltransférase

La protéine METTL3 est une protéine qui subit des modifications post-traductionnelles. En effet, plusieurs bandes de haut poids moléculaire étaient régulièrement observées lors de l'analyse par western blot de METTL3. Or, il a récemment été montré que METTL3, la protéine *writer* du mécanisme m⁶A qui porte l'activité méthyltransférase, voit son activité régulée par sumoylation (Du et al., 2018). Cette modification inhiberait sa capacité à méthyler les adénosines en position 6. Par ailleurs, il a été montré qu'une carence en vitamine B12 pouvait être responsable de variations au niveau des modifications post-traductionnelles de certaines protéines telles que la méthylation et la phosphorylation de HuR (Battaglia-Hsu et al., 2018).

Nous avons dans un premier temps vérifié que les bandes de plus haut poids moléculaire ne correspondaient pas à des formes phosphorylées de METTL3. Un traitement des protéines à la phosphatase ne modifie pas le profil de migration obtenu pour les lignées OT et TO (Figure 26). Nous avons ensuite immunoprécipité METTL3 ; il semble que cette dernière est sumoylée uniquement dans la lignée carencée en vitamine B12 (Figure 26).

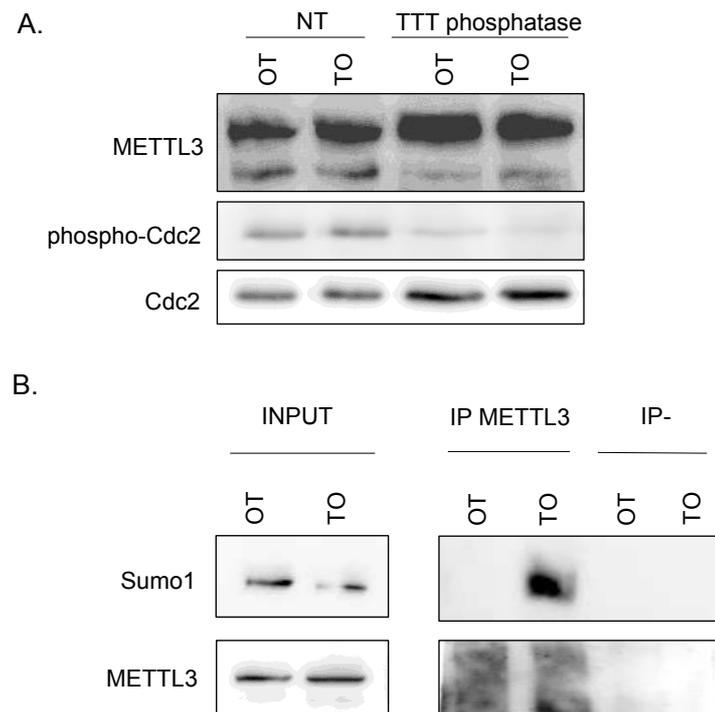


Figure 26 : La protéine METTL3 semble sumoylée en cas de carence en vitamine B12.

A. Suite à un traitement phosphatase, le profil de migration de METTL3 reste inchangé. Au contraire, le traitement à la phosphatase conduit à une diminution de la forme phosphorylée pour Cdc2.

B. L'immunoprécipitation de la protéine writer METTL3 suivie d'une révélation Sumo1 par western blot révèle que METTL3 est uniquement sumoylée en cas de carence en vitamine B12 (lignée TO).

Ces résultats restent préliminaires mais suggèrent que la carence en vitamine B12 aurait un impact sur la sumoylation de METTL3 qui pourrait également participer à la régulation de la méthylation m⁶A.

5 L'ARNm PRKCA est dérégulé en cas de carence en vitamine B12

Dans un second temps, nous avons voulu étudier la méthylation de quelques ARNm cibles de certaines protéines *reader*. Notre hypothèse est que la dérégulation de la méthylation de certains ARNm a des conséquences sur leur maturation qui pourrait au moins en partie expliquer les phénotypes observés en cas de carence en vitamine B12.

Une étude bio-informatique a été réalisée afin de choisir des ARNm différenciellement exprimés dans les cellules OT/TO qui seraient cibles des protéines *reader* à domaine YTH. Suite à cette étude, nous avons choisi 10 ARNm codant pour des protéines notamment impliquées dans des processus neurologiques ou le cytosquelette (Tableau 8).

Tableau 8 : Cibles des différentes RBP à domaine de liaison à l'ARN YTH.

RBP	Cibles testées
YTHDC1 YTHDF1	BDNF
YTHDC1 YTHDF2	STAM
YTHDF1	TUBB3
YTHDC1 YTHDF1 YTHDF2	NEU1
YTHDF1	PRKCA
YTHDF1	Wnt7b
YTHDC1 YTHDF1 YTHDF2	CLPTM1
YTHDC1 YTHDF1 YTHDF2	HK1
YTHDC2 YTHDF1 YTHDF2	MAPT
YTHDC1	CDK17

Par RT- qPCR, nous avons montré que la plupart de ces ARNm ne sont que très peu exprimés dans notre modèle cellulaire (données non présentées) ; en effet, le modèle utile pourrait être la différenciation de ces cellules en neurones. Cette étude a

néanmoins permis de vérifier la différence d'expression d'une seule des cibles choisies entre les cellules OT et TO, PRKCA (Figure 27). Nous avons traité nos cellules carencées à la SAM afin de vérifier si les différences observées étaient bien dues à la carence en vitamine B12. La surexpression de PRKCA dans la lignée carencée TO est bien corrigée par l'ajout de SAM dans le milieu de culture de ces dernières.

Quatre ARNm exprimés dans notre modèle cellulaire ont été testés suite à une expérience de RIP afin de déterminer si ces cibles sont différentiellement méthylées m⁶A. Parmi les protéines codées par les ARNm testés, on retrouve CLPTM1 (*cleft lip and palate associated transmembrane protein 1*) qui est impliquée dans la malformation de la fente labio-palatine ; NEU1, une neuroaminidase impliquée dans la sialidose qui est une maladie de surcharge lysosomale ; PRKCA (*protein kinase C alpha*) est impliquée dans la dystrophie myotonique et le développement de gliome neuronaux, et TUBB3 (*tubulin beta 3 class III*) impliquée dans des malformations du cerveau.

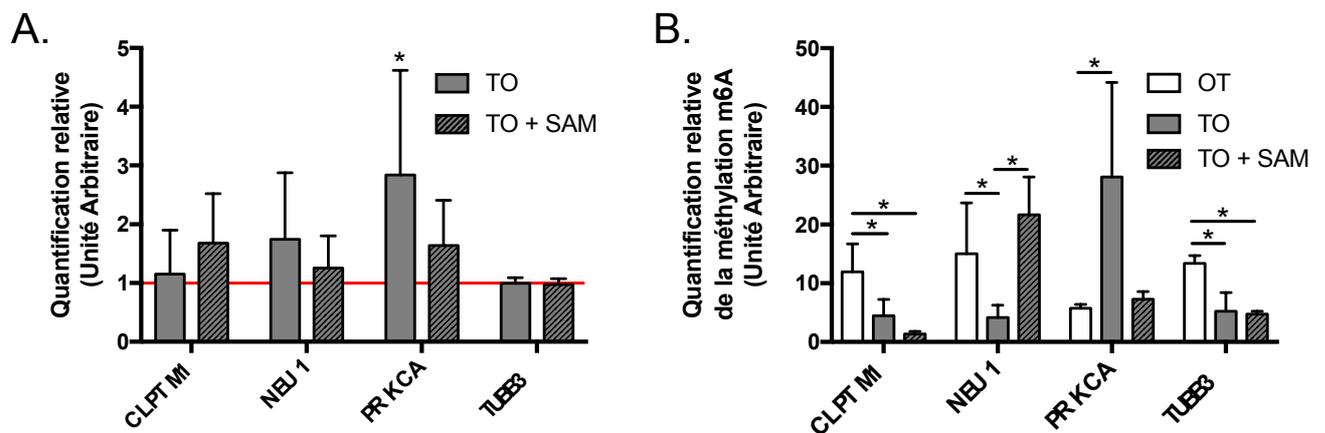


Figure 27 : Etude de la méthylation m⁶A sur les ARNm cibles des protéines reader à domaine YTH.

A. Niveau d'expression des 4 cibles choisies, la barre grise représente le niveau d'expression dans les cellules TO et la barre grise hachurée dans les cellules TO traitées à la SAM, par rapport aux cellules contrôles OT (ligne rouge).

B. Le niveau de méthylation est déterminé par RIP suivi d'une RT-qPCR. Les valeurs représentent la moyenne +/- SEM d'un triplicat biologique. *p-value < 0,05.

Les ARNm de CLPTM1, NEU1 et TUBB3 sont sous-méthylés dans les cellules carencées TO (Figure 27). Le traitement de ces cellules par la SAM intensifie la sous-méthylation de l'ARNm CLPTM1 et ne la corrige pas pour TUBB3. L'ARNm de NEU1 récupère un niveau de méthylation similaire à la situation contrôle après ajout de SAM. Au contraire, l'ARNm de PRKCA est sur-méthylé dans la lignée carencée, l'ajout de SAM restaure un niveau de méthylation similaire à la situation contrôle (Figure 27).

Nous avons décidé d'étudier la maturation de ces 2 ARNm (NEU1 et PRKCA) dont la méthylation semble être régulée par la carence en vitamine B12 (réponse au traitement à la SAM). NEU1 est une cible de YTHDC1 qui est décrite pour réguler l'épissage. L'ARNm de NEU1 se présente sous 2 isoformes. Nous avons utilisé des couples d'amorces permettant d'amplifier spécifiquement chacune des isoformes. Aucune modification de la présence de chacune des isoformes n'est observée en cas de carence, ou de traitement à la SAM (Figure 28).

PRKCA est la cible de YTHDF1 qui est décrite pour réguler la traduction. Nous avons donc étudié l'expression de la protéine PRKCA par western blot. Nous avons pu observer une surexpression de cette protéine dans la lignée cellulaire TO (carencée en B12) (Figure 28). La dérégulation de la méthylation m⁶A de cet ARNm semble donc avoir un effet sur sa traduction.

En résumé, une carence en vitamine B12 provoque une dérégulation de la méthylation m⁶A. L'étude de la méthylation m⁶A globale sur les ARNm totaux des cellules OT et TO montre une sous-méthylation globale en cas de carence. Néanmoins, au niveau local, on remarque que certains ARNm peuvent être surméthylés en cas de carence (PRKCA) ou sous-méthylés (CLPTM1, NEU1 et TUBB3). L'ajout de SAM dans le milieu de culture des cellules carencées TO permet de restaurer le phénotype des cellules contrôles OT dans le cas de PRKCA et NEU1, suggérant que la carence en vitamine B12 et la diminution de SAM qui en résulte, est bien responsable de ces différences de méthylation. La cible de YTHDF1, PRKCA, présente une augmentation de son expression dans la lignée carencée, qui pourrait être due au défaut de méthylation de son ARNm qui ne permettrait plus de recruter la *reader* YTHDF1 correctement.

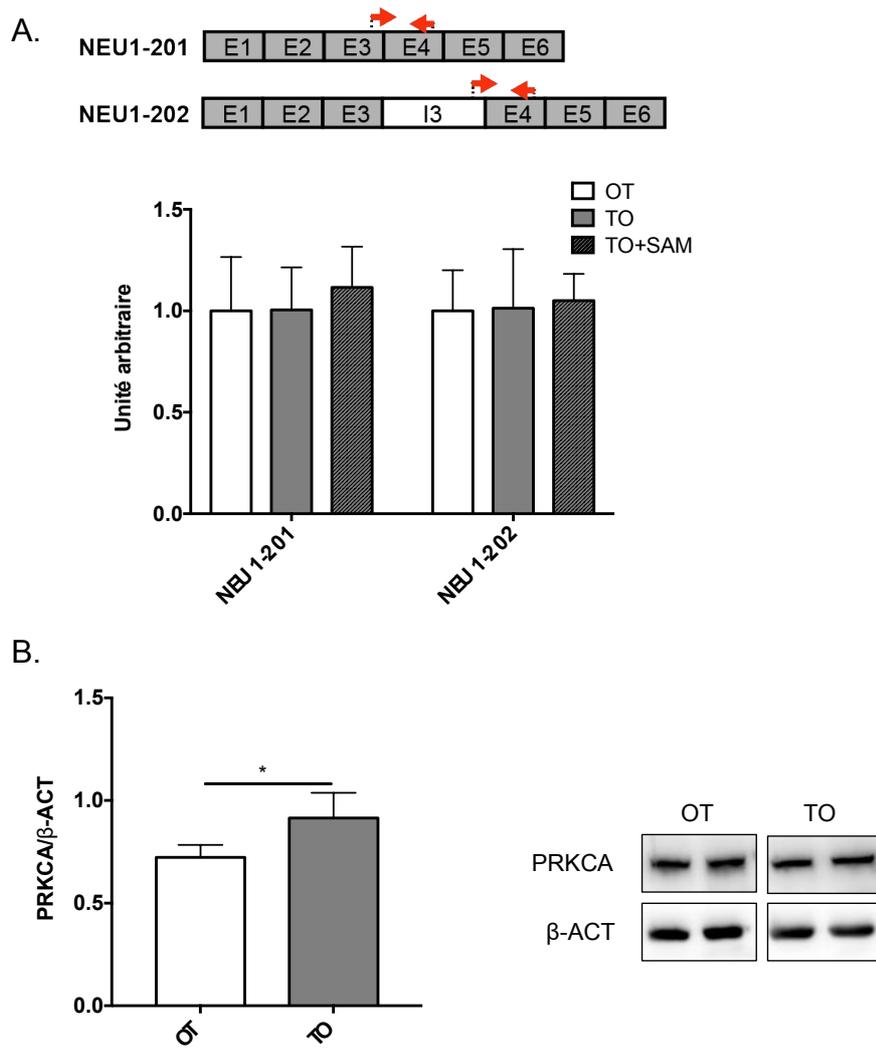


Figure 28 : Etude des cibles NEU1 et PRKCA.

A. La quantité des deux isoformes de NEU1 n'est pas perturbée par la carence en vitamine B12 (N=3).

B. La protéine PRKCA est surexprimée en cas de carence en vitamine B12 (N=5, p-value<0,05).

Chapitre 2 : La méthylation m⁶A n'est pas perturbée dans le modèle d'étude des fibroblastes de patients

1 Les fibroblastes de patients cblG/G* ont un défaut de l'activité méthionine synthase induisant un défaut de SAM

Nous disposons au laboratoire de fibroblastes de patients ayant un défaut de la méthionine synthase (CblG*1 (AE) et CblG*2 (WG) ou CblG (DL)), ainsi que des fibroblastes de patients n'ayant aucun trouble du métabolisme des monocarbone, considérés donc comme contrôles (HDF). Pour commencer nos expériences, nous avons voulu vérifier l'activité de la méthionine synthase dans ces différentes lignées. Celle-ci est significativement plus faible dans les lignées CblG et CblG* (WG, AE et DL) que dans la lignée contrôle HDF (Figure 29).

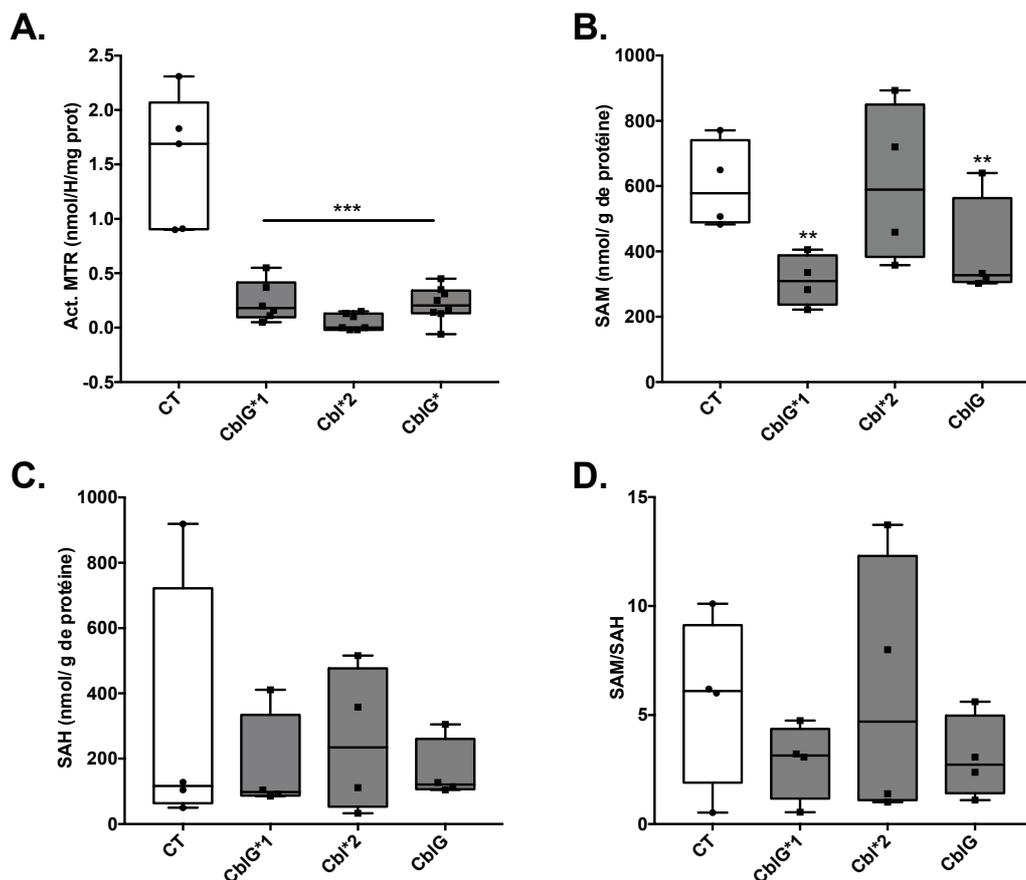


Figure 29 : Caractérisation des fibroblastes.

A. Etude de l'activité méthionine synthase. L'activité MS est diminuée dans les lignées CblG comparées aux contrôles (CT :HDF, CblG*1 (AE), CblG*2 (WG), CblG (DL)).

B à D. Dosage SAM, SAH et indice de méthylation SAM/SAH ($N \geq 5$, ** p -value < 0,01, *** p -value < 0,005).

Nous avons ensuite réalisé le dosage des métabolites SAM et SAH. En effet, un défaut de la méthionine synthase devrait induire une diminution de la quantité de SAM. C'est ce que nous avons retrouvé dans les cellules de fibroblastes de patients CblG/G* WG et DL (Figure 29). Nous ne retrouvons pas ce résultat pour la lignée AE. Dans ce modèle également, aucune accumulation de la SAH n'est observée et l'indice de méthylation n'est pas impacté. La synthèse de SAM étant altérée, l'hypothèse d'une sous-méthylation m⁶A des ARN peut être testée.

2 La méthylation m⁶A ne semble pas être impactée dans les fibroblastes de patients CblG/G*

Nous avons décidé de tester la méthylation globale des ARN des lignées contrôles et CblG/G* avec le kit colorimétrique EpiQuick. Aucune différence significative n'a été trouvée pour ce modèle de cellules (Figure 30). Nous avons également testé quelques cibles en RIP mais aucune différence de la méthylation m⁶A n'a été observée (données non présentées). L'étude de l'expression des ARNm ainsi que de l'expression et de la localisation des protéines impliquées dans le mécanisme m⁶A a donc été interrompue (données non présentées). Les lignées présentent beaucoup de variabilités entre elles, il est donc difficile d'analyser les résultats et de tirer des conclusions.

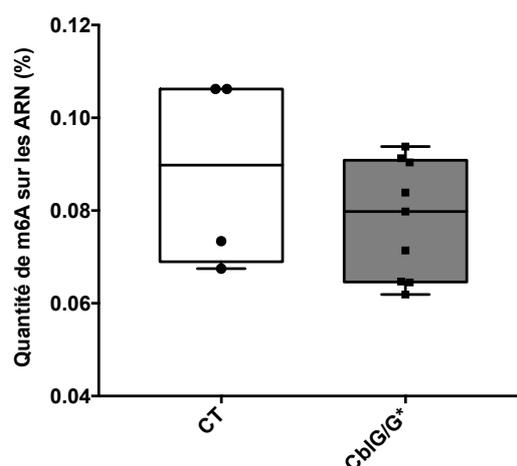


Figure 30 : Étude de la méthylation globale de m⁶A chez les fibroblastes de patients.

Quantité de m⁶A sur les ARNm des cellules CT (contrôles, HDF) et CblG/G* (WG, AE et DL) calculée par Elisa avec le kit m⁶A EpiQuick exprimée en %.

3 Etude du stress dans les fibroblastes de patients cblG*

Le modèle OT/TO étant un modèle de cellules stressées de par sa pression de sélection au G418, nous avons voulu voir si, une fois stressés, les fibroblastes de patients avaient une réponse moléculaire au niveau de la méthylation m⁶A.

Pour cela, nous avons induit un stress à l'arsenite. Cette molécule permet un stress cytoplasmique avec la formation de granules de stress (Del Razo et al., 2001), facilement quantifiables. Nous avons donc co-marqué nos cellules avec des marqueurs de granules de stress, les protéines HuR et G3BP qui sont, par ailleurs, des *reader* et *anti-reader* respectivement de la modification m⁶A. Il s'est avéré qu'il est très compliqué de délimiter avec précision le cytoplasme de chaque cellule afin de compter les granules formés. Nous avons donc décidé de co-marquer nos cellules à la Phalloïdine et avec un seul marqueur des granules de stress (HuR ou G3BP) (Figure 31, résultats présentés pour HuR).

Deux paramètres ont été mis en évidence dans la réponse au stress des cellules ; la taille des noyaux et le nombre de granules (Figure 31). Les cellules saines voient leur noyau devenir plus petit lorsqu'elles sont stressées. Paradoxalement, ce comportement n'a pas pu être observé pour les cellules mutées CblG*. De plus, un stress à l'arsenite provoque bien la formation de granules de stress (Figure 31). De manière intéressante, les cellules ayant un défaut de l'activité méthionine synthase (CblG*) produisent significativement moins de granules de stress que les cellules contrôles. De plus, nous nous attendions à retrouver des granules de stress dans les cellules CblG* avant l'induction du stress, la carence en B12 étant un stress pour la cellule. La réponse au stress est donc différente dans les cellules saines et dans les cellules carencées, avec une réponse moins marquée pour les cellules carencées.

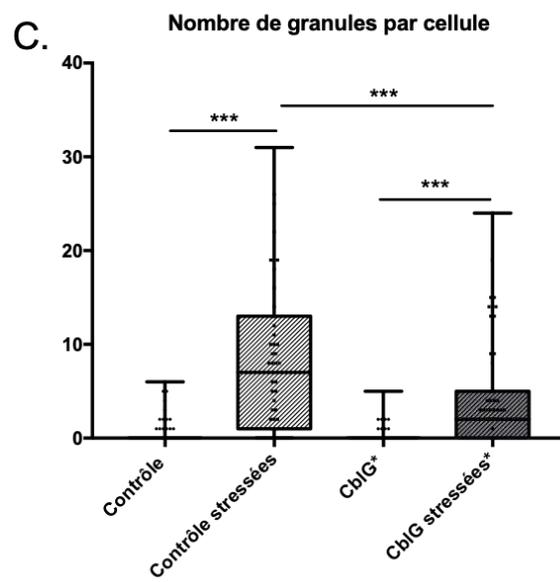
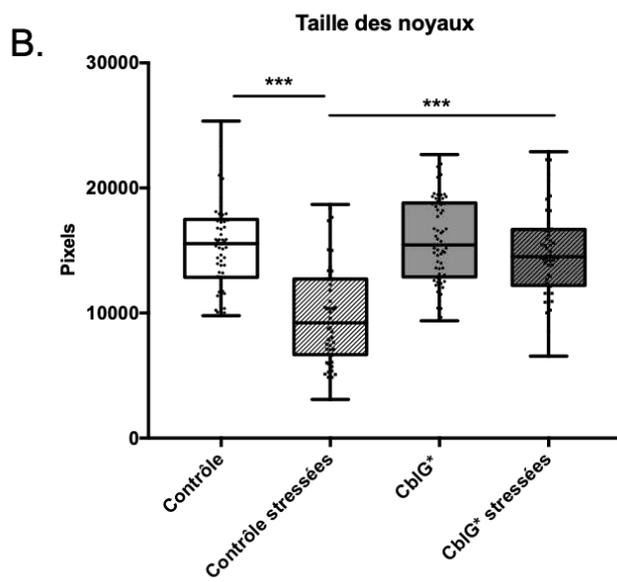
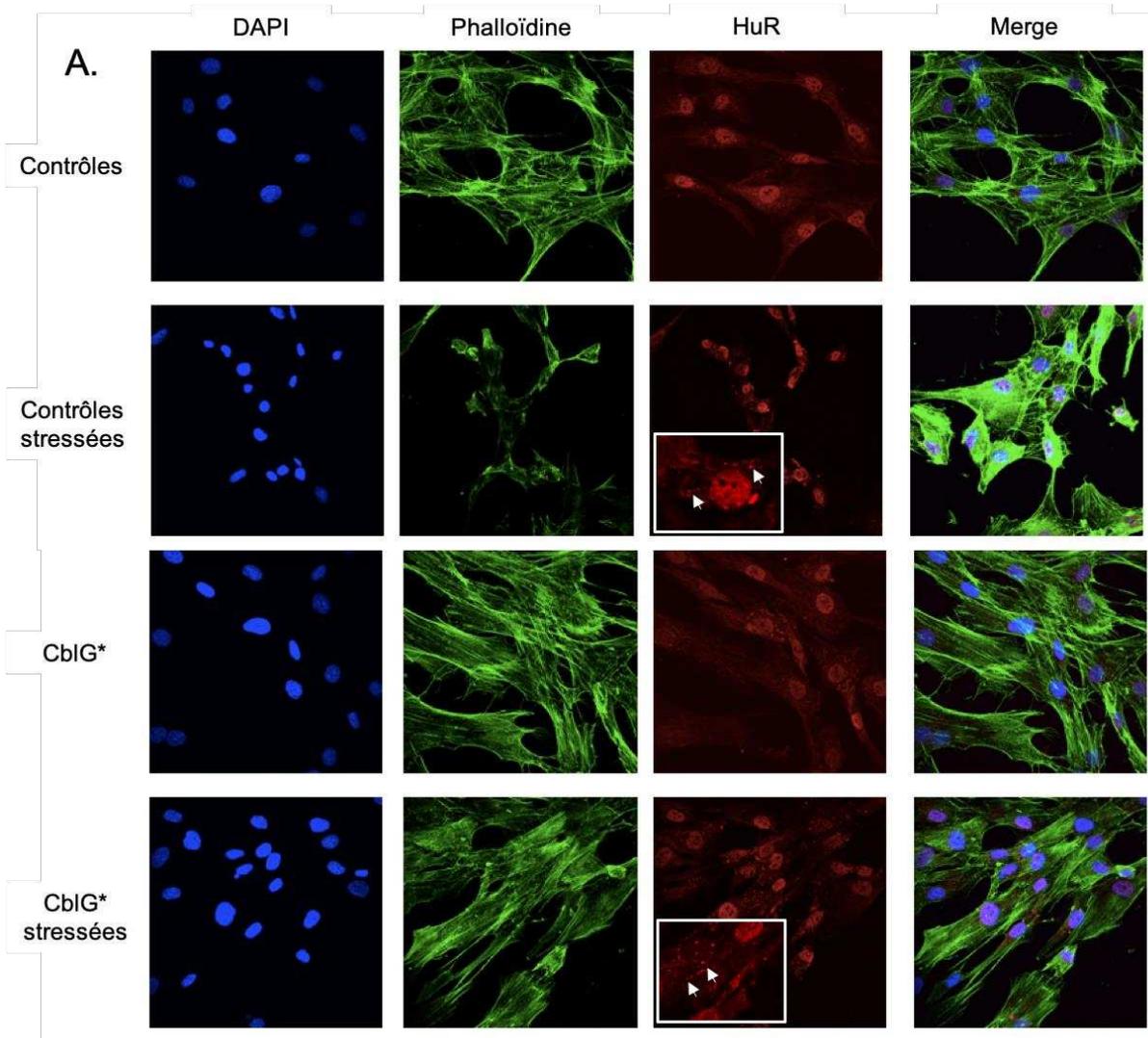


Figure 31 : Stress des fibroblastes de patients.

A. Analyse par immunofluorescence de la localisation de HuR. Apparition des granules de stress après 15 min de traitement à l'arsenite sur des fibroblastes contrôles ou CblG.*

B. Etude de la taille des noyaux. La taille des noyaux des cellules contrôles et CblG (en condition non traitée ou suite au traitement à l'arsenite pendant 15 min) est calculée pour $N > 50$ cellules.*

C. Etude de l'apparition des granules de stress. Le nombre de granules de stress en fonction du stress à l'arsenite (15 min de traitement) dans des fibroblastes contrôles et CblG est calculé pour $N > 50$ cellules (***) p -value $< 0,005$.*

Chapitre 3 : Le modèle d'étude de fibroblastes d'embryons de souris

Le modèle OT/TO étant un modèle génétiquement modifié, et le modèle de fibroblastes de patients présentant trop de variabilité pour nous permettre de vérifier nos résultats, nous avons décidé d'établir un autre modèle cellulaire murin plus robuste. Nous avons donc développé pendant ma thèse un nouveau modèle de fibroblastes, à partir d'embryons de souris *Cd320^{+/+}* (désignés par la suite WT) et *Cd320^{-/-}* (désignés par la suite KO). Pour cela, nous avons croisé 2 souris WT ainsi que 2 souris KO *Cd320* ensemble et récupéré les embryons à E15.5. Pour rappel, les souris *Cd320^{-/-}* sont des souris invalidées pour le gène *Cd320*, qui code pour le récepteur au complexe Transcobalamine-Vitamine B12. Chez ces souris, la carence en vitamine B12 est visible uniquement au niveau cérébral (Lai et al., 2013). Les fibroblastes de ces embryons ont été mis en culture et immortalisés selon un protocole publié en 2019 (Tan and Lei, 2019). Les fibroblastes sont immortalisés après avoir subi une crise de croissance aux alentours du passage 6.

1 Les cellules d'embryons de souris *Cd320^{-/-}* présentent un défaut de SAM

Nous avons dans un premier temps déterminé la concentration de SAM dans ce nouveau modèle de MEF. Celle-ci est bien diminuée dans les cellules provenant d'embryons *Cd320^{-/-}* comparées aux cellules contrôles (Figure 32). Le rapport SAM/SAH est également altéré en cas d'inactivation du récepteur CD320. En revanche, comme pour les autres modèles testés, aucune accumulation de la SAH n'est observée (Figure 32).

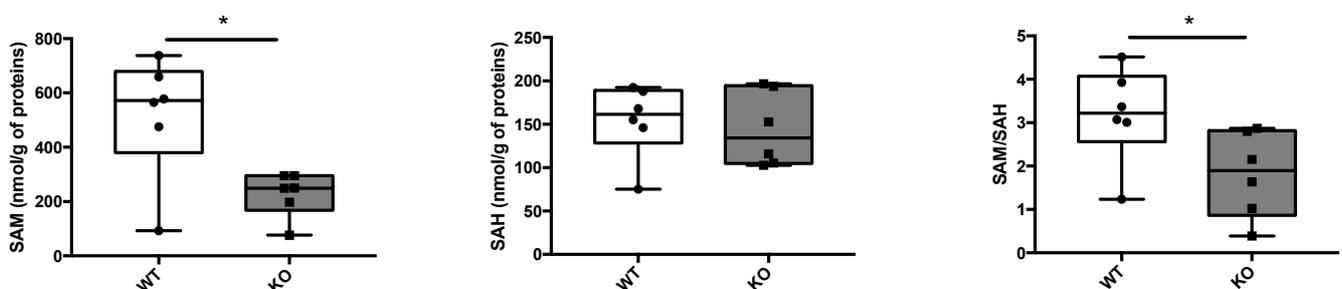
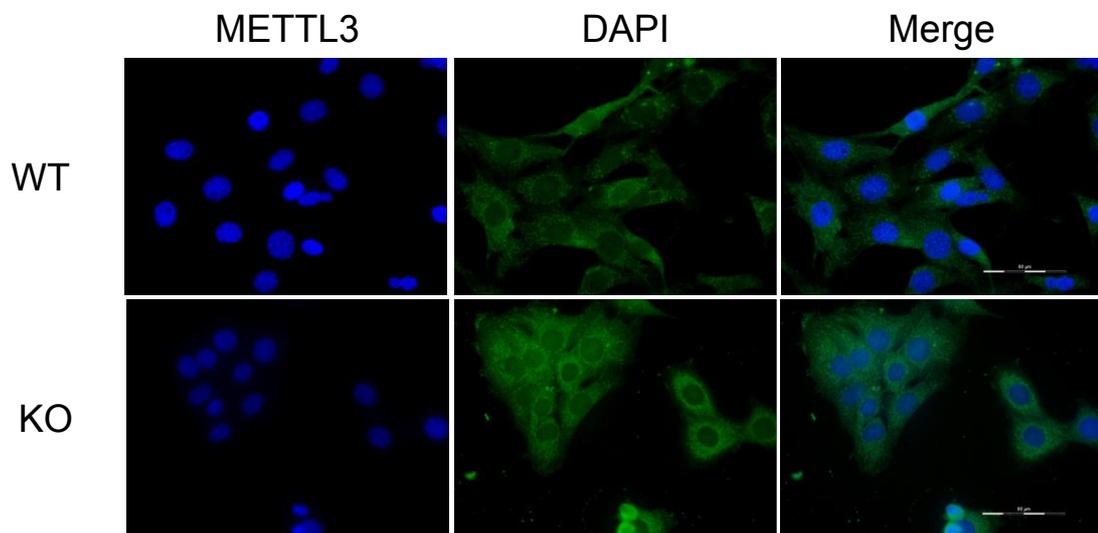


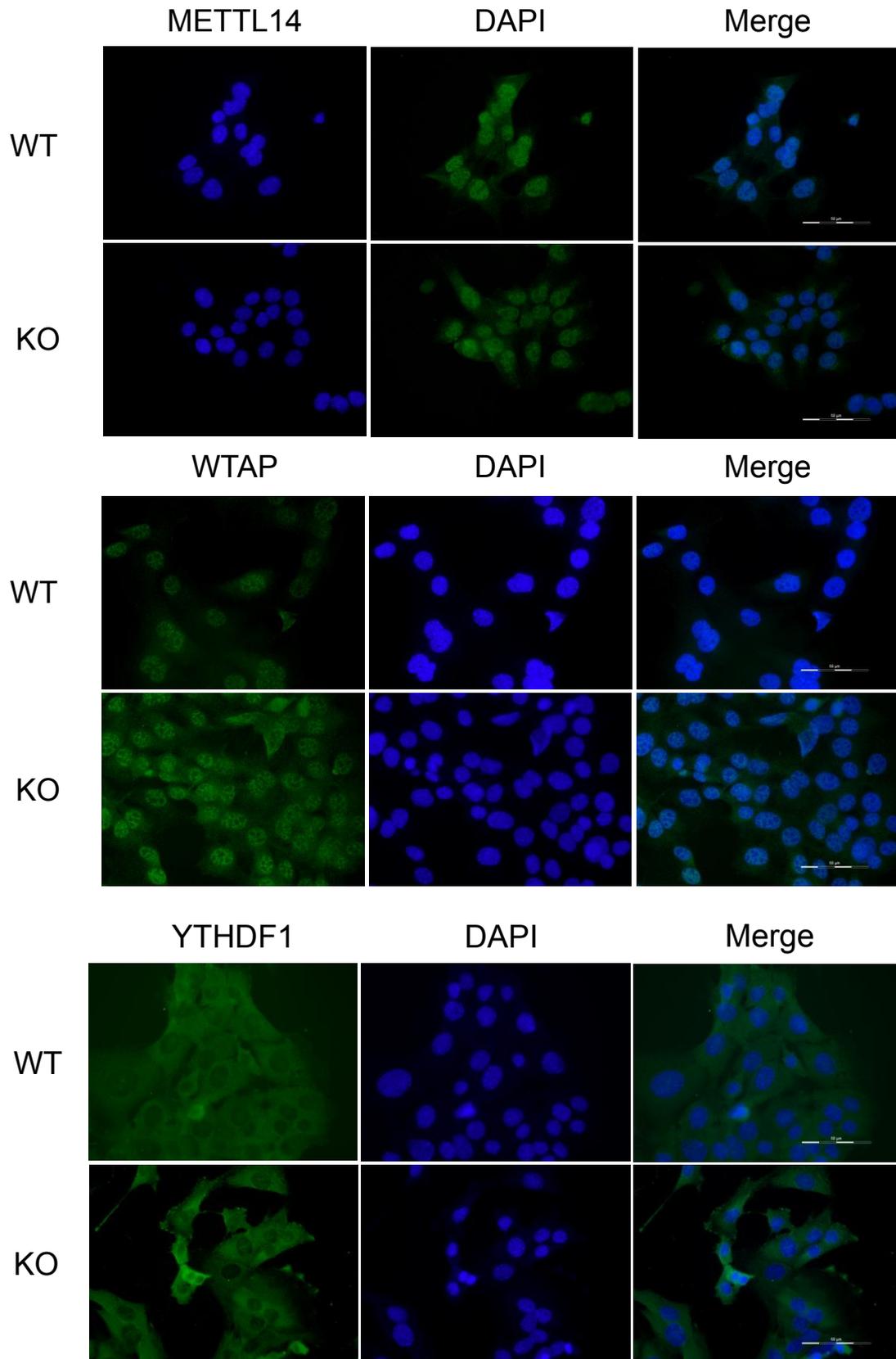
Figure 32 : Dosage SAM, SAH et indice de méthylation dans les MEFs WT ou homozygotes ^{-/-} pour *Cd320*.

$N = 6$, $*p < 0,05$.

2 La carence en vitamine B12 a un impact sur l'expression des protéines *reader* et *eraser* de la méthylation m⁶A

Nous avons réalisé, comme pour les modèles OT/TO et de fibroblastes humains, une étude de la stabilité et de la localisation protéique des acteurs de la méthylation m⁶A. Aucun impact sur la localisation n'a été observé dans ce modèle également (Figure 33).





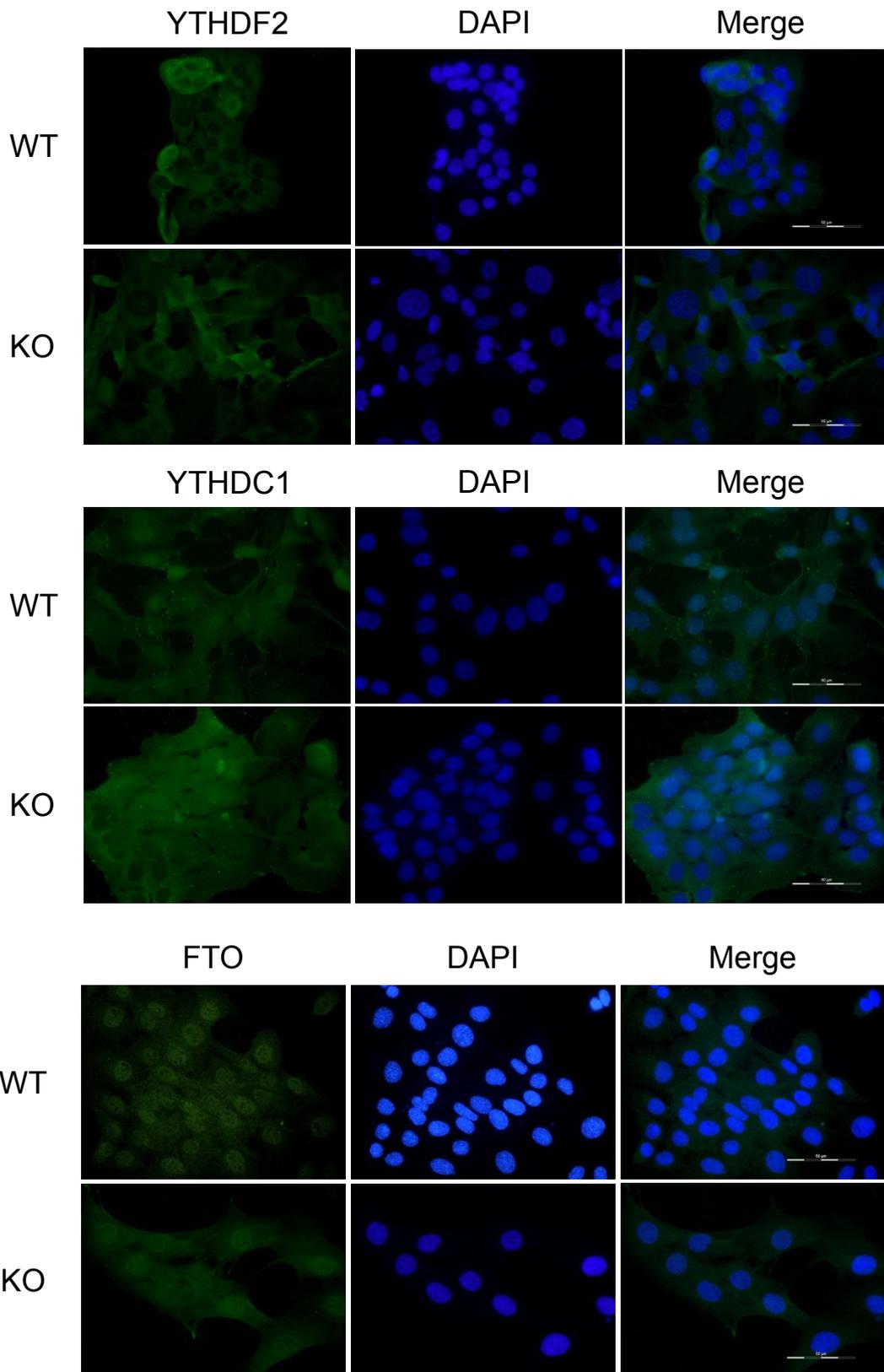


Figure 33 : Etude de la localisation des protéines impliquées dans le mécanisme m^6A .

Aucun changement de localisation n'est observé entre les cellules WT et KO. Les photos ont été prises avec un microscope à épifluorescence au grossissement x60 après un marquage aux anticorps d'intérêts et au DAPI.

L'étude de l'expression de ces acteurs protéiques a révélé une surexpression des protéines *reader* YTHDF2 et YTHDC1 ainsi que de l'*eraser* FTO. Cette dernière avait également été montrée comme étant surexprimée dans la lignée TO. En revanche, aucune perturbation du complexe *writer* n'est observée dans ce modèle cellulaire (Figure 34).

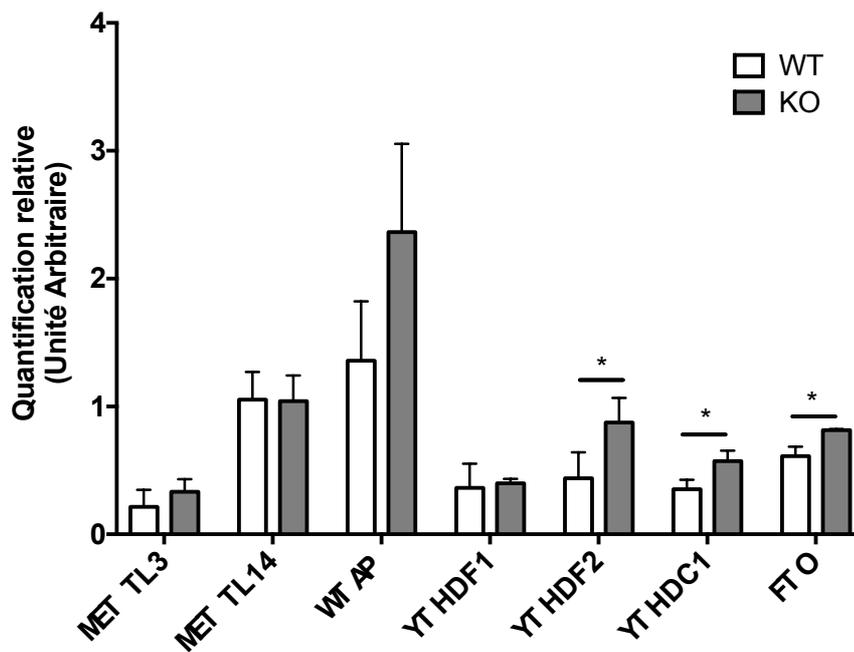
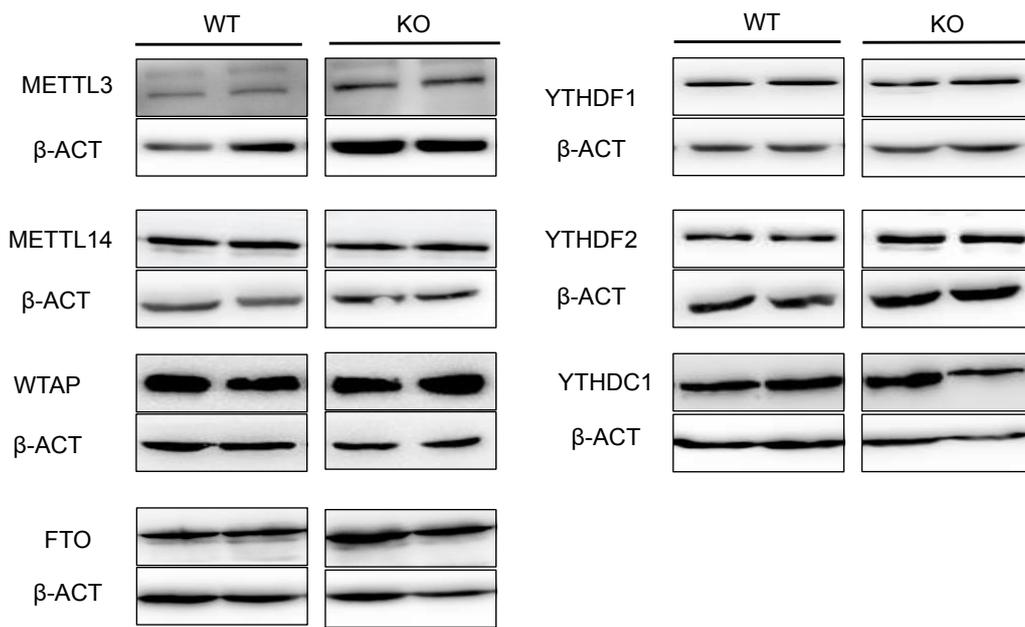


Figure 34 : Etude de l'expression des protéines impliquées dans le mécanisme m^6A dans les MEFs.

L'expression des différents acteurs du mécanisme m^6A a été analysée par western blot. Les valeurs sont corrigées par rapport à l'expression de la β -actine. Les protéines YTHDF2, YTHDC1 et FTO sont surexprimées dans la lignée KO. N=3, * p-value < 0,05.

3 La cible PRKCA est également surméthylée et surexprimée dans le modèle de MEFs

Pour rappel, nous avons pu montrer une surméthylation de l'ARNm de PRKCA dans le modèle OT/TO. Ce défaut de méthylation a pu être corrigé par un traitement à la SAM, affirmant le rôle de la carence en vitamine B12 dans cette dérégulation de la méthylation m⁶A. Nous avons donc décidé d'étudier la méthylation de l'ARNm de PRKCA dans le modèle de MEFs. Nous avons pu montrer que dans ce modèle également, l'ARNm de PRKCA est surexprimé et surméthylé m⁶A (Figure 35). Ce résultat a pu être corrélé à une augmentation de l'expression de la protéine PRKCA (Figure 35) confirmant les résultats observés dans le modèle OT/TO.

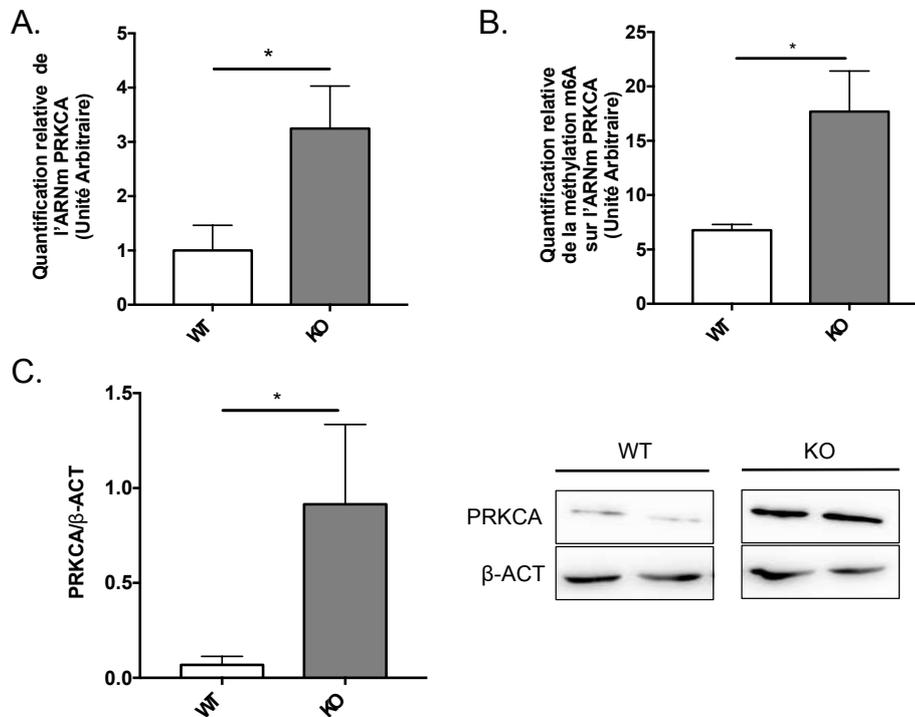


Figure 35 : L'ARNm de PRKCA est également surméthylé m⁶A dans le modèle de MEFs conduisant à une surexpression de la protéine.

A. Niveau d'expression de l'ARNm PRKCA déterminé par RTqPCR. N=3, *p-value<0,05.

B. Le niveau de méthylation est déterminé par RIP suivi d'une RTqPCR. Les valeurs représentent la moyenne +/- l'écart-type d'un triplicat biologique. N=3, *p-value<0,05.

C. L'expression de la protéine PRKCA a été étudiée par western blot. Les valeurs représentent la moyenne +/- l'écart-type d'un triplicat biologique. *p-value<0,05.

Discussion

1 Le modèle d'étude OT/TO

La vitamine B12 est importante pour les fonctions neurales. Une carence est un facteur aggravant dans le développement de maladies neurodégénératives. Au niveau moléculaire, la vitamine B12 est le cofacteur de la méthionine synthase, essentielle à la synthèse de SAM. La SAM est impliquée dans les réactions de trans-méthylation de nombreuses molécules, parmi elles, l'ARN. Dans ce projet, nous avons étudié l'impact d'une carence en vitamine B12 sur la méthylation m⁶A des ARNm, dans le but d'amener une réponse moléculaire quant aux phénotypes neuronaux induits par une carence en B12. En effet, la méthylation m⁶A a été montrée comme étant responsable de la maturation des ARNm, allant de leur transcription à leur traduction en passant par leur épissage. Notre hypothèse est donc que les m⁶A permettent la régulation d'ARNm importants pour les fonctions neurales, une carence en vitamine B12 entrainerait une dérégulation de la méthylation de certains de ces ARNm, contribuant ainsi aux troubles neurologiques chez le patient.

1.1 Une carence en vitamine B12 entraine une hypo-méthylation globale des ARNm

Le modèle d'étude OT/TO est un modèle de neuroblastome murin génétiquement modifié, qui mime une carence en vitamine B12, en séquestrant cette dernière au niveau du réticulum endoplasmique. Ce modèle unique, créé au laboratoire, permet d'étudier une carence en vitamine B12 uniquement. En effet, cette carence est souvent étudiée de pair avec une carence en B9 et/ou en donneurs de méthyles en général. Ici, grâce à un système d'accroche au réticulum endoplasmique *via* l'oléosine fusionnée à la transcobalamine, la vitamine B12 est séquestrée et n'est donc plus disponible pour la cellule, sans aucun impact sur la disponibilité des autres donneurs de méthyles. Le modèle a été validé au laboratoire par des tests de liaison de la vitamine B12 au niveau des membranes, ainsi que des immunofluorescences lorsque la protéine chimère est couplée à la GFP (Pons et al., 2009). Une première étude a montré que la carence en B12 induite par ce modèle provoque une perturbation des modifications post-traductionnelles de certaines RBP, notamment leur phosphorylation

et/ou leur méthylation induisant une délocalisation de ces dernières (Battaglia-Hsu et al., 2018).

Lors de ma thèse, nous avons montré que les cellules carencées présentent un défaut de la méthylation m⁶A des ARNm (Figure 23). Cette diminution de la méthylation m⁶A des ARNm de la lignée carencée en vitamine B12 (TO) peut s'expliquer par (1) un effet direct sur la diminution de la quantité de SAM, co-substrat des méthyltransférases (Figure 22) et (2) un effet indirect sur la dérégulation de l'expression des protéines impliquées dans le mécanisme m⁶A (Figure 25), ou de leurs modifications post-traductionnelles (Figure 26).

La diminution du taux de SAM mesuré dans les cellules carencées TO est faible, conformément à ce qui avait déjà été mesuré dans ce modèle (Battaglia-Hsu et al., 2009). Néanmoins, nous pensons qu'elle est suffisante pour induire, au moins en partie, une diminution de la méthylation m⁶A. En effet, la constante de Michaelis-Menten K_m du complexe METTL3/METTL14 pour son substrat SAM est de l'ordre de 100nM (Buker et al., 2020), l'affinité de l'enzyme pour son substrat est donc forte, l'enzyme n'a pas besoin d'une grande quantité de substrat pour fonctionner. Néanmoins, la concentration cellulaire en SAM n'étant pas en excès dans les cellules neuronales (<10K_m) contrairement aux cellules hépatiques par exemple (Caudill et al., 2001), une diminution de la quantité de cette molécule peut avoir un impact sur l'affinité enzyme/substrat et donc sur l'activité de l'enzyme. Il reste difficile d'affirmer que la sous-méthylation globale des ARNm soit uniquement due à une diminution de la quantité de SAM. En effet, les quantités de SAM publiées sont généralement rapportées à la quantité de tissus, il n'est donc pas possible de comparer ces valeurs avec les nôtres obtenues sur des cellules et rapportées à la quantité de protéine. De plus, les études de K_m sont faites *in vitro*, ce qui n'est pas le cas de notre étude.

Nous avons constaté deux comportements face au traitement SAM des cellules OT/TO. Le phénotype contrôle est, comme attendu, retrouvé pour les cibles NEU1 et PRKCA (Figure 27). Le phénotype contrôle n'est pas retrouvé, pour les cibles CLPTM1 et TUBB3 (Figure 27). Il apparaît donc que la diminution de la quantité de SAM est partiellement responsable de la perturbation de la méthylation, mais qu'un autre facteur entre en jeu. Notre hypothèse est que l'augmentation de l'expression de l'*eraser* FTO a un rôle important dans la sous-méthylation de certaines cibles.

Par ailleurs, la diminution du taux de SAM ne s'accompagne pas d'une accumulation de la SAH. L'étape de conversion de la SAH en homocystéine est réversible (Figure 5), l'homocystéine étant toxique pour la cellule. Nous nous attendions à une accumulation de SAH plutôt que d'homocystéine qui ne pourrait pas être convertie en méthionine par la méthionine synthase et la vitamine B12. Les cellules ayant une prolifération ralentie (Pons et al., 2009), nous pouvons supposer qu'il y a une légère accumulation d'homocystéine, toxique pour la cellule, comme montrée précédemment pour d'autres clones au laboratoire (Battaglia-Hsu et al., 2009) et/ou que la voie de la trans-sulfuration de l'homocystéine est privilégiée. Cette voie permet la conversion de l'homocystéine en cystéine selon 2 étapes, la première étape consiste en une réaction avec la sérine pour former de la cystathionine, la seconde est catalysée par la cystathionase et libère de l'homosérine et de la cystéine, deux molécules qui ne sont pas toxiques pour la cellule (Finkelstein and Martin, 2000).

En plus d'affecter le taux de SAM synthétisée par la cellule, une carence en vitamine B12 peut affecter les modifications post-traductionnelles et ainsi, la localisation de certaines protéines de liaison aux ARNm (Battaglia-Hsu et al., 2018). La sumoylation est une modification post-traductionnelle qui régule l'activité de METTL3, plus la protéine est sumoylée, moins elle exerce son activité de méthyltransférase (Du et al., 2018). Nous avons vérifié si cette modification pouvait être affectée par la carence, comme c'est le cas pour la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation (Battaglia-Hsu et al., 2018; Pooya et al., 2012). Il semblerait que la sumoylation de la protéine METTL3 soit bien perturbée en cas de carence en vitamine B12 (Figure 26), ce qui pourrait entraîner une diminution de la méthylation m⁶A des ARNm dans la lignée carencée (TO).

Enfin, nous avons observé une perturbation du complexe *writer* notamment METTL14 et WTAP, et de l'*eraser* FTO (Figure 25). La diminution de l'expression de METTL14 et WTAP et la surexpression de FTO vont bien dans le sens d'un défaut de méthylation. De plus, il a déjà été montré qu'un défaut d'une seule des protéine du complexe *writer*, et plus particulièrement METTL14, perturberait l'ensemble du complexe et donc la méthylation m⁶A (Zhang et al., 2018a). Aucune modification de la localisation de ces protéines n'a été observée dans cette étude, à la différence d'une précédente étude qui avait montré une délocalisation de la protéine HuR, également *reader* des m⁶A (Battaglia-Hsu et al., 2018).

En résumé, nous avons montré qu'une carence en vitamine B12 provoque une diminution de la méthylation m⁶A des ARNm qui peut s'expliquer par trois facteurs, une diminution du taux de SAM, une dérégulation de l'expression des acteurs protéiques du mécanisme m⁶A ainsi qu'un défaut de modification post-traductionnelle de la protéine *writer* METTL3.

1.2 Etude ciblée de la méthylation des ARNm

Nous avons ensuite étudié l'impact de cette carence en vitamine B12 sur la méthylation des ARNm au niveau local. Une expérience de transcriptomique avait été réalisée au laboratoire par le Dr SF Battaglia et ses collaborateurs, et avait mis en évidence de nombreux changements du transcriptome en cas de carence en vitamine B12, notamment pour des gènes impliqués dans la neurogénèse, la transmission synaptique, le développement neural et la neuroplasticité. Nous avons entrepris une étude bioinformatique afin d'identifier des ARNm cibles des protéines *reader* à domaines de liaison à l'ARN YTH, dont l'expression variait en fonction de la carence, et qui étaient connus pour être méthylés m⁶A d'après les données publiées par Meyer et coll. (Meyer et al., 2012). Nous avons ensuite sélectionné quelques ARNm impliqués dans des processus neurologiques ou le cytosquelette puisqu'une carence en vitamine B12 a de nombreuses répercussions au niveau du fonctionnement du système nerveux (Arora et al., 2019; McCarter et al., 2019). Nous avons pu mettre en évidence une sous-méthylation m⁶A de l'ARNm de NEU1 et de façon plus inattendue, une surméthylation de l'ARNm de PRKCA (Figure 27) dans les cellules carencées. Cette méthylation différentielle au niveau local a également été observée au niveau de l'ADN (Barua et al., 2016a, Thèse de Rashka Charif 2019). Ces deux défauts de la méthylation m⁶A ont pu être corrigés par un traitement à la SAM, montrant que la perturbation de la méthylation m⁶A de ces ARNm est bien due à une diminution du taux de SAM induite par la carence en vitamine B12.

Concernant le défaut de méthylation m⁶A de NEU1, nous n'avons pas observé de dérégulation de l'épissage au niveau des deux isoformes de cet ARNm (Figure 28). L'ARNm NEU1 est ciblé par YTHDC1 qui est décrite pour réguler l'épissage mais également l'export des ARNm vers le cytoplasme (Roundtree et al.). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de ces ARN par RNA-FISH ainsi que l'expression

de la protéine par western blot afin de s'assurer que l'impact de la sous-méthylation de l'ARN ne se retrouve pas en aval de l'étape d'épissage.

PRKCA est quant à elle, une cible de YTHDF1, celle-ci étant connue pour réguler la traduction (Liu et al., 2020). L'étude de l'expression de PRKCA a montré une augmentation de la quantité protéique de cette cible (Figure 28). PRKCA est une Ser-Thr kinase impliquée notamment dans les voies de signalisation de la prolifération, de la différenciation mais également dans l'apoptose. Cet effet pourrait être étudié de façon complémentaire par une étude de l'intégrité de ces voies de signalisation par western blot, en quantifiant les formes phosphorylées en fonction des formes totales des différents acteurs de la voie de signalisation tels que ERK pour la prolifération par exemple.

1.3 Limites du modèle OT/TO

Le modèle cellulaire OT/TO étant un modèle murin et génétiquement modifié, nous avons décidé de valider les résultats obtenus sur d'autres modèles. En effet, l'insertion de l'ADNc codant la protéine chimère se faisant de manière aléatoire dans le génome, la réponse des différents clones peut s'avérer variable (diminution de la quantité de SAM plus ou moins marquée par exemple). Nous avons essayé de pallier à ce biais en construisant des lignées Flp-In® afin de rendre les lignées cellulaires OT/TO plus stables et de pouvoir maîtriser le site d'intégration entre les 2 types cellulaires. Le système Flp-In® consiste en la création d'une lignée stable exprimant la Flp recombinase qui permettra l'insertion, toujours au même endroit, d'un gène d'intérêt. Malheureusement, aucune intégration du premier plasmide pFRT/lacZeo n'a été obtenue sur les lignées testées (N1E-115, SHSY-5Y, C6 et HEK-293). En effet, les N1E-115 étant difficilement transfectables, nous avons décidé de tester d'autres lignées pour comprendre si le problème venait de la transfection ou de la lignée cellulaire. De plus, nous n'avons pas pu réaliser le sous-clonage des constructions OT et TO dans le deuxième plasmide (pEF5/FRT/V5), le fournisseur ne nous ayant pas livré (plus de 6 mois de délai).

Nous avons donc décidé d'essayer de reproduire nos résultats dans des lignées cellulaires disponibles au laboratoire. Nous avons dans un premier temps choisi des fibroblastes de patients sains, ou ayant un défaut de la synthèse de la méthionine synthase (enzyme qui a pour cofacteur la vitamine B12), disponibles au laboratoire.

2 Le modèle d'étude des fibroblastes de patients

Le modèle d'étude des fibroblastes de patients est composé de cellules contrôles et de cellules dites CblG/G*. Les cellules contrôles proviennent d'un individu ne présentant aucun trouble du métabolisme des monocarbones, les cellules CblG/G* proviennent de patients ayant un défaut de l'activité de la méthionine synthase. Ces dernières présentent bien un défaut de la synthèse de SAM (Figure 29) faisant de ces cellules un modèle adapté à notre étude. Dans ce modèle également, aucune accumulation de la SAH n'est observée, renforçant l'idée de l'utilisation de l'homocystéine dans la voie de la trans-sulfuration pour la production de cystéine et d'homosérine non toxique pour la cellule. De manière surprenante, la méthylation m⁶A n'est pas altérée dans les cellules CblG/G* comparées aux cellules contrôles (Figure 30). Nos cellules OT/TO subissent une pression de sélection par ajout de G418, nous avons donc voulu réaliser une étude du stress sur notre modèle de fibroblastes humains afin de vérifier si les résultats obtenus sur le modèle OT/TO étaient bien dus à la carence et non au stress.

Deux paramètres ont été étudiés dans la réponse au stress ; la taille des noyaux et le nombre de granules. Nous avons observé un rétrécissement du noyau des cellules contrôles en cas de stress (Figure 31), nous pensons qu'il s'agit d'une entrée en apoptose des cellules et avons pour projet de le vérifier par étude des caspases par western blot. De manière surprenante, cette observation n'a pas été faite pour les cellules mutées CblG/G*. Par ailleurs, il a également été observé que ces cellules produisent moins de granules de stress comparées aux contrôles (Figure 31). Nous pensons que ces cellules étant déjà stressées de par leur défaut génétique, elles réagissent de manière moins rapide et moins prononcée à l'exposition à un stress. Néanmoins, ce stress ne se manifeste pas par la présence de granules de stress en condition contrôle (Figure 31). En effet, des travaux du laboratoire ont pu montrer un stress cellulaire endogène qui se caractérise par un dysfonctionnement mitochondrial (au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire) en accord avec une dérégulation du métabolisme énergétique précédemment observé au laboratoire (Thèse de Rachka Charif 2019).

Pour la suite de ce projet, il serait souhaitable d'étudier la répartition des protéines HuR et G3BP dans les granules (expériences de co-marquage) afin d'établir un profil

de formation de ces derniers dans les différentes lignées. Ces protéines ont été choisies car ce sont également des *reader* de m⁶A. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la méthylation lors de la formation des granules de stress. Par ailleurs, des résultats préliminaires ont montré une différence de dynamique de formation des granules en fonction de la lignée cellulaire. En effet, il semblerait que la formation des granules de stress soit exponentielle en fonction de la durée du traitement pour des fibroblastes contrôles, alors que les fibroblastes CblG/G* auraient un pic de formation des granules après 15 min de traitement à l'arsénite et reviennent à une production modérée de granules au bout de 30 min et jusqu'à 1 h de traitement (données non présentées). Il serait alors intéressant de poursuivre ce projet en étudiant la méthylation m⁶A dans ces lignées de fibroblastes de patients stressés afin de déterminer si le stress a un rôle sur la méthylation différentielle des cellules en cas de carence en vitamine B12. En effet, il a déjà été montré que la méthylation m⁶A est dérégulée dans la réponse au stress aigu. Engel *et al.* ont observé une diminution globale (mais plutôt une dérégulation au niveau local) de la méthylation m⁶A dans le cortex de souris ayant subi un stress aigu avec une dérégulation du complexe *writer*. Ces résultats ont été confirmés chez l'homme, chez des patients atteints de dépression (Engel *et al.*, 2018).

Pour conclure, ce modèle cellulaire ne permet pas de reproduire nos résultats préliminaires sur le modèle OT/TO. De plus, les résultats obtenus avec ces lignées concernant la localisation et la stabilité protéique des acteurs du mécanisme m⁶A (données non présentées) se sont révélés très aléatoires. Nous pensons qu'il est possible que ces protéines soient régulées durant le cycle cellulaire et/ou différemment exprimées selon le niveau de confluence des cellules. Nous devrions synchroniser les cellules afin de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, une étude plus poussée au laboratoire s'intéressant notamment à la 2'-O-méthylation des ARNr et la méthylation de l'ADN a été réalisée sur les fibroblastes de patients. Si aucune modification de la méthylation des ARNr n'a été observée, la méthylation de l'ADN des fibroblastes a montré une hypo-méthylation de certaines régions chez les CblG/G* comparées aux contrôles concernant des gènes impliqués dans le neuro-développement et le fonctionnement du cerveau (Thèse de Rachka Charif 2019). Néanmoins, aucun résultat n'a pu être confirmé au niveau du

transcriptome ni lors d'une analyse protéomique. Nous pensons que ce modèle n'est pas adapté pour l'étude de la méthylation. Par ailleurs, une autre difficulté dans l'étude de ce modèle réside dans le fait d'un manque d'informations cliniques. En effet, il est compliqué de comparer des lignées sans réellement savoir quelles sont les manifestations cliniques du défaut génétique. De plus, les lignées contrôles proviennent d'individus ne présentant pas de défaut génétique au niveau du métabolisme des monocarbones, néanmoins, ils présentaient peut-être d'autres défauts génétiques. Ces informations cliniques manquantes, il est difficile de choisir une lignée plutôt qu'une autre au vu des réponses variables obtenues. C'est pourquoi nous avons décidé de reproduire nos résultats sur un modèle de fibroblastes embryonnaires murins provenant de souris WT ou *Cd320*^{-/-} déjà caractérisées et qui permet de s'affranchir du biais stress introduit par le traitement au G418 du 1^{er} modèle OT/TO.

3 Le modèle d'étude des MEFs

Ce modèle a été mis au point dans le cadre de ce travail à partir des souris WT ou invalidées pour le gène codant le récepteur CD320. Les cellules KO présentent bien un défaut de synthèse de la SAM (Figure 32), faisant de ce modèle, un modèle adapté à notre étude et nous permettant d'émettre l'hypothèse d'une hypo-méthylation m⁶A. De plus, les résultats observés sont plus marqués que dans les autres modèles cellulaires disponibles, affirmant le caractère robuste de ce modèle. Aucune accumulation de la SAH n'est observée dans ce modèle également, néanmoins, l'indice de méthylation (*ratio* SAM/SAH) est altéré (Figure 32). L'étude des acteurs protéiques responsables de la méthylation a confirmé l'augmentation de la quantité protéique de l'*eraser* FTO (Figure 34), renforçant l'hypothèse d'une sous-méthylation m⁶A dans ce modèle. Par ailleurs, nous avons constaté une surexpression des *reader* YTHDF2 et YTHDC1. NEU1 étant une cible de YTHDC1, nous envisageons d'étudier sa méthylation m⁶A ainsi que l'épissage de ses 2 isoformes afin de vérifier qu'il n'y a pas d'altération de ce mécanisme pour cette cible, même si l'épissage de NEU1 n'était pas altéré dans le modèle OT/TO (Figure 28).

Nous avons pu confirmer l'augmentation de la méthylation m⁶A de l'ARNm de PRKCA, corrélée à une augmentation de sa quantité protéique. Nous envisageons de réaliser

une étude moléculaire comme évoqué pour le modèle OT/TO. En effet, PRKCA phosphoryle et active RAF1, une Ser/Thr kinase faisant le lien entre les Ras GTPases membranaires et la cascade de signalisation MAPK/ERK essentielle pour la division cellulaire notamment. Il serait donc intéressant d'étudier le niveau de ces différentes protéines et de leur activation en condition de carence en vitamine B12.

Ce modèle d'étude a donc permis de confirmer les résultats obtenus dans le modèle OT/TO, affirmant que nos observations sont dues à la carence en vitamine B12 et non au stress induit par le traitement au G418.

Résultats/Discussion

Axe 2 : Etude de l'impact

d'une carence en vitamines

B9/B12 sur la méthylation des

protéines histones

Dans la première partie de cette thèse, nous avons mis en évidence les conséquences d'une carence en vitamine B12 sur une modification épitranscriptomique, la m⁶A. Dans la suite de nos travaux, je me suis intéressée à un autre type de modification épigénétique, les modifications post-traductionnelles des protéines histones. Ces travaux se sont inscrits dans la suite du projet de thèse de Jérémy Willekens.

1 Le protocole nutritionnel MDD (*methyl donor deficiency*)

Il existe dans la population générale un biais sexuel au niveau des manifestations des troubles neurologiques, les femmes sont en général plus susceptibles de développer un caractère dépressif (Fernández-Guasti et al., 2012), tandis que les hommes seront plutôt sujets à la schizophrénie (Thomas et al., 2010).

Dans le modèle nutritionnel de carence gestationnelle, développé au laboratoire (Blaise et al., 2007; Pourié et al., 2015), les femelles présentent généralement plus de signes neurologiques. On retrouve notamment chez les ratons carencés des troubles de l'apprentissage et de la locomotion en lien avec les mécanismes moléculaires modifiés de façon préférentielle chez les femelles tels que la neurostéroïdogénèse et la voie Wnt (El Hajj Chehadeh et al., 2014; Willekens et al., 2019). En effet, un biais dû au sexe en réponse à un stimuli environnemental a déjà été mis en évidence dans de nombreuses études (Nguon et al., 2005).

Le caractère dimorphique sexuel n'est pas compris à ce jour et notre hypothèse est qu'il pourrait s'expliquer, au moins en partie, par une différence au niveau des modifications épigénétiques induites par la carence entre les deux sexes. En effet, ces dernières et notamment la modification des protéines histones présentent un biais sexuel en condition physiologique (Gagnidze et al., 2010; Hodes, 2013; Shen et al., 2015). Le protocole nutritionnel MDD (*methyl donor deficiency*) consiste en une carence en donneurs de méthyles (notamment les vitamines B9 et B12) pendant la gestation et jusqu'au sevrage des ratons, c'est-à-dire pendant toute la période d'allaitement (Figure 36). Les ratons sont mis à mort à J21 et les cerveaux récupérés, afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les différentes structures.

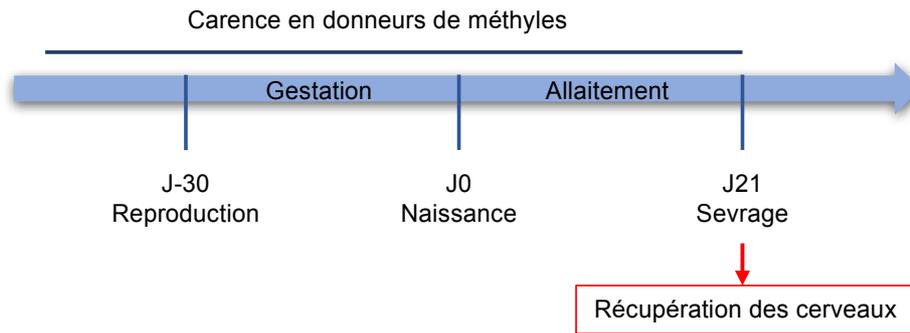


Figure 36 : Protocole animal MDD de carence précoce en donneurs de groupements méthyles.

Les rates sont soumises à un régime dépourvu en donneurs de méthyles 1 mois avant l'accouplement, pendant la gestation et l'allaitement. La mise à mort des rats se fait au sevrage à J21.

2 Les marques de méthylation des histones sont altérées chez les rats MDD

Les vitamines B9 et B12 étant impliquées dans le métabolisme des monocarbone, elles sont essentielles à la synthèse de SAM responsable de la méthylation de nombreuses molécules, notamment les protéines histones. Dans un premier temps, nous avons décidé d'étudier les marques histones afin de déterminer si elles différaient en fonction du sexe de l'animal en cas de carence (Figure 37).

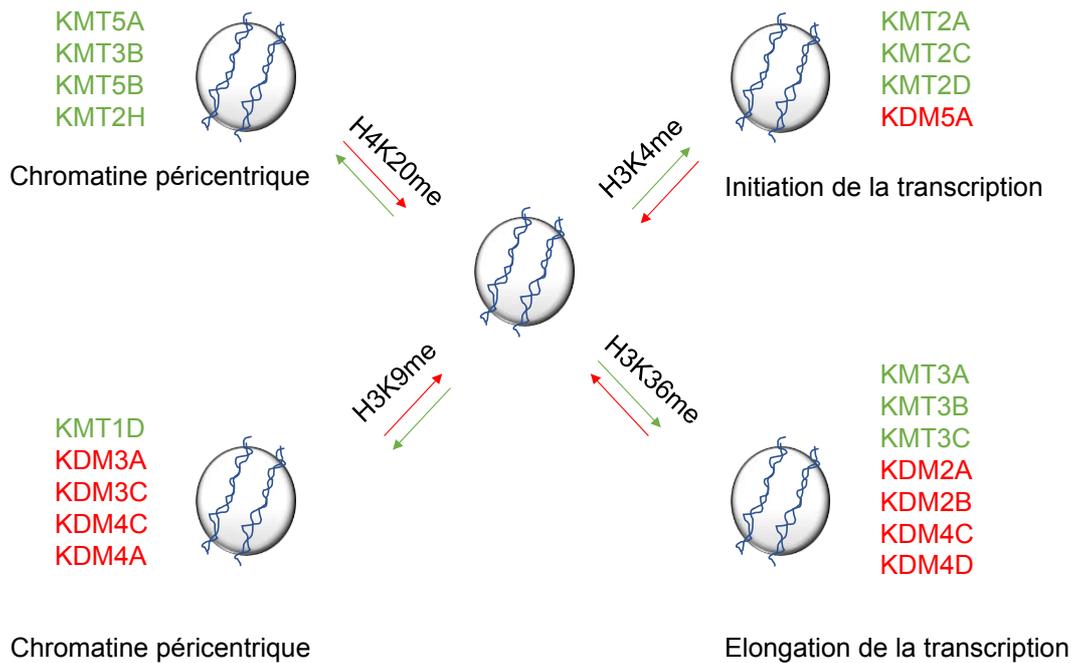


Figure 37 : Marques histones et méthylases (vert) / déméthylases (rouge) choisies pour cette étude.

Nous avons décidé d'étudier les marques de méthylation des histones H3K36me^{2/3}, H4K20me³, H3K9me³ et H3K4me² car elles ont déjà été montrées comme étant régulées par la carence (Pellanda et al., 2012).

Nous avons observé un effet différentiel de la carence sur la méthylation des histones en fonction du sexe, avec notamment une augmentation de H3K36me², H3K36me³ et de H3K9me³, ainsi qu'une diminution de H4K20me³ et H3K4me² chez les mâles carencés, les femelles carencées étant très peu affectées, elles ne présentent qu'une diminution des marques H3K4me² et H3K36me³ (Figure 38). Ces résultats étaient inattendus puisque les études précédentes du laboratoire avaient montré une plus forte atteinte des jeunes femelles au niveau des mécanismes moléculaires étudiés, à savoir la signalisation du récepteur ER α , la neurostéroïdogénèse ou les voies Wnt (El Hajj Chehadeh et al., 2014; Pourié et al., 2015; Willekens et al., 2019).

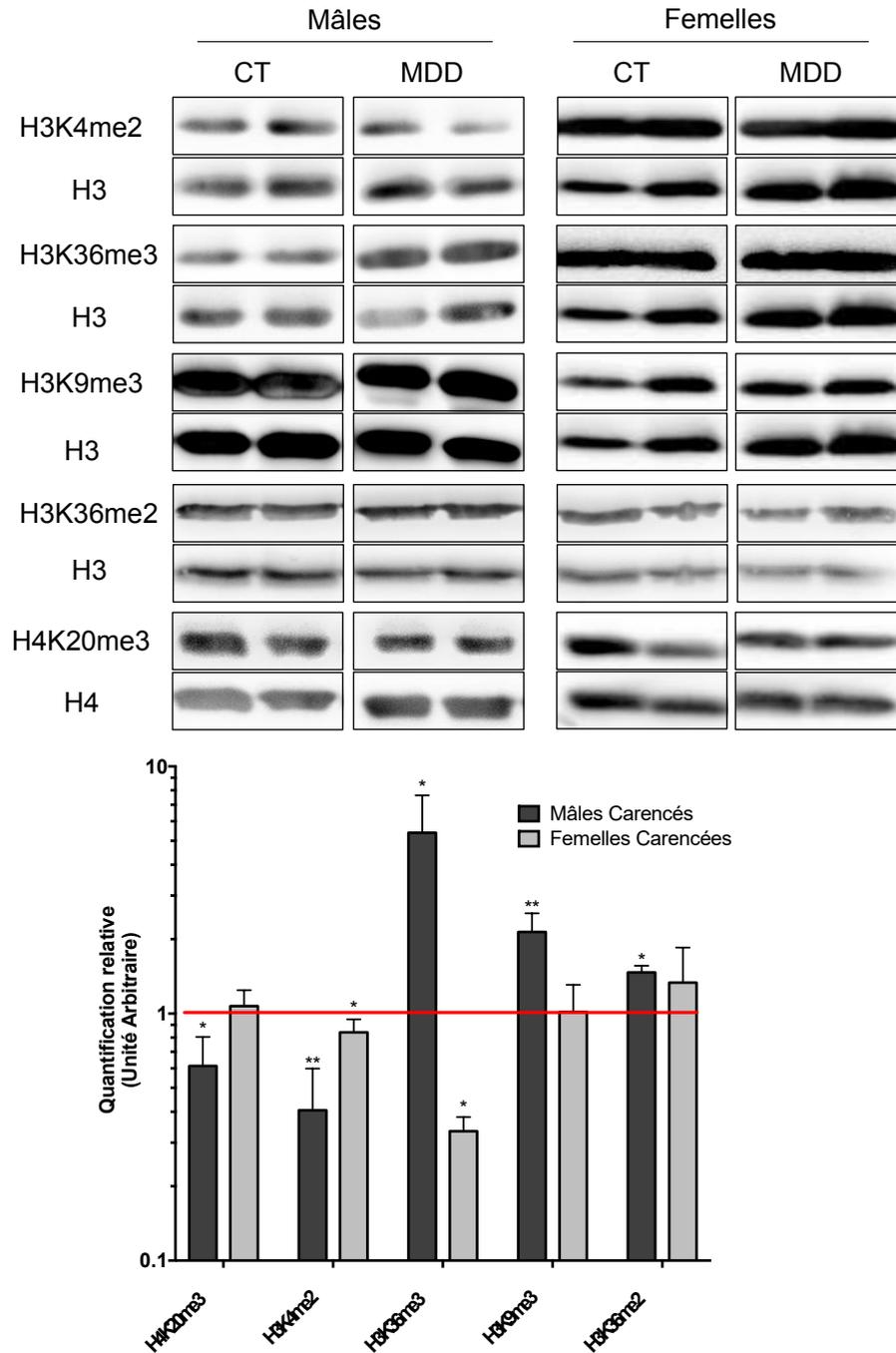


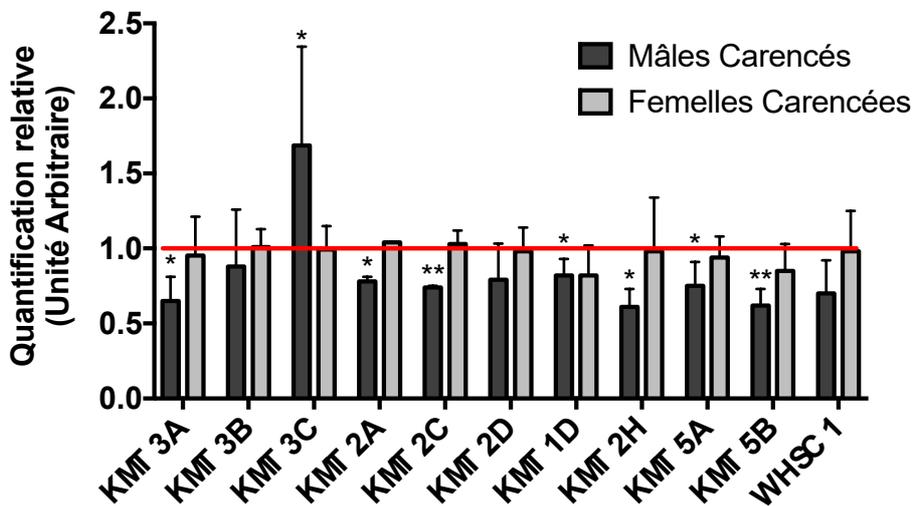
Figure 38 : Etude des marques histones d'intérêt.

Niveau d'expression des protéines histones méthylées chez les rats mâles (gris foncé) et femelles (gris clair) en condition carencée (issus du protocole nutritionnel MDD) en fonction des animaux contrôles (ligne rouge). La modification du résidu est quantifiée par rapport au niveau total de l'histone d'intérêt. L'histogramme en bas représente les résultats de l'analyse densitométrique. N=5, * p-value<0,05, ** p-value<0,005.

3 L'expression des méthylases et déméthylases d'histones est altérée chez les rats MDD

Nous avons ensuite choisi d'étudier les enzymes responsables des marques histones d'intérêts. Nous avons étudié l'expression des ARNm codants pour 11 méthylases de la famille des KMT (*lysine methyl transferase*) et 7 déméthylases de la famille des KDM (*lysine demethylase*) présentées Figure 37. Il y a une variabilité plus importante chez les mâles qui présentent une sous-expression de la plupart des ARNm codant pour ces protéines (Figure 39). Ainsi, l'effet de la carence MDD chez les femelles est moindre concernant les ARNm codant pour ces protéines (Figure 39).

A.



B.

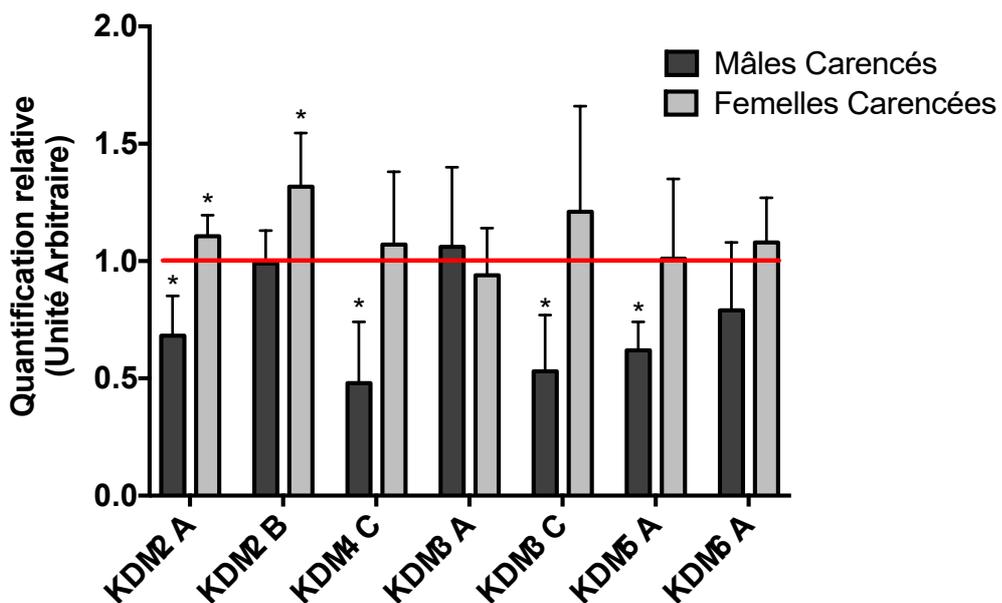


Figure 39 : Etude du niveau d'expression des ARNm codants pour les méthylases et déméthylases d'histones d'intérêt chez les rats issus du protocole MDD.

A. Niveau d'expression des ARNm des méthylases d'histones chez les rats mâles et femelles issus du protocole nutritionnel MDD par rapport aux contrôles (ligne rouge).

B. Niveau d'expression des ARNm des déméthylases d'histones chez les rats mâles et femelles issus du protocole nutritionnel MDD par rapport aux contrôles (ligne rouge).

N=5, * p-value<0,05, ** p-value<0,005

4 Les méthylases et déméthylases des familles KMT et KDM sont régulées par les miR du cluster Dlk1-Dio3

Par ailleurs, il a été montré au laboratoire, suite à une analyse du miRnome sur les cervelets des rats du protocole MDD, une réponse différentielle à la carence précoce en donneurs de méthyles pour certains miR entre mâles et femelles, dont les miR appartenant au cluster Dlk1-Dio3. L'expression des 4 miR testés augmente chez les mâles suite à la carence, mais ne varie pas chez les femelles (Figure 40).

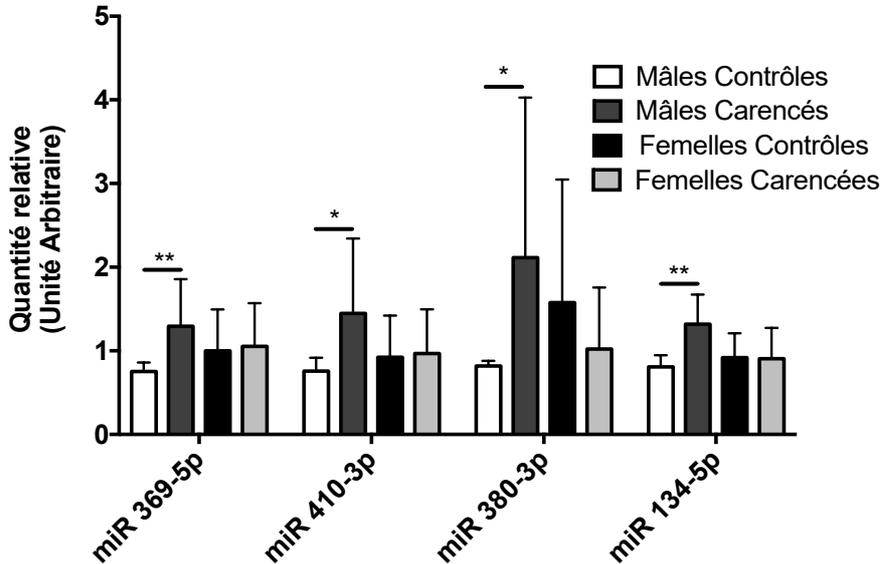


Figure 40 : Niveau d'expression de 4 miR du cluster Dlk1-Dio3 chez les rats issus du protocole MDD.

N=5, * p-value<0,05, ** p-value<0,005

D'après une analyse à l'aide du logiciel TargetScan (www.targetscan.org, (Agarwal et al., 2015)), ces miR sont prédits pour cibler plusieurs méthylases et déméthylases des

protéines histones des familles KMT et KDM (Tableau 9). Nous avons donc testé si une corrélation existait entre le niveau de ces miR et l'expression de cibles potentielles. Pour cela, des cellules de gliome de rat (lignée C6) ont été transfectées avec les miR-134-5p ou miR-369-5p et le taux d'ARNm de KMT5A et KDM2A analysé par RT-qPCR.

Tableau 9 : Méthylases et déméthylases prédites pour être des cibles des miR choisis dans cette étude.

miR-134-5p	miR-380-3p	miR-369-3p	miR-410-3p	mir-369-5p
KAT7	SALL1	SETD2	GRIA2	MAP1B
GRIK3	ATXN7	NCOA3	BDNF	SETD7
MAT2A	CCD1	ARID4A	KMT2D	KDM1B
CREB1	SMYD1	GRIA1	KDM2A	SETD3
KDM2A	CREB1	WNT3	RCOR1	KDM2A
SMYD2	ARID1A	KMT2A	MTHDF1	UBE3A
KMT2D	MECP2	CDC73	ARID4B	BRD3
KMT5B	KMD5A	CREB1	WNT7B	GRIK4
HDAC5	KDM2B	GRIN2A	GSK3B	
	JMJD1C	ARID2	NR3CA	
	GRIA4	GABRB3	JHDM1D/KDM7A	
			SETD3	
			WNT3	

On observe une diminution de l'expression des ARNm de ces cibles, confirmant les résultats observés dans les tissus cérébraux des rats (Figure 41). Nous avons également étudié la marque de méthylation H3K36me2 qui est contrôlée par KDM2A. Suite à la surexpression de miR-134-5p et à la diminution de l'expression de KMT5A, on retrouve une diminution de la marque H4K20me3. De même, suite à la surexpression de miR-369-5p et la diminution de l'expression de KDM2A, la méthylation au niveau de H3K36me2 diminue (Figure 41). On observe une diminution de la marque H3K36me2 lors de la surexpression de miR-134-5p, et ce malgré la diminution d'expression de KDM2A. De même, la surexpression de miR-369-5p entraîne une diminution de l'expression de KMT5B, avec une réduction de H4K20me3. Celle-ci pourrait être liée à l'augmentation de l'expression de miR-134-5p dans ces conditions (données non présentés).

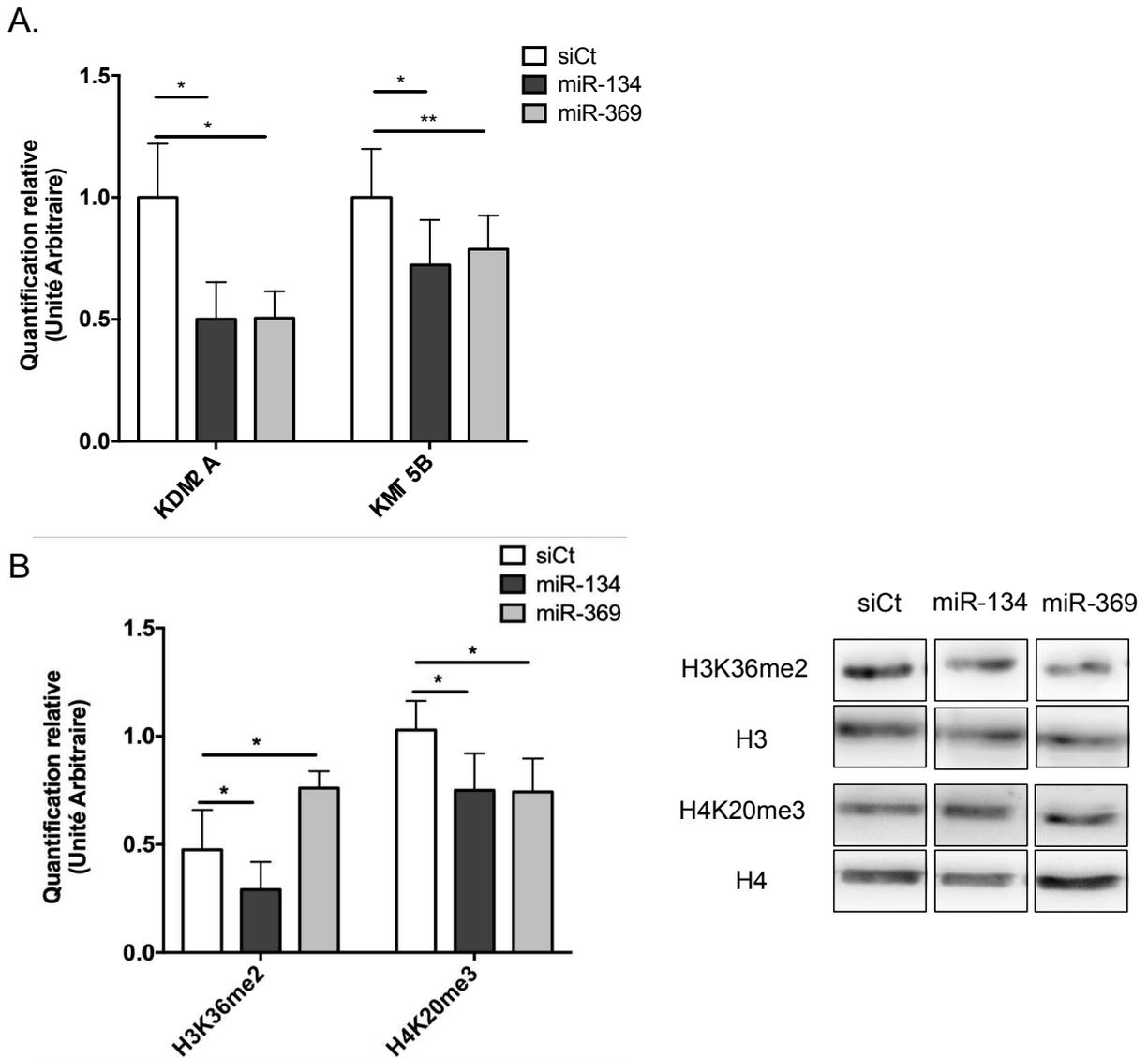


Figure 41 : Confirmation de nos résultats dans le modèle cellulaire C6.

A. Niveau d'expression des ARNm codant pour les protéines KDM2A et KMT5B dans les cellules C6 après transfection par un siARN contrôle (siCt, blanc), un « miR mimics » de miR-134-5p (miR-134, gris foncé) ou miR-369-5p (miR-369, gris clair), N=3.

B. Niveau d'expression des modifications d'histone H3K36me2 et H4K20me3 dans les cellules C6 traitées par un siARN contrôle (siCt, blanc), un « miR mimics » de miR-134-5p (miR-134, gris foncé) ou miR-369-5p (miR-369, gris clair), N=5.

*p-value<0,05, **p-value<0,005.

Discussion

Dans cette seconde partie des travaux, nous nous sommes intéressés à la méthylation des protéines histones chez les ratons nés de mères carencées afin de chercher une réponse moléculaire aux phénotypes neuronaux décrits. Des ratons issus de mères ayant subi une carence précoce (1 mois avant la gestation et jusqu'au sevrage) en donneurs de méthyles (MDD) ont été sacrifiés à J21. Nos études ont porté sur les cervelets de ces animaux. En effet, des études précédentes menées au laboratoire avaient révélé des troubles de la locomotion, avec des atteintes au niveau de la neurostéroïdogenèse (El Hajj Chehadeh et al., 2014), de la plasticité synaptique (Pourié et al., 2015) et des voies de signalisation Wnt (Willekens et al., 2019). Ces atteintes sont plus marquées chez les femelles que chez les mâles. De manière surprenante, nous avons observé plus de différences chez les mâles au niveau des modifications de la chromatine. En effet, les marques de méthylation que nous avons étudiées au niveau de la méthylation des lysines sur H3 et H4 sont plus altérées chez les mâles (Figure 38). Le niveau des ARNm des méthylases et déméthylases est globalement diminué chez les mâles carencés (Figure 39). Cette observation est corrélée à une augmentation de plusieurs miR appartenant au cluster Dlk1-Dio3, qui est connu pour cibler les méthylases et déméthylases d'histones (Figure 40) (Tableau 9, Tableau 10). Les mâles carencés étant moins affectés que les femelles au niveau plasticité synaptique, notre hypothèse est que les changements observés chez les mâles ont un effet protecteur. Notamment, l'augmentation du taux global de H3K36me2/3 (une marque activatrice) et la diminution du taux de H4K20me3 (une marque inhibitrice) pourraient contribuer à un maintien de l'expression des gènes impliqués dans la plasticité synaptique chez les mâles.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des variations de marques histones.

Les symboles bleus représentent les variations chez les mâles MDD comparés aux contrôles et les symboles roses représentent les variations chez les femelles MDD comparées aux contrôles.

Marques	Méthylases	Déméthylases	miR	Références
H4K20↓=	KMT2H ↓↑ KMT3B== KMT5A↓= KMT5B↓=		miR134-5p↑=	(Pellanda et al., 2012) (Li et al., 2017)
H3K9↑=	KMT1B↓=	KDM3A== KDM3C↓= KDM4C↓=	miR410-3p↑=	
H3K4↓↓	KMT2A↓= KMT2C↓= KMT2D==	KDM5A↓=	miR380-3p↑=	(Sadhu et al., 2013)
H3K36↑=	KMT3A↓= KMT3B== KMT3C↑=	KDM2A↓↑ KDM2B=↑ KDM4C↓=	miR369-5p↑=	

H4K20me3 (qui diminue chez les mâles MDD (Figure 38)) joue un rôle clé dans l'intégrité du génome, avec un rôle dans les processus de réparations de l'ADN, sa réplication ainsi que dans la compaction de la chromatine (Jørgensen et al., 2013). Cette observation est en accord avec une précédente étude au laboratoire s'intéressant au foie des ratons MDD (Pellanda et al., 2012). Nos résultats sont également en accord avec d'autres résultats de la littérature qui montrent qu'un siMTHFR (enzyme permettant la formation de méthyle-tétrahydrofolate (Figure 5)) induit une diminution de H4K20me3 dans des cellules HeLa (Li et al., 2017). De plus, on retrouve bien une diminution des ARNm des méthylases responsables de la marque H4K20me3 chez les mâles (KMT5A, KMT5B et KMT2H), ces ARNm ne varient pas en fonction de la carence chez les femelles (Figure 39). Enfin, nous avons pu constater que le miR134-5p qui cible KMT5B est surexprimé chez les mâles carencés (Figure 40), ce qui pourrait induire la diminution de l'expression de l'ARNm de KMT5B

et la diminution de la marque H4K20. La surexpression de miR-134-5p dans des cellules C6 induit bien ces changements (Figure 41).

La marque H3K4me2 est diminuée chez les mâles et les femelles mais la diminution est plus marquée chez les mâles (Figure 38). Ce résultat est également confirmé dans la littérature, il a été montré qu'une carence en donneurs de méthyles chez la levure *S. cerevisiae* provoque une diminution de la marque H3K4me2 (Sadhu et al., 2013). Cette observation est également appuyée par une diminution des méthylases KMT2A et KMT2C chez les mâles (Figure 39). Cependant, nous n'avons observé aucune variation des ARNm des méthylases et déméthylases responsables de cette marque chez les femelles (Figure 39), nous n'expliquons donc pas à ce jour sa diminution. Nous devrions étudier l'expression des protéines par western blot afin d'essayer de trouver des explications à nos interrogations ainsi que de confirmer ce que nous avons observé au niveau des ARNm.

Dans notre modèle, nous observons une augmentation de la marque H3K9me3 chez les jeunes mâles carencés (Figure 38). Ce résultat est contradictoire avec les données de la littérature. Tout d'abord, l'étude précédente du laboratoire se concentrant sur les foies n'avait mis en évidence aucune variation de cette marque (Pellanda et al., 2012). De plus, une étude a montré une diminution de cette marque dans le sperme des souris nourries avec un régime déficient en folate (Lambrot et al., 2013). Cette marque est également diminuée dans des embryons de poulets carencés en folate (Alata Jimenez et al., 2018). Enfin, la marque H3K9me3 est complètement perdue dans le cas d'une mutation de MTHDF1 (enzyme responsable de la conversion du formate dans le cycle des folates) chez *Arabidopsis Thaliana* (Groth et al., 2016). Néanmoins, nous observons une diminution des ARNm codants pour les déméthylases de cette marque (KDM3C et KDM4C) (Figure 39) qui pourrait expliquer notre résultat. De plus, le miR410-3p qui cible KDM4C est surexprimé chez les mâles carencés, confirmant nos observations (Figure 39). Malgré la discordance de nos observations par rapport à la littérature, qui peut être expliquée par une différence de modèles, de tissus ou encore de phase de développement, nos expériences sont complémentaires et se confirment, allant dans le sens de notre hypothèse de protection face à la carence.

Par ailleurs, nous observons une augmentation de la marque H3K36me2 (Figure 38). Cette marque est peu référencée dans le cadre d'une carence en donneurs de méthyles. Cependant, une étude réalisée sur une cohorte d'adulte exposés à l'arsénite au Bangladesh montre que la choline est positivement, et l'homocystéine

négativement, corrélée à cette marque dans le sang des hommes (Howe et al., 2017). Cette étude met également en évidence un biais sexuel quant à la réponse épigénétique suite à un stimulus environnemental. En effet, la présence de vitamine B12 dans le sang des femmes était positivement corrélée avec une autre marque : H3K79me2 (Howe et al., 2017). Enfin, la marque H3K36me3 est quant à elle augmentée chez les mâles mais diminuée chez les femelles. Une étude montre une diminution de cette marque suite à une carence en folates dans des embryons de poulets (Alata Jimenez et al., 2018). L'augmentation de cette marque chez les mâles est assez surprenante, néanmoins nous observons une diminution des ARNm de KDM2A et KDM4C, les déméthylases de H3K36, chez les mâles uniquement, ce qui permettrait d'expliquer cette observation (Figure 39). KDM2A est d'ailleurs ciblée par le miR369-5p qui se trouve augmenté chez les mâles carencés, en accord avec une diminution de l'ARNm de KDM2A.

Afin de s'assurer de la corrélation entre le niveau des miR et la régulation des marques histones *via* la régulation des méthylases/déméthylases, nous avons surexprimé les miR134 et miR369 dans un modèle cellulaire de gliome de rat et observé les variations des méthylases/déméthylases régulées par ces miR et les marques associées. Il paraît clair que miR134 cible bien KMT5B induisant une diminution de la marque H4K20 (Figure 41) validant ainsi nos hypothèses. Néanmoins, en ce qui concerne le miR369, le mécanisme semble plus complexe et n'est pas compris à ce jour.

Afin d'avoir une vue plus précise concernant la présence des méthylases/déméthylases au niveau des marques histones et de s'assurer de leur fonctionnalité pour affirmer nos hypothèses, nous envisageons de réaliser une expérience de ChIP qui nous permettra d'assurer la corrélation entre la diminution de la méthylation des histones et le maintien de l'expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique, tels que *Grid2* et *Gria3*.

Un biais sexuel au niveau de la réponse épigénétique suite à une carence en donneurs de méthyles a été mis en évidence lors de nos travaux. Ces observations sont en accord avec d'autres études qui ont montré par exemple qu'une supplémentation plutôt qu'une carence en folate chez les souris mères engendrait une perturbation de l'expression des gènes des hémisphères cérébraux différente selon le sexe de l'individu. Malgré une méthylation de l'ADN peu perturbée, les auteurs ont montré que l'expression des gènes dans les hémisphères cérébraux de la descendance est

perturbée, entraînant un mauvais développement du cerveau (Barua et al., 2016b). En effet, le bénéfice de la supplémentation en acide folique durant la gestation serait limité par la saturation de DHFR (*dihydrofolate reductase* Figure 5). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'un excès d'acide folique dans le sang induirait une compétition enzymatique avec les récepteurs aux folates et inhiberait le transport de méthyl-tétrahydrofolate, provoquant des variations de l'homéostasie neurale. Dans cette étude, les données ont mis en évidence des profils de méthylation des protéines histones et d'expression des gènes différents selon le sexe de la descendance. Dans notre modèle de rats MDD, les femelles présentent de fortes atteintes phénotypiques au niveau neuro-comportemental (difficulté d'apprentissage notamment), et moléculaires, au niveau de la plasticité synaptique et de la neurogenèse, mais moins de différences sont observées au niveau de la modification des protéines histones. Nous pensons donc que suite à la carence, les miR du cluster Dlk1-Dio3 sont surexprimés, ce qui permet de réguler les modifications des protéines histones dans le but de maintenir l'expression des gènes impliqués dans la plasticité synaptique, ce qui protégerait les mâles. Chez les femelles, nous n'observons pas d'augmentation des marques activatrices, ni de diminution des marques inhibitrices, l'expression des gènes est donc perturbée, c'est pourquoi nous retrouvons des altérations en aval, notamment au niveau de la plasticité synaptique. Pour conclure, les modifications de la méthylation des protéines histones observées chez les mâles semblent les protéger, en partie, contre les effets délétères observés au niveau neural.

Conclusion et perspectives

Les vitamines B9 et B12 sont des micronutriments uniquement apportés par l'alimentation. Des carences sont retrouvées principalement chez les femmes enceintes dont les besoins sont accrus ou chez les personnes âgées qui développent des troubles de l'absorption. Les personnes ayant des régimes alimentaires particuliers tels qu'un régime végétarien doivent être supplémentées. Les carences en vitamines B9 et B12 ont été associées à un risque accru de développer des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (McCarter et al., 2019, 2020). L'objectif de ce projet de thèse était d'enrichir les connaissances concernant l'impact moléculaire d'une carence en vitamines B9 et B12 en ce qui concerne les marques épigénétiques. En effet, au niveau moléculaire les vitamines B9 et B12 sont essentielles au bon fonctionnement du métabolisme des monocarbones, responsable de la synthèse de SAM, le donneur universel de groupements méthyles. La SAM est essentielle à la méthylation de nombreuses molécules, notamment des ARN et des protéines histones. Dans ce projet nous nous sommes intéressés à la méthylation m⁶A des ARNm ainsi qu'à la méthylation des histones.

1 La méthylation m⁶A est perturbée en cas de carence en vitamine B12 chez la souris

Une carence stricte en vitamine B12 provoque une diminution globale de la méthylation m⁶A des ARNm. Ce défaut de la méthylation est dû à une diminution de la quantité de SAM et une perturbation de l'expression des acteurs de la méthylation m⁶A. Nous avons observé une augmentation de la méthylation m⁶A au niveau local pour l'ARNm de PRKCA provoquant une surexpression de la protéine, dans 2 modèles cellulaires murins : un modèle de neuroblastome murin génétiquement modifié ainsi qu'un modèle de fibroblastes embryonnaires murins KO pour le récepteur au complexe TC-vitamine B12, CD320. Pour la suite de ce projet, une analyse m⁶A-seq permettrait d'obtenir une vue globale de tous les ARNm différentiellement méthylés m⁶A en réponse à une carence en vitamine B12. Nous aimerions étudier la méthylation différentielle d'ARNm codant pour des protéines importantes pour les fonctions neurales afin de pouvoir expliquer, au moins en partie, les phénotypes neuronaux retrouvés lors d'une carence en vitamine B12.

Il serait également intéressant de pouvoir vérifier nos résultats sur un modèle humain. Le modèle de fibroblastes humains que nous avons utilisé n'a pas permis de valider nos résultats, néanmoins une étude du stress sur ce modèle est en cours, et pourrait permettre de mettre en évidence une réponse au stress différentielle notamment au niveau de la méthylation m⁶A selon la carence. Par ailleurs, nos expériences ont été faites sur un modèle de fibroblastes, or les atteintes d'une carence sont plutôt neuronales, il serait donc plus pertinent d'utiliser un modèle neural. Au laboratoire, nous avons transdifférencié ces fibroblastes en neurones. Il sera donc possible d'utiliser ce nouveau modèle afin de confirmer nos résultats. La vision précise des perturbations engendrées par une carence en vitamine B12 permettrait d'envisager des traitements ciblés pour les patients carencés. En effet, une supplémentation en vitamine B12 n'est pas efficace chez les personnes âgées qui n'arrivent pas à l'absorber, ni chez les patients ayant des défauts génétiques du métabolisme des monocarbones. Il est donc nécessaire de pouvoir agir en aval du métabolisme des monocarbones afin d'aider ces patients et de retarder, voire d'éviter, l'apparition des symptômes.

2 La méthylation des protéines histones a un effet protecteur contre la carence en donneurs de méthyles chez le rat

Lors de précédents travaux au laboratoire, il avait été montré qu'une carence en donneurs de méthyles avait un impact sur les capacités d'apprentissage des rats ayant subi une carence précoce en donneurs de méthyles. Une étude sur les foies de ces rats avait révélé une dérégulation de certaines marques de méthylation des histones. Nous avons donc décidé d'étudier ces marques, ainsi que d'autres qui nous ont semblé intéressantes au vu de la littérature, dans les cervelets des rats carencés. Les femelles étant plus atteintes phénotypiquement, ainsi qu'au niveau de la neurostéroïdogénèse ou de la plasticité synaptique, nous nous attendions à observer une variation des marques histones plus importante chez ses dernières. Or nos résultats ont montré une plus grande variation de la méthylation de certaines marques histones chez les mâles, pouvant être corrélée à une régulation de l'expression des ARNm des méthylases et déméthylases d'histones par les miR du cluster Dlk1-Dio3. Nous proposons de vérifier ces résultats en nous intéressant à l'expression de gènes cibles potentiels (tels que *Grid2* et *Gria3* dont l'expression diminue chez les femelles

carencées). Il s'agira de mesurer par ChIP si les marques activatrices ou inhibitrices sont plus ou moins présentes au niveau du promoteur et de la région codante, en fonction du sexe et de la carence. Suite à nos observations, nous émettons l'hypothèse que la régulation du processus de méthylation des histones a un effet protecteur contre la carence en donneurs de méthyles chez les mâles et pourrait contribuer au maintien de fonctions essentielles comme la neurostéroïdogénèse ou la plasticité synaptique.

La programmation foétale mise en évidence dans cette étude montre l'importance d'un mode de vie sain (alimentation équilibrée notamment) pendant la grossesse afin d'éviter l'apparition de pathologies dans la vie future de la descendance. Ce travail montre également un biais sexuel concernant la réponse faite suite à une carence en donneurs de méthyles. Il serait alors intéressant d'enrichir nos connaissances dans ce domaine afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées à cette réponse différentielle.

En résumé, cette étude soutient l'importance d'un bon apport en donneurs de méthyles et montre l'importance de l'épigénome dans le développement de maladies complexes touchant les fonctions cérébrales.

Références bibliographiques

- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife* 4.
- Agarwala, S.D., Blitzblau, H.G., Hochwagen, A., and Fink, G.R. (2012). RNA methylation by the MIS complex regulates a cell fate decision in yeast. *PLoS Genet.* 8, e1002732.
- Agris, P.F. (2004). Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Res.* 32, 223–238.
- Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourié, C., Kerek, R., Martin, N., Pourié, G., Koziel, V., Helle, D., Alberto, J.-M., Ortiou, S., Camadro, J.-M., et al. (2012). Homocysteinylation of neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 3980–3992.
- Alam, T., Medvedeva, Y.A., Jia, H., Brown, J.B., Lipovich, L., and Bajic, V.B. (2014). Promoter analysis reveals globally differential regulation of human long non-coding RNA and protein-coding genes. *PloS One* 9, e109443.
- Alarcón, C.R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., and Tavazoie, S.F. (2015a). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519, 482–485.
- Alarcón, C.R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., and Tavazoie, S.F. (2015b). HNRNPA2B1 Is a Mediator of m(6)A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell* 162, 1299–1308.
- Alata Jimenez, N., Torres Pérez, S.A., Sánchez-Vásquez, E., Fernandino, J.I., and Strobl-Mazzulla, P.H. (2018). Folate deficiency prevents neural crest fate by disturbing the epigenetic Sox2 repression on the dorsal neural tube. *Dev. Biol.* 444 *Suppl 1*, S193–S201.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 786–794.
- Althausen, S., and Paschen, W. (2000). Homocysteine-induced changes in mRNA levels of genes coding for cytoplasmic- and endoplasmic reticulum-resident stress proteins in neuronal cell cultures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 84, 32–40.
- Anderson, J.D., and Widom, J. (2000). Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J. Mol. Biol.* 296, 979–987.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The

nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10148–10152.

Arora, K., Sequeira, J.M., Alarcon, J.M., Wasek, B., Arning, E., Bottiglieri, T., and Quadros, E.V. (2019). Neuropathology of vitamin B12 deficiency in the Cd320^{-/-} mouse. *FASEB J.* *33*, 2563–2573.

Asano, K., Suzuki, T., Saito, A., Wei, F.-Y., Ikeuchi, Y., Numata, T., Tanaka, R., Yamane, Y., Yamamoto, T., Goto, T., et al. (2018). Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Res.* *46*, 1565–1583.

Ashraf, K., Nabeel-Shah, S., Garg, J., Saettone, A., Derynck, J., Gingras, A.-C., Lambert, J.-P., Pearlman, R.E., and Fillingham, J. (2019). Proteomic Analysis of Histones H2A/H2B and Variant Hv1 in *Tetrahymena thermophila* Reveals an Ancient Network of Chaperones. *Mol. Biol. Evol.* *36*, 1037.

Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* *22*, 2773–2785.

Balashova, O.A., Visina, O., and Borodinsky, L.N. (2018). FOLATE ACTION IN NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT AND DISEASE. *Dev. Neurobiol.* *78*, 391–402.

Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* *21*, 381–395.

Barbieri, I., Tzelepis, K., Pandolfini, L., Shi, J., Millán-Zambrano, G., Robson, S.C., Aspris, D., Migliori, V., Bannister, A.J., Han, N., et al. (2017). Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m6A-dependent translation control. *Nature* *552*, 126–131.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* *129*, 823–837.

Barua, S., Kuizon, S., Chadman, K.K., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2015). Microarray Analysis Reveals Higher Gestational Folic Acid Alters Expression of Genes in the Cerebellum of Mice Offspring—A Pilot Study. *Brain Sci.* *5*, 14–31.

Barua, S., Kuizon, S., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2016a). DNA Methylation Profiling at Single-Base Resolution Reveals Gestational Folic Acid Supplementation Influences the Epigenome of Mouse Offspring Cerebellum. *Front. Neurosci.* *10*, 168.

Barua, S., Kuizon, S., Brown, W.T., and Junaid, M.A. (2016b). High Gestational Folic Acid Supplementation Alters Expression of Imprinted and Candidate Autism Susceptibility Genes in a sex-Specific Manner in Mouse Offspring. *J. Mol. Neurosci.* *MN 58*, 277–286.

Bassell, G.J., and Warren, S.T. (2008). Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* *60*, 201–214.

Battaglia-Hsu, S., Akchiche, N., Noel, N., Alberto, J.-M., Jeannesson, E., Orozco-Barrios, C.E., Martinez-Fong, D., Daval, J.-L., and Guéant, J.-L. (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.

Battaglia-Hsu, S.-F., Ghemrawi, R., Coelho, D., Dreumont, N., Mosca, P., Hergalant, S., Gauchotte, G., Sequeira, J.M., Ndongue, M., Houlgatte, R., et al. (2018). Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res.*

Benevolenskaya, E.V. (2007). Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation. This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 28th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochem. Cell Biol.* *85*, 435–443.

Berger, S.H., Pittman, D.L., and Wyatt, M.D. (2008). Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 697–706.

Black, J.C., Van Rechem, C., and Whetstine, J.R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Mol. Cell* *48*.

Blaise, S., Alberto, J.-M., Nédélec, E., Ayav, A., Pourié, G., Bronowicki, J.-P., Guéant, J.-L., and Daval, J.-L. (2005). Mild neonatal hypoxia exacerbates the effects of vitamin-deficient diet on homocysteine metabolism in rats. *Pediatr. Res.* *57*, 777–782.

Blaise, S.A., Nédélec, E., Schroeder, H., Alberto, J.-M., Bossenmeyer-Pourié, C., Guéant, J.-L., and Daval, J.-L. (2007). Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. *Am. J. Pathol.* *170*, 667–679.

Blom, H.J., and Smulders, Y. (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* *34*, 75–81.

Böhmdorfer, G., and Wierzbicki, A.T. (2015). Control of chromatin structure by long noncoding RNA. *Trends Cell Biol.* *25*, 623–632.

Buker, S.M., Gurard-Levin, Z.A., Wheeler, B.D., Scholle, M.D., Case, A.W., Hirsch, J.L., Ribich, S., Copeland, R.A., and Boriack-Sjodin, P.A. (2020). A Mass Spectrometric Assay of METTL3/METTL14 Methyltransferase Activity. *SLAS Discov. Adv. Life Sci. R D* *25*, 361–371.

Cao, G., Li, H.-B., Yin, Z., and Flavell, R.A. (2016). Recent advances in dynamic m6A RNA

modification. *Open Biol.* 6.

Caudill, M.A., Wang, J.C., Melnyk, S., Pogribny, I.P., Jernigan, S., Collins, M.D., Santos-Guzman, J., Swendseid, M.E., Cogger, E.A., and James, S.J. (2001). Intracellular S-Adenosylhomocysteine Concentrations Predict Global DNA Hypomethylation in Tissues of Methyl-Deficient Cystathionine β -Synthase Heterozygous Mice. *J. Nutr.* 131, 2811–2818.

Cernilogar, F.M., Onorati, M.C., Kothe, G.O., Burroughs, A.M., Parsi, K.M., Breiling, A., Lo Sardo, F., Saxena, A., Miyoshi, K., Siomi, H., et al. (2011). Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature* 480, 391–395.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *Science* 318, 444–447.

Chen, J., Zhou, X., Wu, W., Wang, X., and Wang, Y. (2015). FTO-dependent function of N6-methyladenosine is involved in the hepatoprotective effects of betaine on adolescent mice. *J. Physiol. Biochem.* 71, 405–413.

Chen, J., Sun, Y., Xu, X., Wang, D., He, J., Zhou, H., Lu, Y., Zeng, J., Du, F., Gong, A., et al. (2017). YTH domain family 2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition/proliferation dichotomy in pancreatic cancer cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 16, 2259–2271.

Chen, M., Wei, L., Law, C.-T., Tsang, F.H.-C., Shen, J., Cheng, C.L.-H., Tsang, L.-H., Ho, D.W.-H., Chiu, D.K.-C., Lee, J.M.-F., et al. (2018). RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2. *Hepatology* 67, 2254–2270.

Cho, Y., Sloutsky, R., Naegle, K.M., and Cavalli, V. (2013). Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell* 155, 894–908.

Chujo, T., and Hirose, T. (2017). Nuclear Bodies Built on Architectural Long Noncoding RNAs: Unifying Principles of Their Construction and Function. *Mol. Cells* 40, 889–896.

Coelho, D., Suormala, T., Stucki, M., Lerner-Ellis, J.P., Rosenblatt, D.S., Newbold, R.F., Baumgartner, M.R., and Fowler, B. (2008). Gene identification for the *cbID* defect of vitamin B12 metabolism. *N. Engl. J. Med.* 358, 1454–1464.

Conway, G. (2006). STAT3-dependent pathfinding and control of axonal branching and target selection. *Dev. Biol.* 296, 119–136.

Courtney, D.G., Kennedy, E.M., Dumm, R.E., Bogerd, H.P., Tsai, K., Heaton, N.S., and Cullen, B.R. (2017). Epitranscriptomic Enhancement of Influenza A Virus Gene Expression and Replication. *Cell Host Microbe* 22, 377–386.e5.

Cui, Q., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., Sun, G., Lu, Z., Huang, Y., Yang, C.-G., et al.

- (2017). m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Rep.* *18*, 2622–2634.
- Czerwoniec, A., Dunin-Horkawicz, S., Purta, E., Kaminska, K.H., Kasprzak, J.M., Bujnicki, J.M., Grosjean, H., and Rother, K. (2009). MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2008 update. *Nucleic Acids Res.* *37*, D118-121.
- Dai, Z., Mentch, S.J., Gao, X., Nichenametla, S.N., and Locasale, J.W. (2018). Methionine metabolism influences genomic architecture and gene expression through H3K4me3 peak width. *Nat. Commun.* *9*, 1955.
- Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E.S., Manno, M., and Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *177*, 132–148.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.
- Deplus, R., Blanchon, L., Rajavelu, A., Boukaba, A., Defrance, M., Luciani, J., Rothé, F., Dedeurwaerder, S., Denis, H., Brinkman, A.B., et al. (2014). Regulation of DNA methylation patterns by CK2-mediated phosphorylation of Dnmt3a. *Cell Rep.* *8*, 743–753.
- Desrosiers, R., Friderici, K., and Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 3971–3975.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., et al. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* *485*, 201–206.
- Dreumont, N., Mimoun, K., Pourié, C., Quadros, E.V., Alberto, J.-M., Umoret, R., Helle, D., Robert, A., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., et al. (2020). Glucocorticoid Receptor Activation Restores Learning Memory by Modulating Hippocampal Plasticity in a Mouse Model of Brain Vitamin B12 Deficiency. *Mol. Neurobiol.*
- Du, Y., Hou, G., Zhang, H., Dou, J., He, J., Guo, Y., Li, L., Chen, R., Wang, Y., Deng, R., et al. (2018). SUMOylation of the m6A-RNA methyltransferase METTL3 modulates its function. *Nucleic Acids Res.* *46*, 5195–5208.
- Ducker, G.S., and Rabinowitz, J.D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* *25*, 27–42.
- Duthie, SJ (2011). Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. - PubMed - NCBI. *J Inherit Metab Dis* *34*, 101–109.
- El Hajj Chehadeh, S., Dreumont, N., Willekens, J., Canabady-Rochelle, L., Jeannesson, E.,

Alberto, J.-M., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., and Leininger-Muller, B. (2014). Early methyl donor deficiency alters cAMP signaling pathway and neurosteroidogenesis in the cerebellum of female rat pups. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *307*, E1009–E1019.

Engel, M., Eggert, C., Kaplick, P.M., Eder, M., Röh, S., Tietze, L., Namendorf, C., Arloth, J., Weber, P., Rex-Haffner, M., et al. (2018). The Role of m6A/m-RNA Methylation in Stress Response Regulation. *Neuron* *99*, 389-403.e9.

Estève, P.-O., Chin, H.G., Benner, J., Feehery, G.R., Samaranayake, M., Horwitz, G.A., Jacobsen, S.E., and Pradhan, S. (2009). Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 5076–5081.

Estève, P.-O., Chang, Y., Samaranayake, M., Upadhyay, A.K., Horton, J.R., Feehery, G.R., Cheng, X., and Pradhan, S. (2011). A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 42–48.

Fernández-Guasti, A., Fiedler, J.L., Herrera, L., and Handa, R.J. (2012). Sex, Stress, and Mood Disorders: At the Intersection of Adrenal and Gonadal Hormones. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* *44*, 607–618.

Finch, J.T., and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *73*, 1897–1901.

Finelli, M.J., Wong, J.K., and Zou, H. (2013). Epigenetic regulation of sensory axon regeneration after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 19664–19676.

Finkelstein, J.D., and Martin, J.J. (2000). Homocysteine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *32*, 385–389.

Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Brüning, J.C., and Rüther, U. (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* *458*, 894–898.

Fowler, B. (2001). The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int. Suppl.* *78*, S221-229.

Franzago, M., Fraticelli, F., Stuppia, L., and Vitacolonna, E. (2019). Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child. *Epigenetics* *14*, 215–235.

Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R.B., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., et al. (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* *316*, 889–894.

Fustin, J.-M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M.S., Kakeya, H., Manabe, I., et al. (2013). RNA-methylation-dependent RNA

processing controls the speed of the circadian clock. *Cell* 155, 793–806.

Gagnidze, K., Weil, Z.M., and Pfaff, D.W. (2010). Histone modifications proposed to regulate sexual differentiation of brain and behavior. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 32, 932–939.

Garcia, B.A., Luka, Z., Loukachevitch, L.V., Bhanu, N.V., and Wagner, C. (2016). Folate deficiency affects histone methylation. *Med. Hypotheses* 88, 63–67.

Garcia, M.M., Guéant-Rodriguez, R.-M., Pooya, S., Brachet, P., Alberto, J.-M., Jeannesson, E., Maskali, F., Gueguen, N., Marie, P.-Y., Lacolley, P., et al. (2011). Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1. *J. Pathol.* 225, 324–335.

Gaub, P., Joshi, Y., Wuttke, A., Naumann, U., Schnichels, S., Heiduschka, P., and Di Giovanni, S. (2011). The histone acetyltransferase p300 promotes intrinsic axonal regeneration. *Brain J. Neurol.* 134, 2134–2148.

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

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

Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.-C.L., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S.H., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., et al. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469–1472.

Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A.A., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y.S., et al. (2015). Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science* 347, 1002–1006.

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

Glasner, H., Riml, C., Micura, R., and Breuker, K. (2017). Label-free, direct localization and relative quantitation of the RNA nucleobase methylations m6A, m5C, m3U, and m5U by top-

down mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* *45*, 8014–8025.

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

Gräsbeck, R., Simons, K., and Sinkkonen, I. (1965). Isolation of intrinsic factors from human gastric juice. *Acta Chem. Scand.* *19*, 1777–1778.

Groth, M., Moissiard, G., Wirtz, M., Wang, H., Garcia-Salinas, C., Ramos-Parra, P.A., Bischof, S., Feng, S., Cokus, S.J., John, A., et al. (2016). MTHFD1 controls DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* *7*.

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

Guéant, J.-L., Caillerez-Fofou, M., Battaglia-Hsu, S., Alberto, J.-M., Freund, J.-N., Dulluc, I., Adjalla, C., Maury, F., Merle, C., Nicolas, J.-P., et al. (2013b). Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie* *95*, 1033–1040.

Guéant-Rodriguez, R.-M., Juillièrè, Y., Nippert, M., Abdelmouttaleb, I., Herbeth, B., Aliot, E., Danchin, N., and Guéant, J.-L. (2007). Left ventricular systolic dysfunction is an independent predictor of homocysteine in angiographically documented patients with or without coronary artery lesions. *J. Thromb. Haemost.* *JTH 5*, 1209–1216.

Guo, J.U., Ma, D.K., Mo, H., Ball, M.P., Jang, M.-H., Bonaguidi, M.A., Balazer, J.A., Eaves, H.L., Xie, B., Ford, E., et al. (2011). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat. Neurosci.* *14*, 1345–1351.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.

Han, M., Liu, Z., Xu, Y., Liu, X., Wang, D., Li, F., Wang, Y., and Bi, J. (2020). Abnormality of m6A mRNA Methylation Is Involved in Alzheimer’s Disease. *Front. Neurosci.* *14*, 98.

Hao, H., Hao, S., Chen, H., Chen, Z., Zhang, Y., Wang, J., Wang, H., Zhang, B., Qiu, J., Deng, F., et al. (2019). N6-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication. *Nucleic Acids Res.* *47*, 362–374.

Hatfield, D., Lee, B.J., Hampton, L., and Diamond, A.M. (1991). Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA[Ser]Sec population in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* *19*, 939–943.

Haws, S.A., and Denu, J.M. (2017). Regulation of Histone Methylation via Methionine Metabolism. *FASEB J.* *31*, 755.9-755.9.

Hayashi, T., Teruya, T., Chaleckis, R., Morigasaki, S., and Yanagida, M. (2018). S-

Adenosylmethionine Synthetase Is Required for Cell Growth, Maintenance of G₀ Phase, and Termination of Quiescence in Fission Yeast. *IScience* 5, 38–51.

He, J.C., Gomes, I., Nguyen, T., Jayaram, G., Ram, P.T., Devi, L.A., and Iyengar, R. (2005). The G_α(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J. Biol. Chem.* 280, 33426–33434.

Heck, A.M., Russo, J., Wilusz, J., Nishimura, E.O., and Wilusz, C.J. (2020). YTHDF2 destabilizes m⁶A-modified neural-specific RNAs to restrain differentiation in induced pluripotent stem cells. *RNA* rna.073502.119.

Hess, M.E., Hess, S., Meyer, K.D., Verhagen, L.A.W., Koch, L., Brönneke, H.S., Dietrich, M.O., Jordan, S.D., Saletore, Y., Elemento, O., et al. (2013). The fat mass and obesity associated gene (*Fto*) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat. Neurosci.* 16, 1042–1048.

Hesser, C.R., Karijolic, J., Dominissini, D., He, C., and Glaunsinger, B.A. (2018). N⁶-methyladenosine modification and the YTHDF2 reader protein play cell type specific roles in lytic viral gene expression during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *PLoS Pathog.* 14, e1006995.

Ho, A.J., Stein, J.L., Hua, X., Lee, S., Hibar, D.P., Leow, A.D., Dinov, I.D., Toga, A.W., Saykin, A.J., Shen, L., et al. (2010). A commonly carried allele of the obesity-related *FTO* gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8404–8409.

Hodes, G.E. (2013). Sex, stress, and epigenetics: regulation of behavior in animal models of mood disorders. *Biol. Sex Differ.* 4, 1.

Howe, C.G., Liu, X., Hall, M.N., Ilievski, V., Caudill, M.A., Malysheva, O., Lomax-Luu, A.M., Parvez, F., Siddique, A.B., Shahriar, H., et al. (2017). Sex-specific associations between one-carbon metabolism indices and posttranslational histone modifications in arsenic-exposed Bangladeshi adults. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 26, 261–269.

Huang, X., Lv, X., Song, H., Yang, Q., Sun, Y., Zhang, W., Yu, X., Dong, S., Yao, W., Li, Y., et al. (2017). The relationship between S-adenosylhomocysteine and coronary artery lesions: A case control study. *Clin. Chim. Acta* 471, 314–320.

Huemer, M., Bürer, C., Ješina, P., Kožich, V., Landolt, M.A., Suormala, T., Fowler, B., Savvopoulou, P.A., Blair, E., Brennerova, K., et al. (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.

Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jørgensen, H., Ellis, P., Stalker, J., Jackson, D., Clee, C., Plumb, R., Rogers, J., et al. (2008). A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.* *6*, e22.

Imam, H., Khan, M., Gokhale, N.S., McIntyre, A.B.R., Kim, G.-W., Jang, J.Y., Kim, S.-J., Mason, C.E., Horner, S.M., and Siddiqui, A. (2018). N6-methyladenosine modification of hepatitis B virus RNA differentially regulates the viral life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 8829–8834.

Iskandar, B.J., Rizk, E., Meier, B., Hariharan, N., Bottiglieri, T., Finnell, R.H., Jarrard, D.F., Banerjee, R.V., Skene, J.H.P., Nelson, A., et al. (2010). Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *J. Clin. Invest.* *120*, 1603–1616.

J, L., Y, Y., D, H., X, W., Y, F., L, Z., G, J., M, Y., Z, L., X, D., et al. (2014). A METTL3-METTL14 Complex Mediates Mammalian Nuclear RNA N6-adenosine Methylation (*Nat Chem Biol*).

Jarroux, J., Morillon, A., and Pinskaya, M. (2017). History, Discovery, and Classification of lncRNAs. In *Long Non Coding RNA Biology*, M.R.S. Rao, ed. (Singapore: Springer), pp. 1–46.

Ji, C., and Kaplowitz, N. (2003). Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* *124*, 1488–1499.

Jo, M.H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., and Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol. Cell* *59*, 117–124.

Jørgensen, S., Schotta, G., and Sørensen, C.S. (2013). Histone H4 Lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* *41*, 2797–2806.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* *12*, 206–222.

Kalea, A.Z., Drosatos, K., and Buxton, J.L. (2018). Nutriepigenetics and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *21*, 252–259.

Katoh, T., Hojo, H., and Suzuki, T. (2015). Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic Acids Res.* *43*, 7521–7534.

Kennedy, E.M., Bogerd, H.P., Kornepati, A.V.R., Kang, D., Ghoshal, D., Marshall, J.B., Poling, B.C., Tsai, K., Gokhale, N.S., Horner, S.M., et al. (2016). Posttranscriptional m(6)A Editing of HIV-1 mRNAs Enhances Viral Gene Expression. *Cell Host Microbe* *19*, 675–685.

Kerek, R., Geoffroy, A., Bison, A., Martin, N., Akchiche, N., Pourié, G., Helle, D., Guéant, J.-L., Bossenmeyer-Pourié, C., and Daval, J.-L. (2013). Early methyl donor deficiency may induce

persistent brain defects by reducing Stat3 signaling targeted by miR-124. *Cell Death Dis.* *4*, e755.

Kharbanda, K.K., Rogers, D.D., Mailliard, M.E., Siford, G.L., Barak, A.J., Beckenhauer, H.C., Sorrell, M.F., and Tuma, D.J. (2005). Role of elevated S-adenosylhomocysteine in rat hepatocyte apoptosis: protection by betaine. *Biochem. Pharmacol.* *70*, 1883–1890.

Kim, Y.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* *26*, 775–783.

Kim, G.H., Ryan, J.J., Marsboom, G., and Archer, S.L. (2011). Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* *1*, 347–356.

Klein, C.J., Botuyan, M.-V., Wu, Y., Ward, C.J., Nicholson, G.A., Hammans, S., Hojo, K., Yamanishi, H., Karpf, A.R., Wallace, D.C., et al. (2011). Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat. Genet.* *43*, 595–600.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 89–97.

Knuckles, P., Lence, T., Haussmann, I.U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S.H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., et al. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes Dev.* *32*, 415–429.

Koch, C.M., Andrews, R.M., Flicek, P., Dillon, S.C., Karaöz, U., Clelland, G.K., Wilcox, S., Beare, D.M., Fowler, J.C., Couttet, P., et al. (2007). The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res.* *17*, 691–707.

Kokame, K., Agarwala, K.L., Kato, H., and Miyata, T. (2000). Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* *275*, 32846–32853.

Koranda, J.L., Dore, L., Shi, H., Patel, M.J., Vaasjo, L.O., Rao, M.N., Chen, K., Lu, Z., Yi, Y., Chi, W., et al. (2018). Mettl14 is essential for epitranscriptomic regulation of striatal function and learning. *Neuron* *99*, 283-292.e5.

Kretschmer, J., Rao, H., Hackert, P., Sloan, K.E., Höbartner, C., and Bohnsack, M.T. (2018). The m6A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'–3' exoribonuclease XRN1. *RNA* *24*, 1339–1350.

Kruman, I.I., Mouton, P.R., Emokpae, R., Cutler, R.G., and Mattson, M.P. (2005). Folate deficiency inhibits proliferation of adult hippocampal progenitors. *Neuroreport* *16*, 1055–1059.

Ladd-Acosta, C., Pevsner, J., Sabunciyan, S., Yolken, R.H., Webster, M.J., Dinkins, T., Callinan, P.A., Fan, J.-B., Potash, J.B., and Feinberg, A.P. (2007). DNA methylation signatures within the human brain. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 1304–1315.

Lai, X., and Vera, J. (2013). MicroRNA Clusters. In *Encyclopedia of Systems Biology*, W.

- Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.-H. Cho, and H. Yokota, eds. (New York, NY: Springer), pp. 1310–1314.
- Lai, S.-C., Nakayama, Y., Sequeira, J.M., Wlodarczyk, B.J., Cabrera, R.M., Finnell, R.H., Bottiglieri, T., and Quadros, E.V. (2013). The transcobalamin receptor knockout mouse: a model for vitamin B12 deficiency in the central nervous system. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 2468–2475.
- Lambrot, R., Xu, C., Saint-Phar, S., Chountalos, G., Cohen, T., Paquet, M., Suderman, M., Hallett, M., and Kimmins, S. (2013). Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat. Commun.* *4*.
- Lang, F., Singh, R.K., Pei, Y., Zhang, S., Sun, K., and Robertson, E.S. (2019). EBV epitranscriptome reprogramming by METTL14 is critical for viral-associated tumorigenesis. *PLoS Pathog.* *15*, e1007796.
- Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 204–220.
- Legnini, I., Di Timoteo, G., Rossi, F., Morlando, M., Briganti, F., Sthandier, O., Fatica, A., Santini, T., Andronache, A., Wade, M., et al. (2017). Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol. Cell* *66*, 22-37.e9.
- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* *69*, 915–926.
- Li, H., Ren, Y., Mao, K., Hua, F., Yang, Y., Wei, N., Yue, C., Li, D., and Zhang, H. (2018a). FTO is involved in Alzheimer's disease by targeting TSC1-mTOR-Tau signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *498*, 234–239.
- Li, J., Meng, S., Xu, M., Wang, S., He, L., Xu, X., Wang, X., and Xie, L. (2018b). Downregulation of N6-methyladenosine binding YTHDF2 protein mediated by miR-493-3p suppresses prostate cancer by elevating N6-methyladenosine levels. *Oncotarget* *9*, 3752–3764.
- Li, J., Ahn, J.H., and Wang, G.G. (2019). Understanding histone H3 lysine 36 methylation and its deregulation in disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *76*, 2899–2916.
- Li, M., Zhao, X., Wang, W., Shi, H., Pan, Q., Lu, Z., Perez, S.P., Suganthan, R., He, C., Bjørås, M., et al. (2018c). Ythdf2-mediated m6A mRNA clearance modulates neural development in mice. *Genome Biol.* *19*, 69.
- Li, X., Yang, J., Zhu, Y., Liu, Y., Shi, X., and Yang, G. (2016a). Mouse Maternal High-Fat Intake Dynamically Programmed mRNA m6A Modifications in Adipose and Skeletal Muscle Tissues in Offspring. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Li, X., Nai, S., Ding, Y., Geng, Q., Zhu, B., Yu, K., Zhu, W.-G., Dong, M.-Q., Su, X.-D., Xu,

- X., et al. (2017). Polo-like kinase 1 (PLK1)-dependent phosphorylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) regulates replication via histone methylation. *Cell Cycle* *16*, 1933–1942.
- Li, Y., Huang, T., Zheng, Y., Muka, T., Troup, J., and Hu, F.B. (2016b). Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* *5*.
- Liao, S., Sun, H., and Xu, C. (2018). YTH Domain: A Family of N6-methyladenosine (m6A) Readers. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *16*, 99–107.
- Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G.M., Bansal, V., Wang, Y., Mason, C.E., and Rana, T.M. (2016a). Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat. Microbiol.* *1*, 16011.
- Lichinchi, G., Zhao, B.S., Wu, Y., Lu, Z., Qin, Y., He, C., and Rana, T.M. (2016b). Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* *20*, 666–673.
- Lin, S.-T., and Fu, Y.-H. (2009). miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis. Model. Mech.* *2*, 178–188.
- Lin, H., Ni, T., Zhang, J., Meng, L., Gao, F., Pan, S., Luo, H., Xu, F., Ru, G., Chi, J., et al. (2018). Knockdown of Herp alleviates hyperhomocysteinemia mediated atherosclerosis through the inhibition of vascular smooth muscle cell phenotype switching. *Int. J. Cardiol.* *269*, 242–249.
- Liu, N., and Pan, T. (2015). RNA epigenetics. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *165*, 28–35.
- Liu, J., Eckert, M.A., Harada, B.T., Liu, S.-M., Lu, Z., Yu, K., Tienda, S.M., Chryplewicz, A., Zhu, A.C., Yang, Y., et al. (2018). m6A mRNA methylation regulates AKT activity to promote the proliferation and tumorigenicity of endometrial cancer. *Nat. Cell Biol.* *20*, 1074–1083.
- Liu, K., Tedeschi, A., Park, K.K., and He, Z. (2011). Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* *34*, 131–152.
- Liu, T., Wei, Q., Jin, J., Luo, Q., Liu, Y., Yang, Y., Cheng, C., Li, L., Pi, J., Si, Y., et al. (2020). The m6A reader YTHDF1 promotes ovarian cancer progression via augmenting EIF3C translation. *Nucleic Acids Res.*
- Liu, Y., Liu, K., Yin, L., Yu, Y., Qi, J., Shen, W.-H., Zhu, J., Zhang, Y., and Dong, A. (2019). H3K4me2 functions as a repressive epigenetic mark in plants. *Epigenetics Chromatin* *12*, 40.
- Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 572–583.
- Luhrmann, R., Appel, B., Bringmann, P., Rinke, J., Reuter, R., Rothe, S., and Bald, R. (1982).

- Isolation and characterization of rabbit anti-m3 2,2,7G antibodies. *Nucleic Acids Res.* *10*, 7103–7113.
- Lund, E., Liu, M., Hartley, R.S., Sheets, M.D., and Dahlberg, J.E. (2009). Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA N. Y. N* *15*, 2351–2363.
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.* *19*, 81–92.
- Ma, C., Chang, M., Lv, H., Zhang, Z.-W., Zhang, W., He, X., Wu, G., Zhao, S., Zhang, Y., Wang, D., et al. (2018). RNA m6A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum. *Genome Biol.* *19*, 68.
- Ma, J.-Z., Yang, F., Zhou, C.-C., Liu, F., Yuan, J.-H., Wang, F., Wang, T.-T., Xu, Q.-G., Zhou, W.-P., and Sun, S.-H. (2017). METTL14 suppresses the metastatic potential of hepatocellular carcinoma by modulating N6 -methyladenosine-dependent primary MicroRNA processing. *Hepatology. Baltim. Md* *65*, 529–543.
- Maeda, T., Fujita, Y., Tanabe-Fujimura, C., Zou, K., Liu, J., Liu, S., Kikuchi, K., Shen, X., Nakajima, T., and Komano, H. (2018). An E3 Ubiquitin Ligase, Synoviolin, Is Involved in the Degradation of Homocysteine-Inducible Endoplasmic Reticulum Protein. *Biol. Pharm. Bull.* *41*, 915–919.
- Majumder, A., Singh, M., George, A.K., and Tyagi, S.C. (2019). Restoration of skeletal muscle homeostasis by hydrogen sulfide during hyperhomocysteinemia-mediated oxidative/ER stress condition 1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *97*, 441–456.
- Martin, N., Pourié, G., Bossenmeyer-Pourié, C., Jazi, R., Guéant, J.-L., Vert, P., and Daval, J.-L. (2010). Conditioning-like Brief Neonatal Hypoxia Improves Cognitive Function and Brain Tissue Properties with Marked Gender Dimorphism in Adult Rats. *Semin. Perinatol.* *34*, 193–200.
- Martin, S., Zekri, L., Metz, A., Maurice, T., Chebli, K., Vignes, M., and Tazi, J. (2013). Deficiency of G3BP1, the stress granules assembly factor, results in abnormal synaptic plasticity and calcium homeostasis in neurons. *J. Neurochem.* *125*, 175–184.
- Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* *80*, 487–498.
- McCarter, S.J., Teigen, L.M., McCarter, A.R., Benarroch, E.E., Louis, E.K.S., and Savica, R. (2019). Low Vitamin B12 and Parkinson Disease: Potential Link to Reduced Cholinergic Transmission and Severity of Disease. *Mayo Clin. Proc.* *94*, 757–762.
- McCarter, S.J., Stang, C., Turcano, P., Mielke, M.M., Ali, F., Bower, J.H., and Savica, R.

(2020). Higher vitamin B12 level at Parkinson's disease diagnosis is associated with lower risk of future dementia. *Parkinsonism Relat. Disord.* *73*, 19–22.

McCully, K.S. (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* *56*, 111–128.

Mentch, S.J., and Locasale, J.W. (2016). One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1363*, 91–98.

Merkurjev, D., Hong, W.-T., Iida, K., Oomoto, I., Goldie, B.J., Yamaguti, H., Ohara, T., Kawaguchi, S.-Y., Hirano, T., Martin, K.C., et al. (2018). Synaptic N6-methyladenosine (m6A) epitranscriptome reveals functional partitioning of localized transcripts. *Nat. Neurosci.* *21*, 1004–1014.

Meyer, K.D., and Jaffrey, S.R. (2014). The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 313–326.

Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., and Jaffrey, S.R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* *149*, 1635–1646.

Meyer, K.D., Patil, D.P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M.A., Elemento, O., Pestova, T.V., Qian, S.-B., and Jaffrey, S.R. (2015). 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* *163*, 999–1010.

Meyre, D., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Vatin, V., Gutiérrez-Aguilar, R., Lyon, D., Ma, M., Choquet, H., Horber, F., Van Hul, W., et al. (2010). Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals. *Diabetes* *59*, 311–318.

Miller, J.W., Nadeau, M.R., Smith, J., Smith, D., and Selhub, J. (1994). Folate-deficiency-induced homocysteinemia in rats: disruption of S-adenosylmethionine's co-ordinate regulation of homocysteine metabolism. *Biochem. J.* *298 (Pt 2)*, 415–419.

Mitchell, H.K., Snell, E.E., and Williams, R.J. (1988). Journal of the American Chemical Society, Vol. 63, 1941: The concentration of "folic acid" by Herschel K. Mitchell, Esmond E. Snell, and Roger J. Williams. *Nutr. Rev.* *46*, 324–325.

Mongan, N.P., Emes, R.D., and Archer, N. (2019). Detection and analysis of RNA methylation. *F1000Research* *8*.

Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Héry, P., Curtet, S., et al. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* *27*, 1680–1692.

Moore, D.L., and Goldberg, J.L. (2011). Multiple transcription factor families regulate axon growth and regeneration. *Dev. Neurobiol.* *71*, 1186–1211.

- Moore, L.D., Le, T., and Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 23–38.
- Moretti, R., and Caruso, P. (2019). The Controversial Role of Homocysteine in Neurology: From Labs to Clinical Practice. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8905–8909.
- Mosca, P., Leheup, B., and Dreumont, N. (2019). Nutrigenomics and RNA methylation: Role of micronutrients. *Biochimie* 164, 53–59.
- Narayan, P., and Rottman, F.M. (1988). An in vitro system for accurate methylation of internal adenosine residues in messenger RNA. *Science* 242, 1159–1162.
- Ng, S.S., Yue, W.W., Oppermann, U., and Klose, R.J. (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 407–422.
- Ngo, A.D., Taylor, R., and Roberts, C.L. (2010). Paternal exposure to Agent Orange and spina bifida: a meta-analysis. *Eur. J. Epidemiol.* 25, 37–44.
- Nguon, K., Ladd, B., Baxter, M.G., and Sajdel-Sulkowska, E.M. (2005). Sexual dimorphism in cerebellar structure, function, and response to environmental perturbations. *Prog. Brain Res.* 148, 341–351.
- Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T., and Ui-Tei, K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA N. Y. N* 19, 17–35.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 326, 1275–1279.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Panda, A.C. (2018). Circular RNAs Act as miRNA Sponges. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1087, 67–79.
- Patil, D.P., Chen, C.-K., Pickering, B.F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., and Jaffrey, S.R. (2016). m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature* 537, 369–373.
- Pellanda, H., Forges, T., Bressenot, A., Chango, A., Bronowicki, J.-P., Guéant, J.-L., and Namour, F. (2012). Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in

fetuses. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 976–985.

Pendleton, K.E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O.V., Xie, Y., Tu, B.P., and Conrad, N.K. (2017). The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell* 169, 824-835.e14.

Pérez-Dueñas, B., Ormazábal, A., Toma, C., Torrico, B., Cormand, B., Serrano, M., Sierra, C., De Grandis, E., Marfa, M.P., García-Cazorla, A., et al. (2011). Cerebral folate deficiency syndromes in childhood: clinical, analytical, and etiologic aspects. *Arch. Neurol.* 68, 615–621.

Ping, X.-L., Sun, B.-F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.-J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.-S., et al. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res.* 24, 177–189.

Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Muskhelishvili, L., Rusyn, I., and Ross, S.A. (2007). Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J. Nutr.* 137, 216S-222S.

Pons, L., Battaglia-Hsu, S.-F., Orozco-Barrios, C.E., Ortiou, S., Chery, C., Alberto, J.-M., Arango-Rodriguez, M.L., Dumas, D., Martinez-Fong, D., Freund, J.-N., et al. (2009). Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PloS One* 4, e6325.

Pooya, S., Blaise, S., Moreno Garcia, M., Giudicelli, J., Alberto, J.-M., Guéant-Rodriguez, R.-M., Jeannesson, E., Gueguen, N., Bressenot, A., Nicolas, B., et al. (2012). 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. *J. Hepatol.* 57, 344–351.

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

Puttagunta, R., Tedeschi, A., Sória, M.G., Hervera, A., Lindner, R., Rathore, K.I., Gaub, P., Joshi, Y., Nguyen, T., Schmandke, A., et al. (2014). PCAF-dependent epigenetic changes promote axonal regeneration in the central nervous system. *Nat. Commun.* 5, 3527.

Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127, 917–928.

Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000). Regulation of chromatin structure by site-

specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593–599.

Refsum, H., Ueland, P.M., Nygård, O., and Vollset, S.E. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Med.* 49, 31–62.

Ren, J.-L., Hou, Y.-L., Ni, X.-Q., Zhu, Q., Chen, Y., Zhang, L.-S., Liu, X., Xue, C.-D., Wu, N., Yu, Y.-R., et al. (2020). Intermedin1-53 Ameliorates Homocysteine-Promoted Atherosclerotic Calcification by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 25, 251–264.

de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A.M., et al. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat. Biotechnol.* 35, 872–878.

Rivera, M., Locke, A.E., Corre, T., Czamara, D., Wolf, C., Ching-Lopez, A., Milaneschi, Y., Kloiber, S., Cohen-Woods, S., Rucker, J., et al. (2017). Interaction between the FTO gene, body mass index and depression: meta-analysis of 13701 individuals. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 211, 70–76.

Román, G.C., Mancera-Páez, O., and Bernal, C. (2019). Epigenetic Factors in Late-Onset Alzheimer's Disease: MTHFR and CTH Gene Polymorphisms, Metabolic Transsulfuration and Methylation Pathways, and B Vitamins. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Romero-Barrios, N., Legascue, M.F., Benhamed, M., Ariel, F., and Crespi, M. (2018). Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 2169–2184.

Rosenfeld, J.A., Wang, Z., Schones, D.E., Zhao, K., DeSalle, R., and Zhang, M.Q. (2009). Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics* 10, 143.

Roundtree, I.A., Evans, M.E., Pan, T., and He, C. (2017). Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell* 169, 1187–1200.

Roundtree, I.A., Luo, G.-Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P., et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *ELife* 6.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86.

Růžička, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., Eeckhout, D., El-Showk, S., Li, H., Zhong, S., et al. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol.* 215, 157–172.

Sadhu, M.J., Guan, Q., Li, F., Sales-Lee, J., Iavarone, A.T., Hammond, M.C., Cande, W.Z., and

- Rine, J. (2013). Nutritional control of epigenetic processes in yeast and human cells. *Genetics* 195, 831–844.
- Safi, J., Joyeux, L., and Chalouhi, G.E. (2012). Periconceptional folate deficiency and implications in neural tube defects. *J. Pregnancy* 2012, 295083.
- Salbaum, J.M., and Kappen, C. (2012). Genetic and epigenomic footprints of folate. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 108, 129–158.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., and Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* 278, 1598–1609.
- Schapira, M. (2016). Structural Chemistry of Human RNA Methyltransferases. *ACS Chem. Biol.* 11, 575–582.
- Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S., and Postberg, J. (2011). H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma* 120, 275–285.
- Schnyder, G., Roffi, M., Pin, R., Flammer, Y., Lange, H., Eberli, F.R., Meier, B., Turi, Z.G., and Hess, O.M. (2001). Decreased rate of coronary restenosis after lowering of plasma homocysteine levels. *N. Engl. J. Med.* 345, 1593–1600.
- Schnyder, G., Roffi, M., Flammer, Y., Pin, R., and Hess, O.M. (2002). Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *JAMA* 288, 973–979.
- Schwaerzer, G.K., Kalyanaraman, H., Casteel, D.E., Dalton, N.D., Gu, Y., Lee, S., Zhuang, S., Wahwah, N., Schilling, J.M., Patel, H.H., et al. (2019). Aortic pathology from protein kinase G activation is prevented by an antioxidant vitamin B12 analog. *Nat. Commun.* 10.
- Schwartz, S., Mumbach, M.R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G.G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., et al. (2014). Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Rep.* 8, 284–296.
- Serefidou, M., Venkatasubramani, A.V., and Imhof, A. (2019). The Impact of One Carbon Metabolism on Histone Methylation. *Front. Genet.* 10, 764.
- Shen, E.Y., Ahern, T.H., Cheung, I., Straubhaar, J., Dincer, A., Houston, I., de Vries, G.J., Akbarian, S., and Forger, N.G. (2015). Epigenetics and sex differences in the brain: A genome-wide comparison of histone-3 lysine-4 trimethylation (H3K4me3) in male and female mice. *Exp. Neurol.* 268, 21–29.
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B.S., Ma, H., Hsu, P.J., Liu, C., and He, C. (2017). YTHDF3

facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res.* 27, 315–328.

Shi, H., Zhang, X., Weng, Y.-L., Lu, Z., Liu, Y., Lu, Z., Li, J., Hao, P., Zhang, Y., Zhang, F., et al. (2018). m6A facilitates hippocampus-dependent learning and memory through YTHDF1. *Nature* 563, 249–253.

Shima, H., Matsumoto, M., Ishigami, Y., Ebina, M., Muto, A., Sato, Y., Kumagai, S., Ochiai, K., Suzuki, T., and Igarashi, K. (2017). S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N6-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep.* 21, 3354–3363.

Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R., and Oberdoerffer, S. (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479, 74–79.

Simpson, R.T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17, 5524–5531.

Singhal, N.K., Li, S., Arning, E., Alkhayer, K., Clements, R., Sarcyk, Z., Dassanayake, R.S., Brasch, N.E., Freeman, E.J., Bottiglieri, T., et al. (2015). Changes in Methionine Metabolism and Histone H3 Trimethylation Are Linked to Mitochondrial Defects in Multiple Sclerosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 15170–15186.

Śledź, P., and Jinek, M. (2016). Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A writer complex. *ELife* 5.

Smithells, R.W., Sheppard, S., and Schorah, C.J. (1976). Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch. Dis. Child.* 51, 944–950.

Song, C.-X., Szulwach, K.E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C.-H., Zhang, W., Jian, X., et al. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Biotechnol.* 29, 68–72.

Spies, T.D. (1946). Treatment of macrocytic anaemia with folic acid. *Lancet Lond. Engl.* 1, 225–228.

Stein, C.S., Jadiya, P., Zhang, X., McLendon, J.M., Abouassaly, G.M., Witmer, N.H., Anderson, E.J., Elrod, J.W., and Boudreau, R.L. (2018). Mitoregulin: A lncRNA-Encoded Microprotein that Supports Mitochondrial Supercomplexes and Respiratory Efficiency. *Cell Rep.* 23, 3710-3720.e8.

Sun, W.-T., Wang, X.-C., Novakovic, A., Wang, J., He, G.-W., and Yang, Q. (2019). Protection of dilator function of coronary arteries from homocysteine by tetramethylpyrazine: Role of ER stress in modulation of BKCa channels. *Vascul. Pharmacol.* 113, 27–37.

Suzuki, T., Suzuki, T., Wada, T., Saigo, K., and Watanabe, K. (2002). Taurine as a constituent

of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J.* 21, 6581–6589.

Tan, Y.S., and Lei, Y.L. (2019). Generation and Culture of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1960, 85–91.

Tanzer, A., and Stadler, P.F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *J. Mol. Biol.* 339, 327–335.

Tedeschi, A., and Bradke, F. (2017). Spatial and temporal arrangement of neuronal intrinsic and extrinsic mechanisms controlling axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 42, 118–127.

Thomas, P., Wood, J., Chandra, A., Nimgaonkar, V.L., and Deshpande, S.N. (2010). Differences among Men and Women with Schizophrenia: A Study of US and Indian Samples. *Psychiatry Investig.* 7, 9–16.

Tirumuru, N., Zhao, B.S., Lu, W., Lu, Z., He, C., and Wu, L. (2016). N(6)-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *ELife* 5.

Troen, A.M., Shea-Budgell, M., Shukitt-Hale, B., Smith, D.E., Selhub, J., and Rosenberg, I.H. (2008). B-vitamin deficiency causes hyperhomocysteinemia and vascular cognitive impairment in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12474–12479.

Tryndyak, V.P., Marrone, A.K., Latendresse, J.R., Muskhelishvili, L., Beland, F.A., and Pogribny, I.P. (2016). MicroRNA changes, activation of progenitor cells and severity of liver injury in mice induced by choline and folate deficiency. *J. Nutr. Biochem.* 28, 83–90.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., and Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 355–367.

Tuorto, F., Legrand, C., Cirzi, C., Federico, G., Liebers, R., Müller, M., Ehrenhofer-Murray, A.E., Dittmar, G., Gröne, H.-J., and Lyko, F. (2018). Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *EMBO J.* 37.

Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* 128, 1105–1118.

Visentin, M., Diop-Bove, N., Zhao, R., and Goldman, I.D. (2014). The Intestinal Absorption of Folates. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 251–274.

Vujovic, P., Stamenkovic, S., Jasnic, N., Lakic, I., Djurasevic, S.F., Cvijic, G., and Djordjevic, J. (2013). Fasting Induced Cytoplasmic Fto expression in Some Neurons of Rat Hypothalamus. *PLOS ONE* 8, e63694.

Wallingford, J.B., Niswander, L.A., Shaw, G.M., and Finnell, R.H. (2013). The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. *Science* 339, 1222002.

Walters, B.J., Mercaldo, V., Gillon, C.J., Yip, M., Neve, R.L., Boyce, F.M., Frankland, P.W.,

and Josselyn, S.A. (2017). The Role of The RNA Demethylase FTO (Fat Mass and Obesity-Associated) and mRNA Methylation in Hippocampal Memory Formation. *Neuropsychopharmacology* *42*, 1502–1510.

Wang, C.-X., Cui, G.-S., Liu, X., Xu, K., Wang, M., Zhang, X.-X., Jiang, L.-Y., Li, A., Yang, Y., Lai, W.-Y., et al. (2018). METTL3-mediated m6A modification is required for cerebellar development. *PLoS Biol.* *16*.

Wang, J., Hevi, S., Kurash, J.K., Lei, H., Gay, F., Bajko, J., Su, H., Sun, W., Chang, H., Xu, G., et al. (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* *41*, 125–129.

Wang, X., Li, Z., Kong, B., Song, C., Cong, J., Hou, J., and Wang, S. (2017). Reduced m6A mRNA methylation is correlated with the progression of human cervical cancer. *Oncotarget* *8*, 98918–98930.

Wang, Y., Zhao, R., Russell, R.G., and Goldman, I.D. (2001). Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochim. Biophys. Acta* *1513*, 49–54.

Washbourne, P. (2015). Synapse assembly and neurodevelopmental disorders. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *40*, 4–15.

Watkins, D., and Rosenblatt, D.S. (2011). Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* *157*, 33–44.

Weber, C.M., and Henikoff, S. (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev.* *28*, 672–682.

Weng, Y.-L., An, R., Cassin, J., Joseph, J., Mi, R., Wang, C., Zhong, C., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., Bellacosa, A., et al. (2017). An Intrinsic Epigenetic Barrier for Functional Axon Regeneration. *Neuron* *94*, 337-346.e6.

Weng, Y.-L., Wang, X., An, R., Cassin, J., Vissers, C., Liu, Y., Liu, Y., Xu, T., Wang, X., Wong, S.Z.H., et al. (2018). Epitranscriptomic m6A Regulation of Axon Regeneration in the Adult Mammalian Nervous System. *Neuron* *97*, 313-325.e6.

Werstuck, G.H., Lentz, S.R., Dayal, S., Hossain, G.S., Sood, S.K., Shi, Y.Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S.K., Malinow, M.R., et al. (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J. Clin. Invest.* *107*, 1263–1273.

Willekens, J., Hergalant, S., Pourié, G., Marin, F., Alberto, J.-M., Georges, L., Paoli, J., Nemos, C., Daval, J.-L., Guéant, J.-L., et al. (2019). Wnt Signaling Pathways Are Dysregulated in Rat Female Cerebellum Following Early Methyl Donor Deficiency. *Mol. Neurobiol.* *56*, 892–906.

- Wills, L. (1931). TREATMENT OF “PERNICIOUS ANAEMIA OF PREGNANCY” AND “TROPICAL ANAEMIA.” *Br. Med. J.* *1*, 1059–1064.
- Wolf, S.S. (2009). The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 2109–2121.
- Wu, R., Li, A., Sun, B., Sun, J.-G., Zhang, J., Zhang, T., Chen, Y., Xiao, Y., Gao, Y., Zhang, Q., et al. (2019). A novel m6A reader Prrc2a controls oligodendroglial specification and myelination. *Cell Res.* *29*, 23–41.
- Wyatt, G.R. (1950). Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature* *166*, 237–238.
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Sun, H.-Y., Li, A., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., et al. (2016). Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol. Cell* *61*, 507–519.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell* *155*, 1568–1580.
- Xu, C., Liu, K., Ahmed, H., Loppnau, P., Schapira, M., and Min, J. (2015). Structural Basis for the Discriminative Recognition of N6-Methyladenosine RNA by the Human YT521-B Homology Domain Family of Proteins. *J. Biol. Chem.* *290*, 24902–24913.
- Yang, X.-J., and Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* *26*, 5310–5318.
- Yang, F., Yi, F., Han, X., Du, Q., and Liang, Z. (2013). MALAT-1 interacts with hnRNP C in cell cycle regulation. *FEBS Lett.* *587*, 3175–3181.
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., and Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15163–15168.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A., and Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* *26*, 577–590.
- Yang, Y., Shen, F., Huang, W., Qin, S., Huang, J.T., Sergi, C., Yuan, B.F., and Liu, S.M. (2018). Glucose is involved in the dynamic regulation of m6A in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., Das, P.K., Kivioja, T., Dave, K., Zhong, F., et al. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding

specificities of human transcription factors. *Science* 356.

Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 17–23.

Zhang, C., Samanta, D., Lu, H., Bullen, J.W., Zhang, H., Chen, I., He, X., and Semenza, G.L. (2016). Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E2047-2056.

Zhang, D.-M., Ye, J.-X., Mu, J.-S., and Cui, X.-P. (2017). Efficacy of Vitamin B Supplementation on Cognition in Elderly Patients With Cognitive-Related Diseases. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 30, 50–59.

Zhang, F., Kang, Y., Wang, M., Li, Y., Xu, T., Yang, W., Song, H., Wu, H., Shu, Q., and Jin, P. (2018a). Fragile X mental retardation protein modulates the stability of its m⁶A-marked messenger RNA targets. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3936–3950.

Zhang, X., Wei, L.-H., Wang, Y., Xiao, Y., Liu, J., Zhang, W., Yan, N., Amu, G., Tang, X., Zhang, L., et al. (2019). Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 2919–2924.

Zhang, X.-M., Huang, G.-W., Tian, Z.-H., Ren, D.-L., and Wilson, J.X. (2009). Folate stimulates ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in fetal neural stem cells. *Nutr. Neurosci.* 12, 226–232.

Zhang, Z., Wang, M., Xie, D., Huang, Z., Zhang, L., Yang, Y., Ma, D., Li, W., Zhou, Q., Yang, Y.-G., et al. (2018b). METTL3-mediated N⁶-methyladenosine mRNA modification enhances long-term memory consolidation. *Cell Res.* 28, 1050–1061.

Zhou, S., Bai, Z.-L., Xia, D., Zhao, Z.-J., Zhao, R., Wang, Y.-Y., and Zhe, H. (2018). FTO regulates the chemo-radiotherapy resistance of cervical squamous cell carcinoma (CSCC) by targeting β -catenin through mRNA demethylation. *Mol. Carcinog.* 57, 590–597.

Zhou, X., Chen, J., Chen, J., Wu, W., Wang, X., and Wang, Y. (2015). The beneficial effects of betaine on dysfunctional adipose tissue and N⁶-methyladenosine mRNA methylation requires the AMP-activated protein kinase α 1 subunit. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1678–1684.

Zhu, B., Xiahou, Z., Zhao, H., Peng, B., Zhao, H., and Xu, X. (2014). MTHFR promotes heterochromatin maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 702–706.

Annexes

Annexe 1 :: Inherited disorders of cobalamin metabolism
disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through
impaires methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR

Inherited disorders of cobalamin metabolism disrupt nucleocytoplasmic transport of mRNA through impaired methylation/phosphorylation of ELAVL1/HuR

Shyue-Fang Battaglia-Hsu^{1,*†}, Rose Ghemrawi^{1,†}, David Coelho¹, Natacha Dreumont¹, Pauline Mosca¹, Sébastien Hergalant¹, Guillaume Gauchotte¹, Jeffrey M. Sequeira², Mariam Ndiongue¹, Rémi Houlgatte¹, Jean-Marc Alberto¹, Remy Umoret¹, Aurélie Robert¹, Justine Paoli¹, Martin Jung³, Edward V. Quadros² and Jean-Louis Guéant^{1,*}

¹INSERM UMRS 954 NGERE – Nutrition, Genetics, and Environmental Risk Exposure and National Center of Inborn Errors of Metabolism, Faculty of Medicine of Nancy, University of Lorraine and University Regional Hospital Center of Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54000, France, ²Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, SUNY-Downstate Medical Center, Brooklyn, New York, NY, USA and ³Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University, Building 44, Homburg 66421, Germany

Received May 04, 2017; Revised June 26, 2018; Editorial Decision June 29, 2018; Accepted July 12, 2018

ABSTRACT

The molecular mechanisms that underlie the neurological manifestations of patients with inherited diseases of vitamin B12 (cobalamin) metabolism remain to date obscure. We observed transcriptomic changes of genes involved in RNA metabolism and endoplasmic reticulum stress in a neuronal cell model with impaired cobalamin metabolism. These changes were related to the subcellular mislocalization of several RNA binding proteins, including the ELAVL1/HuR protein implicated in neuronal stress, in this cell model and in patient fibroblasts with inborn errors of cobalamin metabolism and Cd320 knockout mice. The decreased interaction of ELAVL1/HuR with the CRM1/exportin protein of the nuclear pore complex and its subsequent mislocalization resulted from hypomethylation at R-217 produced by decreased S-adenosylmethionine and protein methyl transferase CARM1 and dephosphorylation at S221 by increased protein phosphatase PP2A. The mislocalization of ELAVL1/HuR triggered the decreased expression of SIRT1 deacetylase and genes involved in brain development, neuroplasticity, myelin formation, and brain aging. The mislocalization was reversible upon treatment with siPpp2ca, cobalamin, S-adenosylmethionine, or PP2A inhibitor

okadaic acid. In conclusion, our data highlight the key role of the disruption of ELAVL1/HuR nuclear export, with genomic changes consistent with the effects of inborn errors of Cbl metabolisms on brain development, neuroplasticity and myelin formation.

INTRODUCTION

Vitamin B12, (Cobalamin, Cbl) is essential for normal neurologic and hematologic development and function. However, the signalling pathway linking Cbl to the frequent neurological manifestations in diseases associated with errors of Cbl metabolism remains unidentified despite decades of intensive clinical and basic science investigations (1). The clinical presentation includes megaloblastic anemia, mental retardation and encephalopathy in paediatric patients with the inborn errors (1), and also peripheral neuropathy as well as other central nervous system (CNS) manifestations such as loss of memory and cognition, and dementia in Cbl deficient adult patients. Untreated, the neurologic sequelae can become permanent; therefore, a thorough understanding of the molecular mechanisms underlying the broad spectrum of symptoms is paramount for the enlargement of therapeutic options to these diseases (2).

In brain, cellular Cbl uptake is mediated by its binding in the form of Cbl-transcobalamin (TC) complex to CD320/TCBLR receptor (3,4). Once inside the cytoplasm, Cbl transforms into methylcobalamin (MeCbl) and serves as the cofactor for methionine synthase for *de novo* syn-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 72 74 61 35; Fax: +33 3 72 74 61 31; Email: jean-louis.gueant@univ-lorraine.fr
Correspondence may also be addressed to Shyuefang Battaglia-Hsu. Email: shyue-fang.battaglia@univ-lorraine.fr

†The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

thesis of methionine and its downstream production of S-adenosylmethionine (SAM) (2). SAM is the universal methyl donor for methylation of DNA and key proteins involved in the control of gene expression (2,5). There are only a handful of adequate experimental models for detailed mechanistic studies to decipher the roles of Cbl in brain. *Cd320* knockout mouse is a model with brain specific Cbl deficiency causing DNA hypomethylation (3,6). The TC-oleosin (TO) expressing strategy applied to cultured neuronal cells is another suitable model in which impaired Cbl metabolism can occur when cells overexpress TC-oleosin fusion protein (7). Cbl sequestration is only possible when TC is attached to oleosin at N-terminal (TO) but not C-terminal of oleosin (OT) - as no binding of Cbl to OT (oleosin-TC) is possible (7). Compared with WT mouse and OT cells, *Cd320* KO and TO cells, respectively, show significantly lower methionine synthase activity and methylation potential (6,8).

Little is known of the signalling pathways associated with disrupted Cbl metabolism in brain. Methionine synthase reductase (*Mtrr*) mutation altered gene expression through decreased DNA methylation and induced tissue malformations including neural tube (9). The nutritional model where Cbl and folate were both eliminated from food intake during pregnancy and lactation was shown to alter gene expressions in pups through imbalanced methylation and acetylation of nuclear receptors and their partner, PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) (10–14). Cbl impaired metabolism of the cultured TO neuroblastoma cells caused endoplasmic reticulum (ER) stress downstream of reduced SIRT1 expression (5). The latter result is in line with the previous proteomic results from fibroblasts with inborn errors of Cbl metabolism; these cells show large-scale changes in protein expression in ER and in ubiquitin-proteasome system with UPR (unfolded protein response) and anti-oxidative stress functions (15).

The presence of ER stress in cells deficient of Cbl may hold the key to understanding the Cbl-associated neurological manifestations as emerging evidences indicate that cellular stress can produce a subcellular mislocalization of RNA binding proteins (RBP) capable of disruption of mRNA processing, and lead to neurological diseases and brain ageing (16–18). Phosphorylation and methylation changes in RBPs such as ELAVL1/HuR, hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1), SRSF1 (serine/arginine-rich splicing factor 1) and Y14 (RNA Binding Motif Protein 8A) are part of the mechanisms that regulate the nucleocytoplasmic transport of mRNAs in cancer cells and in replicative senescence (19,20).

Our goal was thus to determine whether the neuropathological outcomes of inborn errors of Cbl metabolism are the consequences of dysregulated subcellular distribution of RBP. To address this issue, we examined three experimental models carrying compromised cellular Cbl metabolism, TO/OT N1E115 cells, *Cd320* KO mouse, and fibroblasts from patients with inherited defects leading to reduced methionine synthase activity. The evidence presented herein revealed that Cbl influences mRNA nucleocytoplasmic transport through controlling subcellular localization of RBPs, in particular on ELAVL1/HuR, by altering their methylation and phosphorylation status.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and siRNA/plasmid transfections

N1E115 cell culture protocol and stable transfection of TO and OT chimeric proteins was as described previously (8). Details are provided in supplementary methods. In experiments where siRNAs (*siElavl1*, *siPpp2ca*, *siCarm1* and control siRNA) were used, the siRNAs were obtained from Life technologies (Saint Aubin, France). The sequences and details of transfection are given in supplementary methods. We used the pcDNA3-ELAVL1/HuR-cFLAG (gifted by Dr J.A. Steitz, Yale University) as the template for the creation of ELAVL1/HuR mutations using the QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies; see supplementary methods for details). Cell culture of patient and control fibroblasts was performed as described (21).

Preparation of separate nuclear and cytoplasmic lysates

The separation of nuclear and cytoplasmic lysates was performed using Paris kit (Ambion, Life technologies). This kit was used according to the manufacturer's instructions.

Western blot

To prepare cell lysate, live cells or frozen mouse tissues were lysed directly with a solution containing sodium phosphate anhydrous dibasic, potassium dihydrogen phosphate, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate and Complete Protease Inhibitors (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Lysates were then subjected to centrifugation at 12 000 rpm for 30 min. The protein concentration of the supernatant was determined using BCA Protein Assay kit (Pierce, Brebieres, France) and BSA as standard protein. In general, 40 μ g of the total protein was loaded per lane for SDS-PAGE. Proteins from lysates were electro-transferred onto PVDF membranes; the latter were then processed by incubation with primary and secondary antibodies as described in supplementary methods. The protein bands were quantified densitometrically, normalized with β -actin, and expressed as arbitrary units.

Immunofluorescence

Neuroblastoma cells. N1E115 cells were grown on slides for 48 h, then fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at 4°C and blocked with 3% BSA overnight. Cells were incubated with various primary antibodies as described in supplementary methods. The immunostained cells were imaged using Nikon C2 confocal microscope equipped with three laser lines (405, 488 and 543 nm). The images were obtained with 60x oil immersion lens.

CD320 mice. The inactivation of the transcobalamin receptor (CD320 KO) in mouse produced an impaired uptake of Cbl in the CNS (4,6). Sagittal brain sections (paraffin) were processed as described previously in the *immunofluorescence-Neuroblastoma cells* section (supplementary methods).

Duolink (proximity ligation assay, PLA)

The proximity ligation assay (PLA; Duolink *in situ* PLA reagents; Olink Bioscience; Eurogentec, France) was performed to visualize and quantify interactions, as described previously (11,21). The PLA signals were counted as described in supplementary methods.

FISH staining

Neuroblastoma cells were grown on slides for 48 h, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS–0.1% triton. A prehybridization was performed followed by the hybridization; FISH probes were obtained from Eurogentec (Angers, France). The cells were imaged using Nikon C2. The detailed procedure is described in supplementary methods.

ImmunoPrecipitation (IP)

Live cells or minced frozen mouse brain tissues from hippocampus and striatum were lysed directly with the IP lysis/Wash buffer. The total protein used per IP reaction (500 μ g) was combined with 5 μ g of affinity purified antibody and incubated overnight at 4°C to form the immune complex. This complex was added to the resin Protein (Thermo Scientific). After centrifugation followed by four washes with lysis/wash buffer, the final pellet was combined with laemmli buffer and loaded onto SDS-PAGE gel for separation via electrophoresis. Immunoblottings were then obtained by procedures as described in supplementary methods.

Ribonucleoprotein immunoprecipitation (RIP)

The preparation of the immune complex (ELAVL1/HuR complex) was performed as described previously in the immunoprecipitation section above. Instead of adding laemmli buffer, 150 μ l IP lysis/Wash buffer, 7.5 μ l SDS 20% and 18 μ l Proteinase K (10 mg/ml) were added to the resin. This mixture was incubated for 30 min at 55°C with rotary agitation. Then a phenol–chloroform extraction was performed. Reverse transcription was done on the RNA by using the iScript cDNA Synthesis System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, Paris, France). Quantitative PCR was performed as described in supplementary methods.

Animals

The null *Cd320* KO mice were produced locally by cross breeding heterozygous C57BL/6N strain mice transported to France from SUNY Downstate Medical Center (Brooklyn, New York). The animal experiments were all performed in animal facilities authorized to carry out experimentation and followed the Directive 2010/63/EU revising the directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes.

Transcriptome

RNA was purified and hybridized on Agilent 44k Array as described in supplementary methods (22).

Statistics

Data were analyzed with Stata 12.0 software (StataCorp, College Station, TX, USA) and reported as means \pm S.E. Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) with Fisher's test. We assigned a number of determination per study groups of cell ($n = 8$ in each group) and animal experiments (12 males and 12 females), which corresponded to a study power calculation based on a 2-fold difference between groups, with $1-\beta = 0.8$ and $\alpha = 0.05$. A P -value 0.05 was considered to indicate statistical significance. Results were denoted by asterisks in figures ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$).

Study approval

We obtained the approval of the ethical committee for animal experiments of the region Lorraine to perform the animal study in *CD320* mice (agreement # 5454722).

RESULTS

The impaired cellular Cbl availability produced dramatic transcriptomic changes associated with mislocalization of RNA binding proteins in TO and OT cells cultured in the presence of endoplasmic reticulum stress inducer G418

Reduced Cbl cellular availability influenced considerably the transcriptome of the cell model studied (TO versus OT cells; Supplementary Table S1 and S2 and Supplementary Figures S1 and S2). Metabolic processing of RNA, cellular response to stress, regulation of cell cycle, neurogenesis, neuron differentiation, neuroplasticity and neuron development were among the top molecular and cellular functions affected (Supplementary Table S1 and S2). Some of these changes were related to neuroplasticity, including altered expression in dopaminergic, GABAergic, serotonergic and cholinergic synapses (Supplementary Figure S1). The prominent changes related to metabolic processing of RNA and cellular response to stress led us to investigate potential deregulation of RNA transport mediated by RBPs, including ELAVL1/HuR, hnRNPA1, Y14, SRSF1 (also named ASF/SF2), FMRP, TDP43, and MLN51 (Figure 1 and Supplementary Figure S3). The transfected TO and OT cells were cultivated in the presence of G418. This aminoglycoside is used to maintain the expression of the *neo* gene to ensure stable transgene expression; it produces ER stress. We studied thus the effect of G418 on non-transfected N1E115 cells. The introduction of G418 in culture medium targeted ELAVL1/HuR into cytoplasm in both non-transfected N1E115 cells and OT control cells (Figures 1 and 2A); interestingly, G418 also caused a limited amount of hnRNPA1 shuttling into cytoplasm in control OT cells, but it had no effect on the nuclear localization of Y14 and SRSF1 (Figure 1A). In TO cells with the presence of G418, its Cbl deficiency blocked ELAVL1/HuR export and caused cytoplasmic retention of hnRNPA1, Y14 and SRSF1 (Figure 1A). This mislocalization was not observed in the other RBPs investigated (Supplementary Figure S3). These effects depended on protein methylation as the treatment in OT cells with AdoX, an antagonist of SAM and a general methylation blocker, triggered ELAVL1/HuR, Y14

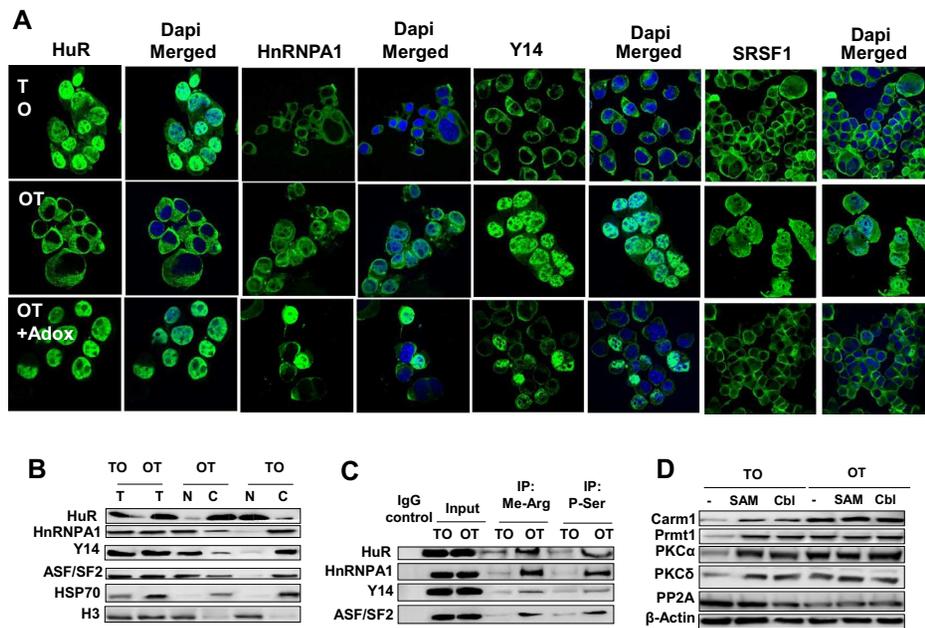


Figure 1. Subcellular mislocalization of RNA binding proteins (RBPs) in relation with their arginine methylation and serine phosphorylation and the expression of methyltransferases, kinases and protein phosphatase PP2A. (A) Subcellular localization of ELAVL1/HuR, hnRNPA1, Y14, SRSF1 examined using immunofluorescence technique in TO versus OT cells. In control OT cells, RBPs shuttling block could be induced by adding AdoX. (B) Western blots of nuclear and cytosolic ELAVL1/HuR, hnRNPA1, Y14, and ASF/SF2 (also named SRSF1) protein extracted from Cbl-lacking TO versus control OT cells. Histone 3 and heat shock protein 70 were used as internal controls; abbreviation: T, total protein extract; N, nuclear protein extract; C, cytosolic protein extract. (C) Immunoprecipitated RBPs were probed with anti-methyl-arginine and anti-phosphoserine antibody, respectively, to evaluate their methylation and phosphorylation status. (D) Expression of methyltransferases (CARM1 and PRMT1), kinases (PKC α , PKC δ) and phosphatase PP2A in TO versus OT cells. Their expressions were cobalamin (Cbl) and SAM dependent.

and SRSF1 to localize to the same subcellular compartment as that observed in TO cells (Figure 1A). The mislocalization detected by immunofluorescence was later confirmed by Western blots (Figure 1B and Supplementary Figure S4). Western blots of the immunoprecipitated RBPs showed equally less arginine methylation and serine phosphorylation of ELAVL1/HuR, hnRNPA1, Y14 and SRSF1 in TO versus OT cells (Figure 1C and Supplementary Figure S4). Indeed, we found decreased expressions of CARM1 and PKCs, the enzymes involved in arginine methylation and serine phosphorylation of these RBPs, and an increased expression of PP2A phosphatase in TO versus OT cells (Figure 1D and Supplementary Figures S4 and S6).

Taken together, our data showed that impaired Cbl availability caused subcellular mislocalization and decreased arginine-methylation and serine-phosphorylation of RBPs, with ELAVL1/HuR as the most affected RBP in TO versus OT cells exposed to G418.

The mislocalization of RNA binding proteins was also observed in fibroblasts of patient with inborn errors of Cbl metabolism and in Cd320 KO mice

In control wild type fibroblasts, we found ELAVL1/HuR localized exclusively to the nucleus. The exposure of these cells to G418 targeted ELAVL1/HuR into cytoplasm in more than 60% of the wild type cells. This effect was reversed with the addition of Cbl (Figure 2B). In contrast, in *CblG* fibroblasts, ELAVL1/HuR was localized to both the nucleus and cytoplasm, and this subcellular distribu-

tion pattern could not be modified further by the addition of G418 (Figure 2B). These results suggested that the nucleocytoplasmic shuttling of ELAVL1/HuR was partially blocked in *CblG* fibroblasts (even under ER stress with the presence of G418). In mice, the subcellular localization of ELAVL1/HuR changed with age. At 7 weeks old, no difference between wild type and *Cd320* KO mice was observed in ELAVL1/HuR subcellular distribution in brain, both being nuclear-bound. This changed with age; at 40 weeks in several neuronal types such as hippocampal neurons, ELAVL1/HuR was predominantly cytoplasmic in wild type mice, in contrast to the nuclear localization observed in *Cd320* KO mice (Figure 2C). Thus, we suggested that in WT mice the physiological stress of ageing is the driving force for ELAVL1/HuR export into the cytoplasm. In wild type neurons, ELAVL1/HuR successfully shuttled into the cytoplasm to exert anti-stress response. However, in *Cd320* KO mice, this failed due to the dysregulated ELAVL1/HuR export.

The disruption of ELAVL1/HuR export triggered the nuclear retention of ELAVL1/HuR-specific AU-rich RNA including *Sirt1* mRNA

We subsequently asked whether the altered distribution of ELAVL1/HuR could block the nucleocytoplasmic mRNA transport in general and in particular *Sirt1*. Using degenerated RNA probes designed for ELAVL1/HuR (23), we observed a higher labeling intensity of the ELAVL1/HuR-specific AU-rich RNAs in the nucleus of TO versus OT

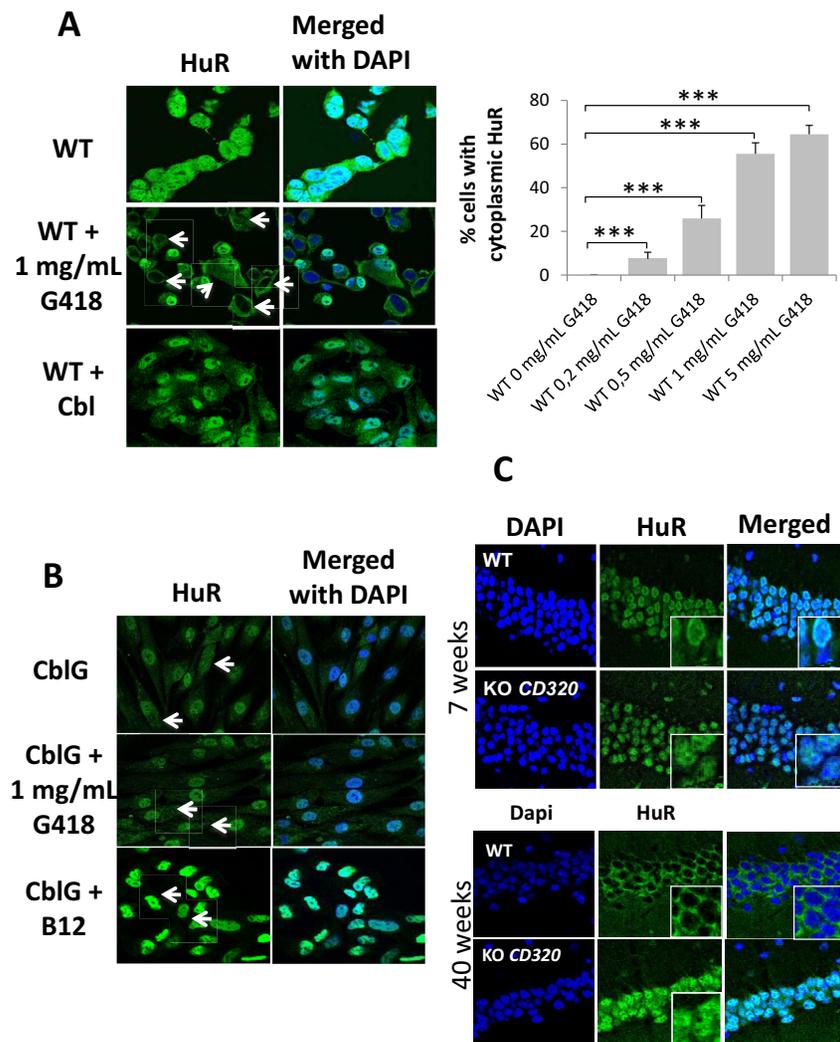


Figure 2. Localization of ELAVL1/HuR in wild type N1E115 cells, fibroblasts with inborn error of CblG, and Cd320 KO mice. (A) Effect of G418 on the nuclear localization of ELAVL1/HuR in control N1E115 (WT, wild type, $P < 0.001$, ANOVA). (B) Nucleus and cytoplasm localization of ELAVL1/HuR in fibroblasts of the CblG patient in the presence and absence of G418. Cobalamin increased the nuclear localization of ELAVL1/HuR in CblG cells. (C) In mice model, ELAVL1/HuR localization altered with age. In young animal, no difference was noted on the nuclear localization of ELAVL1/HuR; with age due to aging stress, in wild type mice ELAVL1/HuR became localized to the cytoplasm while in KO mice, ELAVL1/HuR remained nuclear. Here, hippocampal neurons were used to illustrate the mislocalization associated with aging stress of the Cd320 mice.

cells (Figure 3A). Consistent with this, significant transcriptomic changes in TO versus OT cells involved the known targets of ELAVL1/HuR (<http://starbase.sysu.edu>). In fact, among the 2447 orthologous ELAVL1/HuR targets in mouse, the transcription of as much as 82% of them were altered in TO versus OT cells (Supplementary Figure S2). The top functional annotations of these genes were related to RNA transport, ER stress, neuroplasticity, protein acetylation and cell cycle (Supplementary Figure S2, Supplementary Table S1). These results suggested that the cellular Cbl deficit caused nuclear sequestration of the AU-rich RNAs through impaired export of ELAVL1/HuR. Among the AU-rich targets of ELAVL1/HuR, we examined in particular the *Sirt1* transcript as we previously found decreased SIRT1 expression in TO versus OT cells (5). We performed RNP immunoprecipitation (RIP) of ELAVL1/HuR and we found a slight decrease of the amount of ELAVL1/HuR-

bound *Sirt1* mRNA in TO versus OT cells (Figure 3B). It should be noted that the real difference in the amount of cytoplasmic *Sirt1* mRNA bound to ELAVL1/HuR between TO and OT cells was underestimated since whole cell lysates were used for the RIP. The treatment of TO cells with SAM had no significant effect on the binding of ELAVL1/HuR to *Sirt1* mRNA. In agreement with this finding, AdoX had no effect in OT cells. These results showed therefore that the methylation of ELAVL1/HuR has a limited influence, if any, on the amount of ELAVL1/HuR-bound *Sirt1* mRNA in TO versus OT cells. In contrast, the treatment of TO cells with Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 2 (PP2A) increased the binding of ELAVL1/HuR to *Sirt1* mRNA. The effect of Okadaic acid suggests that the increased phosphorylation of ELAVL1/HuR may increase its binding to *Sirt1* mRNA. Conversely, the decreased phosphorylation of ELAVL1/HuR may explain the slight de-

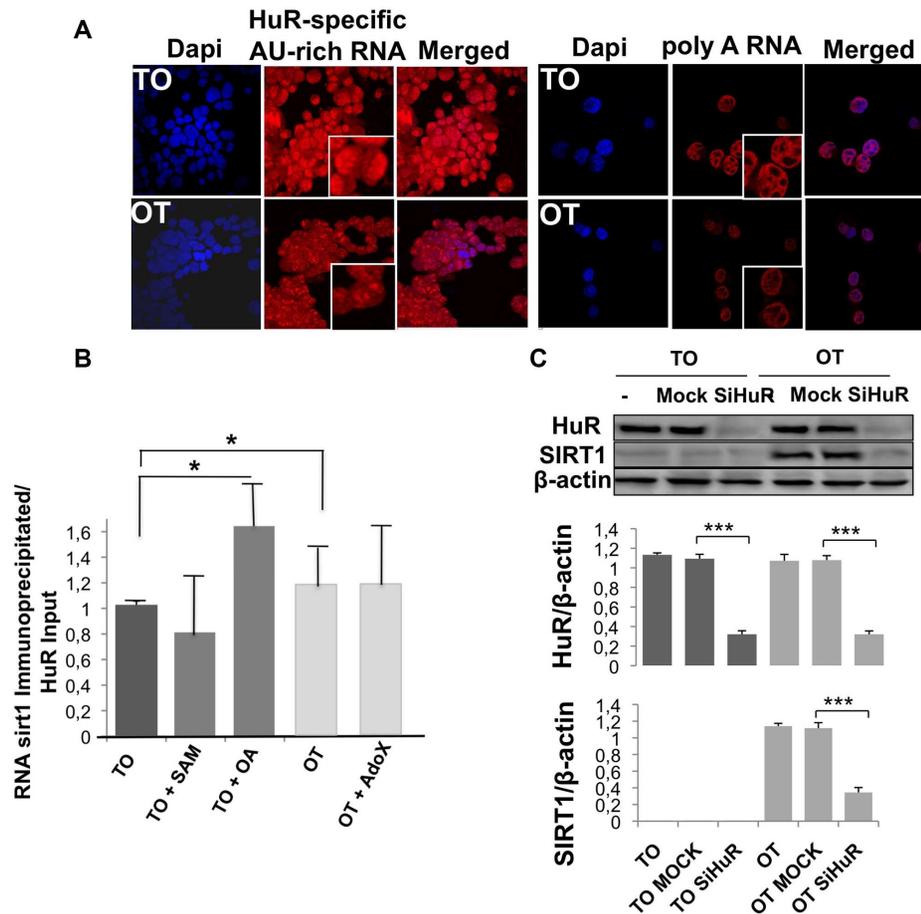


Figure 3. Influence of ELAVL1/HuR nuclear cytoplasmic shuttling on SIRT1 expression and AU-specific mRNA transport. (A) FISH staining of the ELAVL1/HuR specific AU-rich RNAs and poly-A tail RNAs in the *Cbl* deficient TO versus OT cells. (B) *Sirt1* mRNA isolated from the RIP complex using anti-ELAVL1/HuR antibody and amplified using qPCR technique in TO versus OT cells. The ELAVL1/HuR/*Sirt1* mRNA binding was tested with and without treatment with SAM, AdoX and Okadaic Acid (OA) as described in supplementary informations. (C) SIRT1 expression in ELAVL1/HuR knockdown by siELAVL1/HuR in TO versus OT cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ANOVA).

creased of its binding to *Sirt1* mRNA in TO versus OT cells (Figures 1C and 3B). To confirm the role of ELAVL1/HuR on *Sirt1* expression, *Elavl1* was knocked down using siRNA technique. The *siElavl1* reduced both ELAVL1/HuR and SIRT1 protein expressions in TO and OT cells (Figure 3C). Providing quantifications assessing the effect of knocking ELAVL1/HuR on *Sirt1* protein levels was not possible due to its very low levels in untreated TO cells (Figure 3C).

ELAVL1/HuR mRNA export was blocked by *Cbl* impaired metabolism through altered interactions of ELAVL1/HuR with its partners of the nuclear pore complex (NPC)

To dissect the molecular mechanisms of the ELAVL1/HuR-dependent mRNA export block, we tested whether *Cbl* deficiency altered the interactions of ELAVL1/HuR with its partners of NPC. In NPC, ELAVL1/HuR recruits CRM1/exportin via the adaptor proteins IPP2A and APRIL to shuttle the AU-rich element (ARE)-containing mRNAs (24). In *Cd320* KO versus WT mice, we found that less CRM1, I1PP2A, I2PPA and APRIL, and more PP2A proteins co-immunoprecipitated with ELAVL1/HuR (Figure 4A and Supplementary Figure

S4). The same difference was obtained in the co-IP of TO versus OT cells (Figure 4B). Two ELAVL1/HuR partners, I1PP2A and I2PP2A, were practically missing, and CRM1 and APRIL were significantly decreased in TO cells (Figure 4B and Supplementary Figures S4, S5). This was due in part to their decreased expression in TO cells (Figure 4C and Supplementary Figure S4). The reduced interaction of ELAVL1/HuR with CRM1 was counterbalanced by its interaction with PP2A (Figure 4B and Supplementary Figures S4 and S5). Treating TO cells with *Cbl* or SAM restored the expression of ELAVL1/HuR partners (Figure 4C). Decreasing PP2A expression via *siPpp2ca* restored the interaction of ELAVL1/HuR with CRM1/exportin, while decreasing CARM1 expression via *siCarm1* produced the opposite effect (Figure 4B and Supplementary Figure S5). The increased expression of wild type PP2A by transfection in OT cells decreased the binding of APRIL to ELAVL1/HuR, showing that the interaction was affected by PP2A-mediated ELAVL1/HuR dephosphorylation (Figure 4D and Supplementary Figure S5).

Using Duolink (proximity ligation assay, PLA) we further studied the interaction between ELAVL1/HuR and CRM1, and the nucleocytoplasmic localization of

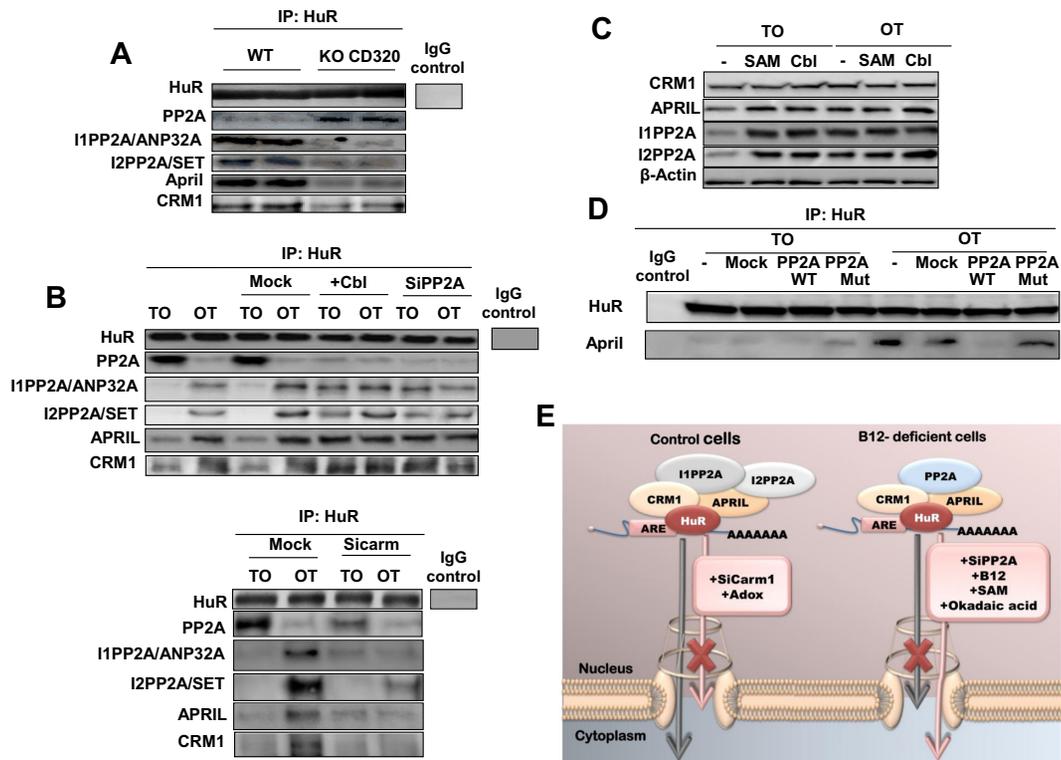


Figure 4. Influence of Cobalamin on the interaction of ELAVL1/HuR-containing mRNP complex with nuclear pore receptor CRM1. (A) Interaction of PP2A, I1PP2A/pp32/ANP32A, I2PP2A/SET, APRIL and CRM1 with ELAVL1/HuR in Cd320 KO versus WT mice. (B) Same interactions in TO versus OT cells. Knock-down of CARM1 disrupted these interactions while addition of Cbl, as well as knock-down of PP2A restored them. The interactions between ELAVL1/HuR and its partners CRM1, I1PP2A/pp32/ANP32A, I2PP2A/SET and APRIL were evaluated by the quantity of these proteins present in the ELAVL1/HuR Co-IP complex. (C) The levels of CRM1, APRIL, I1PP2A, I2PP2A in total cellular protein extracts in control and supplemented conditions with either SAM or Cbl. (D) Influence of PP2A mutant on the interaction between ELAVL1/HuR and April. (E) The proposed schematic of ELAVL1/HuR export and the effect of Cbl deficiency on ELAVL1/HuR shuttling. In control cells, the ELAVL1/HuR export complex includes I1PP2A/ANP32A, I2PP2A/SET, APRIL and CRM1. This export is blocked by treatment with AdoX or SiCarm1 transfection. In Cbl-deficient cells, the strong interaction between PP2A and ELAVL1/HuR appears to disrupt ELAVL1/HuR's interaction with its regular partners - I1PP2A/ANP32A, I2PP2A/SET, APRIL and CRM1 leading to an export block. This block is reversible with B12, SAM, okadaic acid supplementation or SiPP2A transfection.

ELAVL1/HuR in fibroblasts of normal subject and patients with *CblC* (mutation of *MMACHC*), *CblG* (mutation of *MTR*), and *CblG*-variant inherited disorders. We observed a substantial decrease in ELAVL1/HuR-CRM1 interaction in the nucleus of patients *vs.* normal cells (Figure 5). Taken together these data indicated that cellular Cbl deficit in both cell and animal model disrupted the interaction of ELAVL1/HuR with CRM and its partners of NPC through PP2A- and CARM1-dependent mechanisms.

The disruption of ELAVL1/HuR shuttling by Cbl cellular deficiency was both SAM- and methylation-dependent

As Cbl serves for the *de novo* synthesis of methionine and, hence, for SAM, we asked if disrupted ELAVL1/HuR shuttling was the consequence of decreased SAM level in TO cells and patients' fibroblasts. We observed in TO cells but not OT cells a large reduction in the percentage of cells with nuclear ELAVL1/HuR staining when adding either Cbl or SAM (Figure 6A and B). Conversely, incubation of OT cells with SAM inhibitor AdoX led to ELAVL1/HuR nuclear retention (Figure 1A). The same treatment of TO cells produced no extra effect. The Duolink proximity

ligation assay of methyl-ELAVL1/HuR with antibodies against methyl-arginine and ELAVL1/HuR revealed that its localization was cytoplasmic (Figure 6C). CARM1 is known to catalyze the methylation of ELAVL1/HuR R217 (25). We used a custom-made affinity-purified antibody against methyl^{R217}ELAVL1/HuR and a methylated peptide described previously (25) to answer whether cellular Cbl deficiency produced a R217 demethylated ELAVL1/HuR. Indeed, Western blots revealed lower methyl^{R217}ELAVL1/HuR level in TO versus OT cells (Figure 7A). The addition of either Cbl or SAM to TO cells rescued the expression of methyl^{R217}ELAVL1/HuR (Figure 7A and Supplementary Figure S6). Results of the immunofluorescence stainings with anti-methyl^{R217}ELAVL1/HuR in the presence of blocking peptide, either methylated or non-methylated, indicated that methyl^{R217}ELAVL1/HuR resided only in the cytoplasmic compartment of both TO and OT cells (Figure 7B). Data from knocking down CARM1 with *siCarm1* confirmed its involvement in ELAVL1/HuR cytoplasmic export (Figure 7C, Supplementary Figure S6). Together, the evidence showed that the decreased CARM1-dependent methyla-

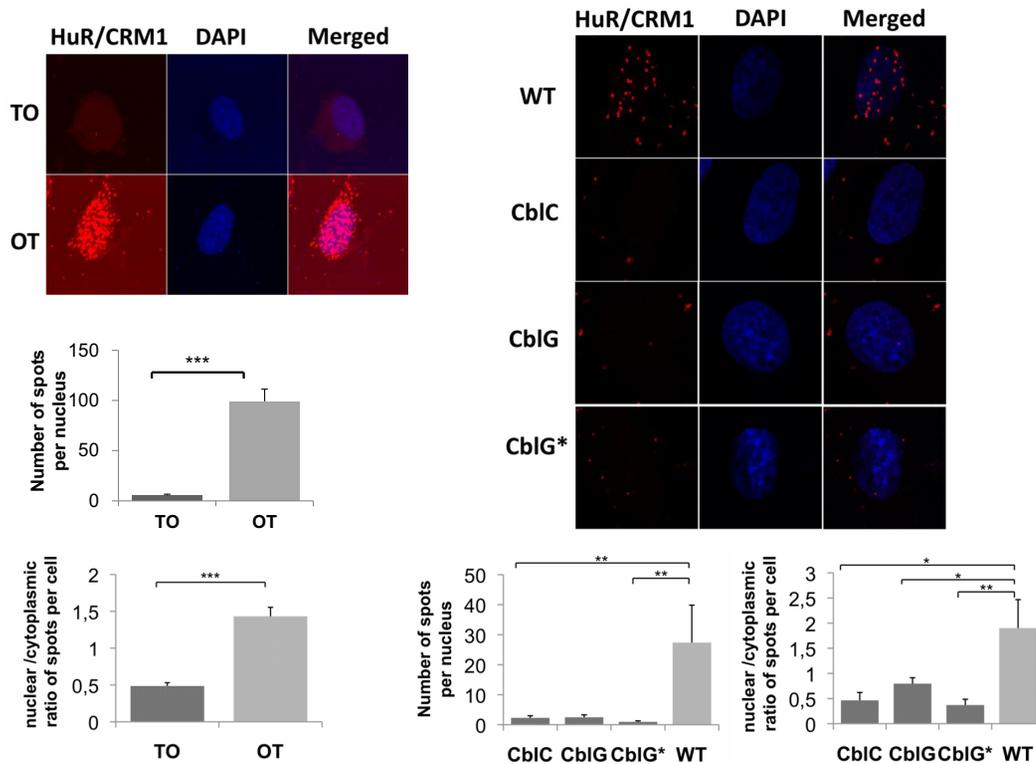


Figure 5. Duolink analyses of the interaction between ELAVL1/HuR and CRM1 in TO versus OT N1E115 cells and fibroblasts from patients with cobalamin inherited disorders. (A) Decreased ELAVL1/HuR-CRM1 interaction in the nucleus of TO and patient cells, compared to OT and control fibroblasts. (B) Decreased ELAVL1/HuR-CRM1 interaction in the nucleus of fibroblasts from patients with CblC, CblG and CblG-variant inherited disorders, compared with fibroblasts from control subjects (WT) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ANOVA).

tion of ELAVL1/HuR produced by Cbl cellular deficiency blocks the export of ELAVL1/HuR into cytoplasm.

The dephosphorylation of serine 221 by PP2A and the methylation of arginine 217 by CARM1 in ELAVL1/HuR were two distinct mechanisms that predict the subcellular localization of ELAVL1/HuR

The presence of non-methylated ELAVL1/HuR in both cytoplasm and nucleus (see Figure 7B, TO versus OT in the presence of blocking methylated peptide) suggested that a second mechanism could influence the export of non-methylated ELAVL1/HuR. Recent data from the literature suggest that ELAVL1/HuR interacts with PP2A phosphatase (26) and that Cbl deficiency or DNA hypomethylation can lead to over-expression of PP2A (8,27). Consistently, we observed that the level of methylated and demethylated PP2A protein varied in a Cbl- and SAM-dependent manner in TO cells (Figure 8A). The Duolink assay shown in Figure 8B revealed that the impaired Cbl availability in TO cells reduced ELAVL1/HuR serine phosphorylation. This result was consistent with the Western blot of ELAVL1/HuR immunoprecipitated with an anti-phosphoserine antibody (Figure 1C). Both PP2A and ELAVL1/HuR were co-localized to the nucleus of TO cells and both were predominantly detected in the cytoplasm of OT cells (Figure 8C). The application of either PP2A inhibitor okadaic acid or knockdown of PP2A by *siPpp2ca*

independently changed the localization of both PP2A and ELAVL1/HuR from nucleus to cytoplasm in TO cells. This did not occur in OT cells (Figure 8C). The demethyl-PP2A was found in both nucleus and cytoplasm in TO cells while methyl-PP2A was mainly cytoplasmic (Supplementary Figure S6). Numerous serine phosphorylation sites have been previously identified in ELAVL1/HuR (28). We focused our attention here on S221 phosphorylation for two reasons: (a) S221 is located in the nucleocytoplasmic shuttling (HNS) domain of ELAVL1/HuR, and (b) PKC α and PKC δ have altered expression in TO versus OT cells (Figure 1D) and are both implicated in S221 phosphorylation. The decreased phosphorylation of ELAVL1/HuR in TO cells (Figure 1C) was consistent with the decreased expression of serine kinases, PKC α and PKC δ and the increased expression of PP2A (Figure 1D and Supplementary Figure S4). To decipher the respective and combined role of R217 methylation and S221 phosphorylation on ELAVL1/HuR shuttling, we created S221A, S221D, R217A single mutations and R217A-S221A and R217A-S221D double mutations in a human ELAVL1/HuR construct (29) and we overexpressed them in control OT cells. Transfection with R217A and S221A single mutants and R217A-S221A double mutants all led to fewer cells with cytoplasmic-only ELAVL1/HuR staining than those observed in mock transfected OT cells (Supplementary Figure S7). These results suggested that R217 methylation and S221 phosphorylation independently regulate the subcellular localization of

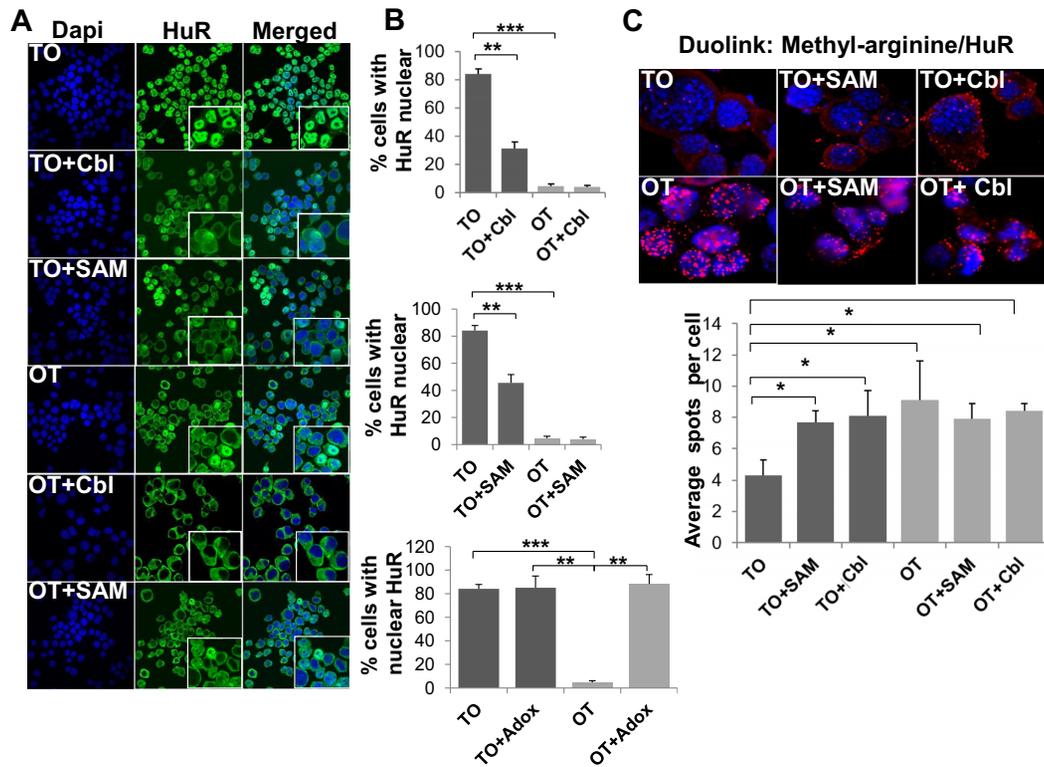


Figure 6. Influence of cobalamin and S-adenosyl methionine on the nucleocytoplasmic shuttling and methylation of ELAVL1/HuR. (A) The addition of cobalamin (Cbl) at 20 μ M or S-adenosyl methionine (SAM) at 75 μ M to the Cbl-lacking TO cells partially restored the shuttling block of ELAVL1/HuR in TO cells. (B) Influence of Cbl, SAM and AdoX at 20 μ M for 36 h on ELAVL1/HuR shuttling in control OT cells. (C) ELAVL1/HuR arginine methylation studied by Duolink proximity ligation assay in TO cells after the addition of SAM or Cbl. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA).

ELAVL1/HuR. This conclusion was corroborated by the immunofluorescence staining of the R217A–S221D double mutant with only cytoplasmic staining in most of the transfected OT cells. However, it is worth noting that S221 phosphorylation alone is probably not sufficient for triggering ELAVL1/HuR export in regard to the results obtained by S221D overexpression in TO versus OT cells (Supplementary Figure S7).

The arginine-methylation and serine-phosphorylation of ELAVL1/HuR were also impaired in fibroblasts of patients with *CblC* and *CblG* inborn errors of Cbl metabolism

Duolink proximity ligation assay of the fibroblasts from patients with *CblC* and *CblG* inherited disorders showed also decreased protein arginine-methylation and protein serine-phosphorylation of ELAVL1/HuR (Figure 9A). These results were confirmed by Western blots on immunoprecipitated ELAVL1/HuR protein using antibodies against methyl-arginine and phosphoserine in *CblC* and *CblG* fibroblasts. The treatment of *CblC* and *CblG* fibroblasts with PP2A inhibitor okadaic acid restored the serine phosphorylation of ELAVL1/HuR, and the treatment with Adox blocked the methylation of ELAVL1/HuR (Figure 9B). In contrast to ELAVL1/HuR, Y14 is not mislocalized and is neither phosphorylation nor methylation in patient fibroblasts (Supplementary Figure S8). Taken together, these data showed that similar mechanisms as those observed in both

cell and animal models regulate ELAVL1/HuR shuttling in fibroblasts of patients with *CblC* and *CblG* inherited disorders of Cbl metabolism.

DISCUSSION

The mechanisms at the origin of the highly variable clinical presentation of inherited Cbl disorders are far from being understood (1,2). Part of the explanation may lie in the complexity of dysregulated methylation dependent signaling pathways downstream of Cbl deficiency. In fibroblasts of patients with Cbl inborn errors, the production of reactive oxygen species (ROS) has been found increased and the defense against oxidant stress decreased (28,29). In Cbl deficient cell and animal models, ER stress has also been evidenced downstream of reduced SAM synthesis and SIRT1 activity (5). Here, impaired Cbl metabolism is shown to alter RNA binding proteins shuttling between nucleus and cytoplasm in N1E115 neuronal cells, patient fibroblasts and neurons of the Cd320 KO mouse. It is thus plausible that altered nucleocytoplasmic shuttling of mRNAs represents one key element underlying the generation of oxidative and ER stress which gives rise to the neurological disorders of the Cbl-deficient patients.

Our investigation revealed that Cbl may impact a large scale of RBPs as a number of RBPs such as ELAVL1/HuR, hnRNPA1, Y14 and SRSF1 are found mislocalized in Cbl-deficient neuronal cells, all linking to altered

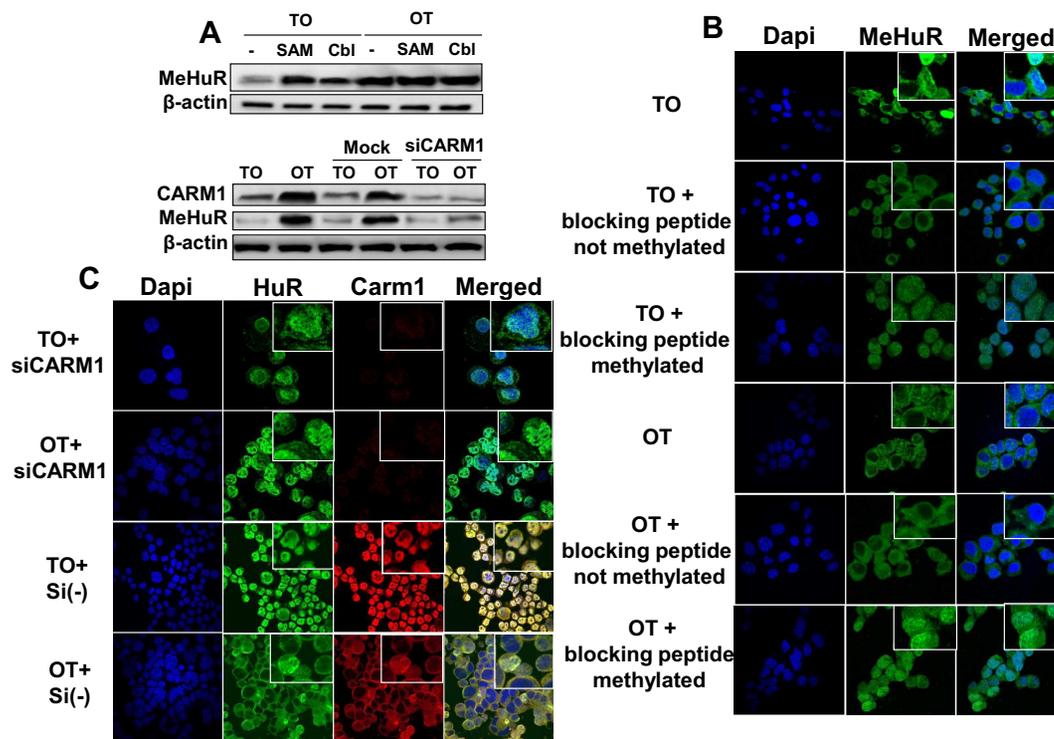


Figure 7. CARM1-dependent methylation of ELAVL1/HuR on Arginine 217. (A) Western blot with anti-methylR217 ELAVL1/HuR antibody in TO versus OT cells treated or not with cobalamin (Cbl), S-adenosyl methionine (SAM) and siCarm1. (B) Immunofluorescence staining using anti-methylR217 ELAVL1/HuR antibody, in the presence of either methylated ELAVL1/HuR peptide or non-methylated ELAVL1/HuR peptide. (C) CARM1 and methylation of ELAVL1/HuR in TO versus OT cells. The CARM1 knockdown by siCarm1 reduced the R217 methylation and blocked the ELAVL1/HuR export.

protein arginine-methylation and serine-phosphorylation. ELAVL1/HuR, a key regulator of neuronal stress, is the most affected RBP, and its mislocalization hinted disrupted export of AU-rich element (ARE)-containing mRNA targets from nucleus to cytoplasm. We indeed observed dramatic transcriptomic changes related to stress response. More importantly, the gene functions related to neurogenesis, synapse transmission, brain development, and neuroplasticity are equally touched. Remarkably, these alterations are consistent with the neurological manifestations associated with both Cbl deficiency and Cbl inherited diseases (1,2). Cobalamin deficiency additionally caused cytoplasmic accumulation of hnRNPA1, a RBP known to be responsive to osmotic shock stress and capable of shuttling between nucleus and cytoplasm. Our evidence suggests this to be linked to dysregulated serine phosphorylation at the C-terminal domain of the protein which blocked its nuclear importation (30). Equally important is the mislocalization of Y14 and SRSF1. As these proteins participate in constitutive and alternative splicing needed to maintain cellular homeostasis, survival, and DNA repair, their mislocalization weakens cellular stress response to DNA damage, oxidative stress, and perturbed one-carbon metabolism. Given the number of RBPs examined that are mislocalized in the N1E115 cells, this dysregulation of RNA metabolism may represent a prominent mechanism associated with the neurological manifestations of inherited disorders of cobalamin metabolism metabolic diseases.

It is worth noting that to deprive the intracellular Cbl, the neuronal cell model N1E115 has to be grown in the presence of G418 to maintain the stable expression of transgene TC-Oleosin (TO) or Oleosin-TC (OT). It is with the presence of G418, ELAVL1/HuR is confined to the nucleus in Cbl-deficient TO cells, in contrast to the cytoplasmic localization observed in OT cells. This indicates that while under stress in non-deficient cells, ELAVL1/HuR can be exported to the cytoplasm, in Cbl deficient cells the exportation is blocked. Interestingly, cellular stress - manifested downstream often in the form of oxidative and ER stress - is an integral part of disease mechanisms, affecting maladies like inborn errors of Cbl metabolism. Cellular stress is expected to trigger ELAVL1/HuR export from nucleus to cytoplasm. Considering that ELAVL1/HuR export is also altered in patient fibroblasts and in hippocampal neurons of the Cd320 KO mice (the experimental systems without the presence of G418), we conclude that cellular response to stress mediated by ELAVL1/HuR-containing hnRNP complex shuttling is impaired in both human and mouse under aberrant Cbl metabolism. Together with the previous evidence that in TO and OT model cell system, cellular Cbl deficit produced non-adapted unfolded protein response due to decreased SIRT1 activity (5,13,31), our data here provide a mechanistic link between anti-stress responses mediated by ELAVL1/HuR and SIRT1 activity. A major consequence of ELAVL1/HuR nuclear retention is the confinement of ELAVL1/HuR target mRNAs like Sirt1

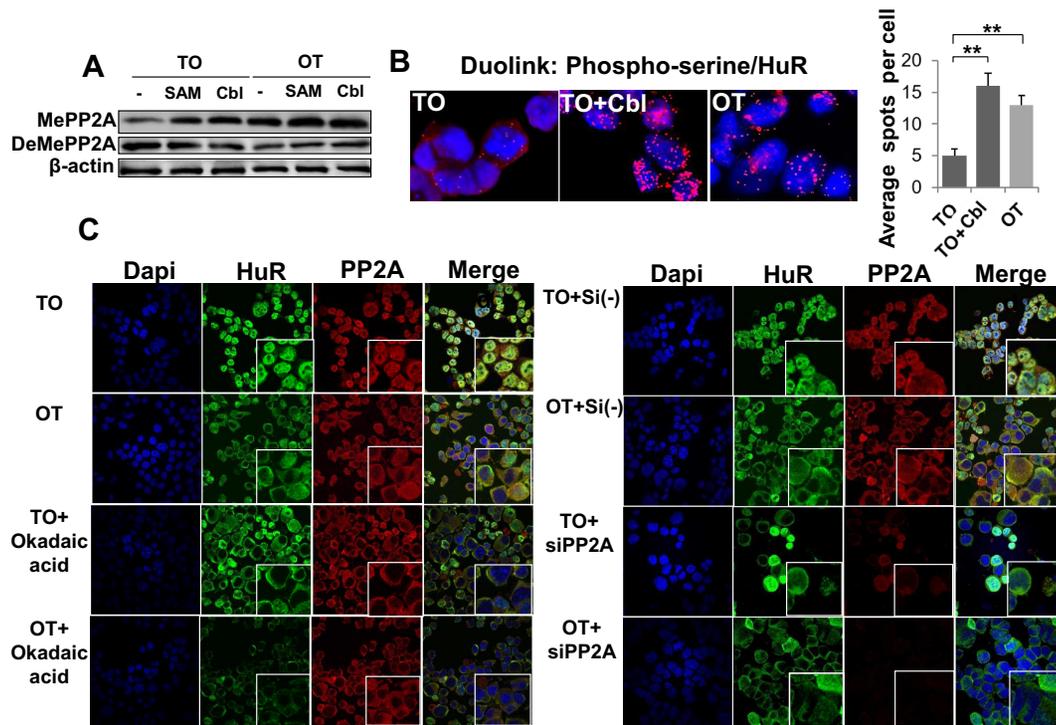


Figure 8. PP2A-dependent dysregulation of nucleocytoplasmic transport of ELAVL1/HuR. (A) Western blot with anti-methyl PP2A and anti-demethyl PP2A in TO versus OT cells with and without treatment with cobalamin (Cbl) and S-adenosyl methionine (SAM). (B) ELAVL1/HuR serine phosphorylation in TO versus OT cells evaluated by Duolink proximity ligation assay with anti-ELAVL1/HuR and anti-phospho-serine antibodies. (C) PP2A subcellular co-localization with ELAVL1/HuR in TO versus OT cells. The PP2A inhibitor okadaic acid (20 nM for 6 h) and siPP2ca knockdown influence ELAVL1/HuR export in TO cells; $**P < 0.01$ (ANOVA).

in the nucleus, hence reduced translation of ELAVL1/HuR-relevant stress response proteins. A decreased expression and activity of SIRT1 is a key component of the non-adapted response to the ER stress of the TO cells and the rats subjected to Cbl and folate deficient diet (5,12,13,31), as reduced SIRT1 protein expression leads to HSF1 hyperacetylation, the latter in turn reduces the expression of heat shock proteins (HSPs) (32). Besides HSPs, other gene function may also be affected as decreased SIRT1 activity can contribute to dysregulated nuclear receptor co-regulation via deacetylated PGC1 α , as observed in the brain, heart and gut of rats deficient in Cbl and folate (10–14,31).

We traced the cause of the disrupted ELAVL1/HuR exportation to altered post translational methylation and phosphorylation of ELAVL1/HuR that affect the affinity of ELAVL1/HuR to its nuclear receptor CRM1/exportin. CRM1/exportin is a general export receptor that mediates ARE-containing mRNAs export in the cytoplasm (33). Under Cbl deficiency, the binding of ELAVL1/HuR to CRM1/exportin and to other partners of the NPC machinery like I1PP2A and APRIL (33,34) were found all reduced. Furthermore, we found that in N1E115 TO/OT cell model, while R217 methylation helps to localized ELAVL1/HuR to the cytoplasm, serine dephosphorylation of demethylated ELAVL1/HuR causes its nuclear retention. These changes in post translation modifications of ELAVL1/HuR correlate with decreased levels of SAM, CARM1 and PKCs, and increased level of PP2A, all resulting from of perturbed Cbl metabolisms. The altered phosphorylation of

ELAVL1/HuR was influenced by PP2A and the subsequent disruption of the interaction between ELAVL1/HuR and CRM1/exportin could be reversed by Cbl and siPP2ca cell transfection. These data are consistent with the up-regulation of PP2A previously observed in TO versus OT cells (8). The methylation of ELAVL1/HuR on the R217 residue has been shown to increase its association to *Sirt1* mRNA (35,36). The effect of impaired cobalamin metabolism on the methylation of ELAVL1/HuR and the decreased expression of *Sirt1* in TO cells could be accounted for by the decreased binding of ELAVL1/HuR to the *Sirt1* mRNA, and not only due to its localization. However, this mechanism may have a limited influence in TO and OT cells, since SAM and AdoX had no significant effect on the binding of ELAVL1/HuR to *Sirt1* mRNA.

The non-adapted response to ER stress produced by ELAVL1/HuR nuclear retention and the related impaired export of mRNAs may be part of the puzzle explaining the wide spectrum of clinical neurological manifestations of nutritional and inherited causes of Cbl deficiency. The transcriptomic changes in the cell model reported here are consistent with most of the clinical neurological manifestations of Cbl deficiency, with some of them related to brain development, affecting genes controlling cell cycle, apoptosis and differentiation and some to late stage neurological manifestations including genes involved in ER stress, neuroplasticity and myelin synthesis (8,13,14). The association of Cbl with abnormal brain ageing and neurodegeneration is consistent with the results of transcriptome indicat-

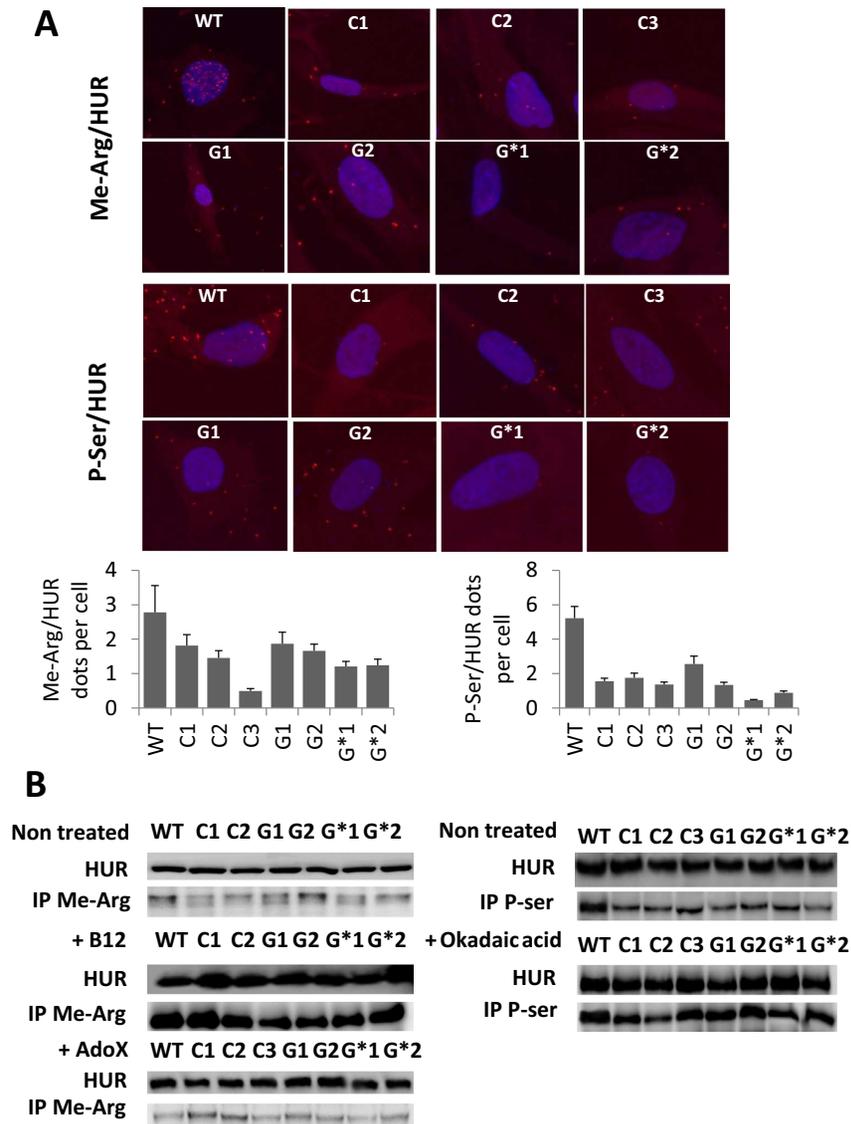


Figure 9. Influence of ELAVL1/HuR methylation and phosphorylation on its subcellular localization in fibroblasts from patients with CblC and CblG inherited defects. (A) Duolink Proximity Ligation Assay showing the subcellular mislocalization of methyl-ELAVL1/HuR in cells from three CblC patients (C1, C2, C3) and four CblG patients (G1, G2, G*1, G*2) stained with anti-methyl arginine and with anti-ELAVL1/HuR antibodies. Histograms show the mean number of red dots corresponding to the number of interactions between Me-Arg and ELAVL1/HuR per cell in each cell line. (B) Western blot of ELAVL1/HuR following immunoprecipitation against methyl-arginine (Me-Arg) or phospho-serine (P-Ser) in CblC and CblG fibroblasts. Cells were either treated by cobalamin (Cbl), okadaic acid or AdoX.

ing changes in gene functions like APP/presenilin pathways of Alzheimer disease (37).

The importance of ELAVL1/HuR mislocalisation in the transcriptomic changes observed in diseases with impaired Cbl metabolism may be underscored by the observation that a large proportion of its gene targets (82%) are distributed in the K-means clusters identified from the transcriptomic data. Its prominent role in the disrupted export of AU-rich element (ARE)-containing mRNA targets is also illustrated by the absence of mislocalisation of two other brain specific ELAVL1 member proteins, HUC and HUD (Supplementary Figure S9). Given the fact that it acts as a controller for neuronal stress to confer protection from neurodegeneration, and is also involved in brain develop-

ment and aging through controlling cell cycle, inflammation, genotoxic stress and cell death (38–42), mislocalized ELAVL1 targets can potentially contribute considerably to the neurological phenotypes of the Cbl metabolic errors. The recent large number of reports linking dysregulated RNA metabolism to both inherited and complex neurological disorders indeed support this notion (17,18,38). Interestingly, ELAVL1/HuR is the only ubiquitous ELAVL protein whose expression is not limited to the neuronal tissues (43). This highlights its potential involvement via dysregulation of RNA processing in both hematological and visceral manifestations of Cbl deficiency.

In conclusion, we show here that Cbl deficiency can disrupt RBP-dependent nucleocytoplasmic shuttling of mR-

NAs, most prominently via ELAVL1/HuR. This new insights shall help in the near future the reexamination of the pathological consequences on developmental and ageing processes caused by Cbl deficiency and Cbl inborn error and in the search for innovative therapies for inherited disorders of Cbl metabolism.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

FUNDING

Institutional grants were received from: the i-SITE Lorraine University of Excellence (LUE); the French National Agency for Research (ANR); Region of Lorraine (France); 'Etude des mécanismes moléculaires à l'origine des pathologies associées à un dysfonctionnement du métabolisme des monocarbones' that is co-funded by the European Union within the framework 'FEDER-ESF Lorraine et Massif des Vosges 2014–2020'. Funding for open access charge: Inserm and University of Lorraine.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Watkins,D. and Rosenblatt,D. (2013) Lessons in biology from patients with inborn errors of vitamin B12 metabolism. *Biochimie*, **95**, 1019–1022.
- Gueant,J., Caillerez-Fofou,M., Battaglia-Hsu,S., Alberto,J., Freund,J., Dulluc,I., Adjalla,C., Maury,F., Merle,C., Nicolas,J. *et al.* (2013) Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie*, **95**, 1033–1040.
- Fernandez-Roig,S., Lai,S., Murphy,M., Fernandez-Ballart,J. and Quadros,E. (2012) Vitamin B12 deficiency in the brain leads to DNA hypomethylation in the TCbIR/CD320 knockout mouse. *Nutr. Metab. (Lond.)*, **9**, 41.
- Quadros,E. and Sequeira,J. (2013) Cellular uptake of cobalamin: transcobalamin and the TCbIR/CD320 receptor. *Biochimie*, **95**, 1008–1018.
- Ghemrawi,R., Pooya,S., Lorentz,S., Gauchotte,G., Arnold,C., Gueant,J. and Battaglia-Hsu,S. (2013) Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.*, **4**, e553.
- Lai,S., Nakayama,Y., Sequeira,J., Wlodarczyk,B., Cabrera,R., Finnell,R., Bottiglieri,T. and Quadros,E. (2013) The transcobalamin receptor knockout mouse: a model for vitamin B12 deficiency in the central nervous system. *FASEB J.*, **27**, 2468–2475.
- Pons,L., Battaglia-Hsu,S., Orozco-Barrios,C., Ortiou,S., Chery,C., Alberto,J., Arango-Rodriguez,M., Dumas,D., Martinez-Fong,D., Freund,J. *et al.* (2009) Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One*, **4**, e6325.
- Battaglia-Hsu,S., Akkiche,N., Noel,N., Alberto,J., Jeannesson,E., Orozco-Barrios,C., Martinez-Fong,D., Daval,J. and Gueant,J. (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.
- Padmanabhan,N., Jia,D., Geary-Joo,C., Wu,X., Ferguson-Smith,A., Fung,E., Bieda,M., Snyder,F., Gravel,R., Cross,J. *et al.* (2013) Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell*, **155**, 81–93.
- Garcia,M., Gueant-Rodriguez,R., Pooya,S., Brachet,P., Alberto,J., Jeannesson,E., Maskali,F., Gueguen,N., Marie,P., Lacolley,P. *et al.* (2011) Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1alpha by PRMT1 and SIRT1. *J. Pathol.*, **225**, 324–335.
- Pooya,S., Blaise,S., Moreno Garcia,M., Giudicelli,J., Alberto,J., Gueant-Rodriguez,R., Jeannesson,E., Gueguen,N., Bressenot,A., Nicolas,B. *et al.* (2012) Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver. *J. Hepatol.*, **57**, 344–351.
- Gueant,J., Elakoum,R., Ziegler,O., Coelho,D., Feigerlova,E., Daval,J. and Gueant-Rodriguez,R. (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.
- Gueant,J., Namour,F., Gueant-Rodriguez,R. and Daval,J. (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.*, **24**, 279–289.
- Pourie,G., Martin,N., Bossenmeyer-Pourie,C., Akkiche,N., Gueant-Rodriguez,R., Geoffroy,A., Jeannesson,E., El Hajj Chehaddeh,S., Mimoun,K., Brachet,P. *et al.* (2015) Folate- and vitamin B12-deficient diet during gestation and lactation alters cerebellar synapsin expression via impaired influence of estrogen nuclear receptor alpha. *FASEB J.*, **29**, 3713–3725.
- Hannibal,L., DiBello,P. and Jacobsen,D. (2013) Proteomics of vitamin B12 processing. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **51**, 477–488.
- Bakkar,N., Kousari,A., Kovalik,T., Li,Y. and Bowser,R. (2015) RBM45 modulates the antioxidant response in amyotrophic lateral sclerosis through interactions with KEAP1. *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 2385–2399.
- Nussbacher,J., Batra,R., Lagier-Tourenne,C. and Yeo,G. (2015) RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.*, **38**, 226–236.
- Sephton,C. and Yu,G. (2015) The function of RNA-binding proteins at the synapse: implications for neurodegeneration. *Cell Mol. Life Sci.*, **72**, 3621–3635.
- Pang,L., Tian,H., Chang,N., Yi,J., Xue,L., Jiang,B., Gorospe,M., Zhang,X. and Wang,W. (2013) Loss of CARM1 is linked to reduced ELAVL1/HuR function in replicative senescence. *BMC Mol. Biol.*, **14**, 15.
- Grammatikakis,I., Abdelmohsen,K. and Gorospe,M. (2017) Posttranslational control of ELAVL1/HuR function. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **8**, e1372.
- Fofou-Caillierez,M., Mrabet,N., Chery,C., Dreumont,N., Flayac,J., Pupavac,M., Paoli,J., Alberto,J., Coelho,D., Camadro,J. *et al.* (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.
- Chen,G., Broseus,J., Hergalant,S., Donnart,A., Chevalier,C., Bolanos-Jimenez,F., Gueant,J. and Houlgatte,R. (2015) Identification of master genes involved in liver key functions through transcriptomics and epigenomics of methyl donor deficiency in rat: relevance to nonalcoholic liver disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**, 293–302.
- Dassi,E., Zuccotti,P., Leo,S., Provenzani,A., Assfalg,M., D'Onofrio,M., Riva,P. and Quattrone,A. (2013) Hyper conserved elements in vertebrate mRNA 3'-UTRs reveal a translational network of RNA-binding proteins controlled by ELAVL1/HuR. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3201–3216.
- Natalizio,B. and Wente,S. (2013) Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends Cell Biol.*, **23**, 365–373.
- Li,H., Park,S., Kilburn,B., Jelinek,M., Henschen-Edman,A., Aswad,D., Stallcup,M. and Laird-Offringa,I. (2002) Lipopolysaccharide-induced methylation of ELAVL1/HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44623–44630.
- Hyvonen,M., Koponen,T., Weisell,J., Pietila,M., Khomutov,A., Vepsäläinen,J., Alhonen,L. and Keinänen,T. (2013) Spermidine promotes adipogenesis of 3T3-L1 cells by preventing interaction of ANP32 with ELAVL1/HuR and PP2A. *Biochem. J.*, **453**, 467–474.
- Sunahori,K., Juang,Y., Kytтары,V. and Tsokos,G. (2011) Promoter hypomethylation results in increased expression of protein phosphatase 2A in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, **186**, 4508–4517.
- Eberhardt,W., Doller,A. and Pfeilschifter,J. (2012) Regulation of the mRNA-binding protein ELAVL1/HuR by posttranslational

- modification: spotlight on phosphorylation. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **13**, 380–390.
29. Fan, X. and Steitz, J. (1998) HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in ELAVL1/HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 15293–15298.
 30. Allemand, E., Guil, S., Myers, M., Moscat, J., Caceres, J. and Krainer, A. (2005) Regulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 3605–3610.
 31. Melhem, H., Hansmann, F., Bressenot, A., Battaglia-Hsu, S.F., Billioud, V., Alberto, J.M., Gueant, J.L. and Peyrin-Biroulet, L. (2016) Methyl-deficient diet promotes colitis and SIRT1-mediated endoplasmic reticulum stress. *Gut*, **65**, 595–606.
 32. Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, S.M. Jr, Sistonen, L. and Morimoto, R.I. (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*, **323**, 1063–1066.
 33. Brennan, C.M., Gallouzi, I.E. and Steitz, J.A. (2000) Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J. Cell Biol.*, **151**, 1–14.
 34. Santa-Coloma, T.A. (2003) Anp32e (Cpd1) and related protein phosphatase 2 inhibitors. *Cerebellum*, **2**, 310–320.
 35. Pang, L., Tian, H., Chang, N., Yi, J., Xue, L., Jiang, B., Gorospe, M., Zhang, X. and Wang, W. (2013) Loss of CARM1 is linked to reduced HuR function in replicative senescence. *BMC Mol. Biol.*, **14**, 15.
 36. Calvanese, V., Lara, E., Suárez-Alvarez, B., Abu Dawud, R., Vázquez-Chantada, M., Martínez-Chantar, M.L., Embade, N., López-Nieva, P., Horrillo, A., Hmadcha, A. *et al.* (2010) Sirtuin 1 regulation of developmental genes during differentiation of stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 13736–13741.
 37. Fuso, A. and Scarpa, S. (2011) One-carbon metabolism and Alzheimer's disease: is it all a methylation matter? *Neurobiol. Aging*, **32**, 1192–1195.
 38. Peretti, D., Bastide, A., Radford, H., Verity, N., Molloy, C., Martin, M.G., Moreno, J.A., Steinert, J.R., Smith, T., Dinsdale, D. *et al.* (2015) RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature*, **518**, 236–239.
 39. Skliris, A., Papadaki, O., Kafasla, P., Karakasiotis, I., Hazapis, O., Reczko, M., Grammenoudi, S., Bauer, J. and Kontoyiannis, D.L. (2015) Neuroprotection requires the functions of the RNA-binding protein HuR. *Cell Death Differ.*, **22**, 703–718.
 40. Gorospe, M. and de Cabo, R. (2008) AsSIRting the DNA damage response. *Trends Cell Biol.*, **18**, 77–83.
 41. Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H.H. and Gorospe, M. (2007) Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle*, **6**, 1288–1292.
 42. Kraushar, M.L., Thompson, K., Wijeratne, H.R., Viljetic, B., Sakers, K., Marson, J.W., Kontoyiannis, D.L., Buyske, S., Hart, R.P. and Rasin, M.R. (2014) Temporally defined neocortical translation and polysome assembly are determined by the RNA-binding protein Hu antigen R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E3815–E3824.
 43. Antic, D. and Keene, J.D. (1997) Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 273–278.

Annexe 2 : Nutrigenomics and RNA methylation: role of micronutrients



Mini-review

Nutrigenomics and RNA methylation: Role of micronutrients

Pauline Mosca, Bruno Leheup, Natacha Dreumont*

Université de Lorraine, INSERM, NGERE, F-54000, Nancy, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2019

Accepted 6 July 2019

Available online 11 July 2019

Keywords:

Epigenetics
 RNA modifications
 Methylation
 Micronutrient
 Nutrigenomics

ABSTRACT

RNA modifications regulate gene expression by impacting different steps in RNA processing. They are as diverse as they are important for the cell. Most of them have been identified around 1970 and the recent development of high-throughput techniques has shed some insights on their prevalence and function. They are present in all RNA types, but their regulation is still not fully understood. The most described RNA modification is methylation, which requires S-adenosylmethionine as a methyl donor, produced through the one carbon metabolism. Different micronutrients (*i.e.* folate and vitamin B12) are required to properly generate S-adenosylmethionine, making nutrition a strong regulating factor. Although micronutrients have been extensively described to affect epigenetic mechanisms such as DNA methylation, protein histone post-translational modifications or miRNAs, far less is known about RNA methylation.

Here, we review what is known about the regulation of RNA methylation by micronutrients and the physiological consequences of deficiencies.

© 2019 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Diet and lifestyle are major determinants of chronic diseases. The so-called nutrigenomics field (how diet alters gene expression) is in full expansion, and it is now well established that food affects epigenetic modifications. Most of the studies so far have concentrated on DNA methylation, histone modifications or miRNA expression. With the recent development of high-throughput techniques, information was gained on RNA modifications, and these also appear to be affected by diet.

RNA modifications have been known for several decades now. To date, 171 of them have been reported, including methylation (the most frequent), acetylation or phosphorylation. They are listed in a database called MODOMICS [1]. These modifications are present in all RNA types (including viral RNAs): non-coding (rRNA and tRNA, the most abundant RNAs in the cell, but also snRNA or snoRNA for example ...) and coding RNAs (mRNAs). These chemical modifications, which are all catalysed by various enzymes, often contribute to the local stabilization of the RNA, interactions with other molecules or to protect against degradation. For instance, modifications in

tRNAs that are positioned outside the anticodon loop are generally thought to maintain structural integrity and to act as identity determinants for tRNA interacting proteins, whereas those within or proximal to the anticodon loop contribute to the fidelity and efficiency of protein synthesis [2]. However, in most cases, the function of RNA modifications remains elusive. As some of them (*i.e.* methylation of adenosine at position 6, called m⁶A) are reversible and can be modulated by environmental signals to regulate RNA function, the term “epitranscriptomics” is now used [3].

Micronutrients (vitamins and minerals) are salvaged from diet and are required in minute amounts by organisms to enable many chemical reactions as they act mostly as cofactors or co-substrates. Some of them are therefore essential for the synthesis of the chemical groups that modify RNA, especially for RNA methylation (Fig. 1C), and are the subject of this minireview.

2. S-adenosylmethionine is synthesized through the one carbon metabolism

One of the most frequent and most described RNA modifications is methylation, which occurs at various positions of purines and pyrimidines. The methyl group usually originates from S-adenosylmethionine (SAM; Fig. 2), which is also used to methylate DNA or proteins. The level of SAM is closely regulated by diet, as micronutrients such as vitamins B9 and B12 or betaine (named methyl donors), are essential for its synthesis (Fig. 2).

* Corresponding author. NGERE, INSERM U1256, Faculté de Médecine, BP 50184, 54505 Vandoeuvre les nancy Cedex, France.

E-mail addresses: pauline.mosca@univ-lorraine.fr (P. Mosca), bruno.leheup@univ-lorraine.fr (B. Leheup), natacha.dreumont@univ-lorraine.fr (N. Dreumont).

Abbreviations

2'-O-Me	2'-O-methylation
AMPK	AMP-activated protein kinase
B12	vitamin B12
Dnmt2	DNA Methyl Transferase 2
ER	endoplasmic reticulum
FTO	Fat mass and Obesity associated protein
Hcys	Homocysteine
m ¹ A	N(1)-methyladenosine
m ⁵ C	N(5)-methylcytosine
m ⁶ A	N(6)-methyladenosine
m ⁷ G	N(7)-methylguanosine
mCm5U	5-carboxymethyluridine
MAT	Methionine Adenosyl Transferase

Met	Methionine
METTL3	Methyl Transferase Like 3
MS	Methionine Synthase
mt	mitochondrial
NAFLD	Non-alcoholic Fatty Liver Disease
Q	Queuosine
SAM	S-adenosylmethionine
SAH	S-adenosylhomocysteine
SNP	single nucleotide polymorphism
THF	Tetrahydrofolate
mTHF	methyl-THF
UPR	unfolded protein response
τm ⁵ U	5-taurinomethyluridine
τm ⁵ (s ²)U	5-taurinomethyl-2-thiouridine.

The one carbon metabolism is composed of two cycles: the folate and the methionine cycle, the latter of which is also connected to glutathione synthesis (Fig. 2). Importantly, it is involved in nucleotide synthesis and in amino acid metabolism. The methyl group donated by a serine is transferred to folates (or vitamin B9) and then used to produce methionine by methylating homocysteine. This step is catalyzed by methionine synthase, which requires vitamin B12 as a cofactor. This reaction is of utmost importance because hyperhomocysteinemia is a risk factor for different systemic (cardiovascular diseases) and neurologic diseases [4,5]. Methionine is then converted by the Methionine Adenosyl Transferase (MAT) into SAM, which then transfers its methyl group to RNAs, but also to DNA, proteins, or lipids. Losing its methyl group, SAM becomes S-adenosylhomocysteine (SAH), which can then be converted into homocysteine [6]. A decrease in the level of SAM, or an alteration of the SAM/SAH ratio, also called the methylation index, has been associated with alterations of epigenetic and epigenomic alterations [7,8].

3. tRNA methylation and micronutrients: an interplay known for decades

Transfer RNAs are the most heavily modified RNAs, with more than 90 unique modified nucleosides [1]. The presence of these modifications impact tRNA discrimination and translational fidelity, as well as stability or localization. Dynamic regulation of tRNA modifications modulates tRNA function, and is part of the mechanisms involved in cell response to stresses caused by environmental changes (temperature, oxidative stress or nutrient limitations, for example [9]).

Seminal observations on the impact of micronutrient deficiency on tRNA methylation originated in the late 1970's. In fact, it was reported that a deficiency in vitamin A over 7 weeks resulted in a decreased level of tRNA methyltransferases and a 5-fold decrease in the extent of the tRNA methylation in rat testis [10]. Furthermore, feeding rats with a methyl deficient (choline, methionine, folic acid and vitamin B12) diet for as little as one week resulted in liver tRNAs becoming hypomethylated [11–13]. Surprisingly, the activity of TRMT1 (tRNA (guanine²⁶-N²)-dimethyltransferase; EC 2.1.1.216) was increased in the liver [12,13]. Similar results on the activity of tRNA methyltransferases were obtained in carcinoma and lymphoma cell lines, as well as human embryonic fibroblasts, growing in a medium lacking methionine [14]. These data suggest that methyltransferase activity could be regulated by the SAM content in the cell. However, to our knowledge, the effect of vitamin deficiency on tRNA modifications was not investigated further,

particularly regarding the molecular mechanisms involved. Hence, it has not yet been determined whether the decreased methylation following a vitamin deficient diet is due to a direct effect (decreased level of SAM through impairment of the one carbon metabolism) or due to an indirect effect on the activity or synthesis of methyltransferases.

4. tRNA methylation and micronutrients: a cross-talk between different tRNA modifications

A decrease in some micronutrients, such as vitamins involved in the one-carbon metabolism (*i. e.* B9 or B12 vitamins), is expected to directly affect SAM levels, as they serve as coenzymes in the one-carbon metabolism, and therefore the extent of methylation on RNA substrates. Other micronutrients such as selenium, queuosine (Fig. 1A) or taurine (Fig. 1B), were reported to also impact tRNA methylation, *via* cross-talk between different tRNA modifications.

4.1. Selenium

Although selenium was first considered as a toxin, it is now regarded as an essential micronutrient (at low concentrations) with many health benefits, including roles in cancer and cardiovascular diseases prevention [15]. However, suboptimal selenium status was reported to be widespread in Europe and the Middle East [16]. Selenium is used for the synthesis of the 21st amino acid, selenocysteine (Sec), whose incorporation into proteins is dictated by the codon UGA [17]. Two isoacceptors of the tRNA^{[Ser]^{Sec} were identified, and their steady-state level and relative distribution were found to be affected by selenium, as demonstrated in cells grown in the presence of selenium or in rats fed a selenium deficient diet [18,19]. The two isoacceptors differ by the presence of a methyl group on the 2'-O hydroxyl site of the ribosyl moiety of the 5-carboxymethyluridine present at the wobble position (mcm⁵U and mcm⁵Um; Fig. 3). Selenium in the diet or in cell culture medium increases this methylation [18], thereby affecting tertiary structure. The expression of stress-related selenoproteins is dependent upon selenium and is positively correlated to the presence of mcm⁵Um [20]. Transgenic mice lacking this modification synthesize only housekeeping selenoproteins [21,22]. A mutation in tRNA^{[Ser]^{Sec}, resulting in a decreased expression and 2'-O-methylation of U34, led to a reduced expression of stress-related selenoproteins, but not housekeeping proteins ([23]; Table 1). The proband suffered from symptoms ranging from abdominal pain and muscle weakness to thyroid dysfunction. Selenium supplementation may therefore prove to be a therapeutic target in this case.}}

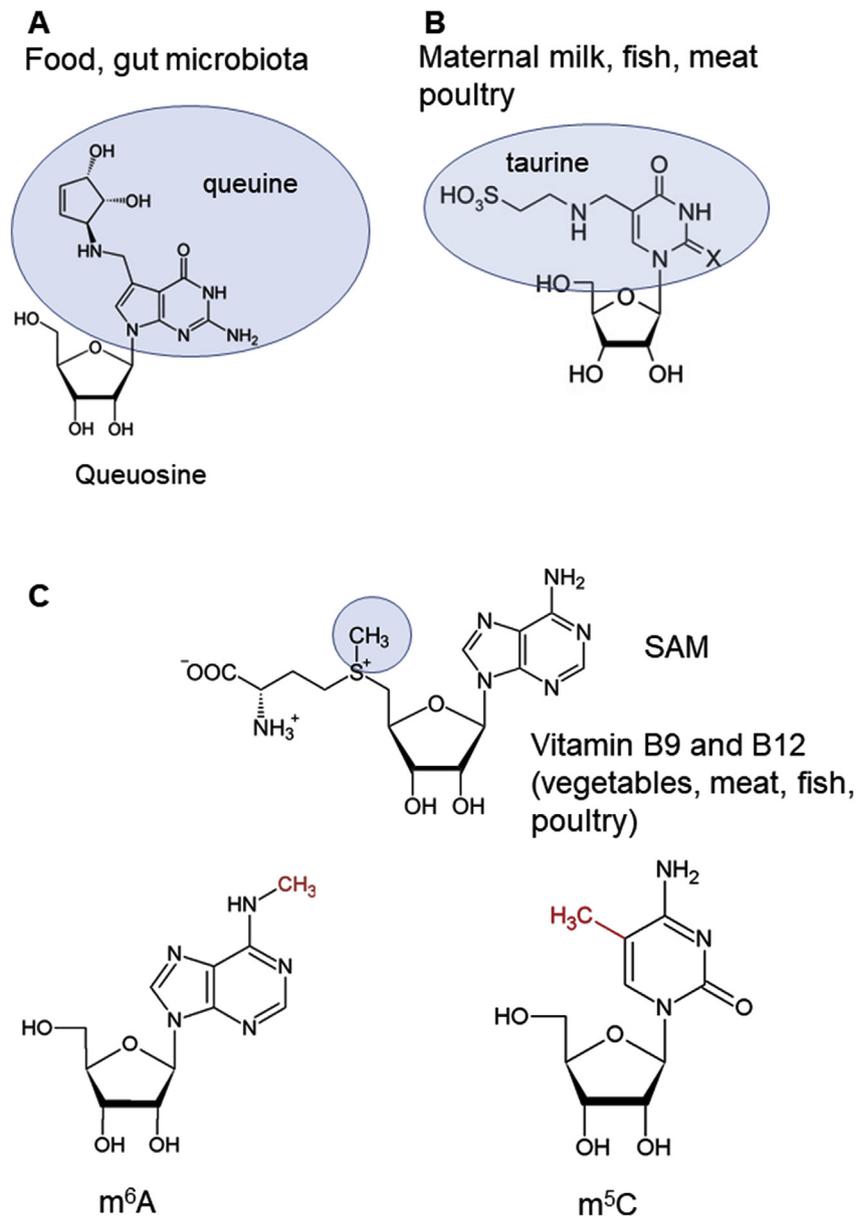


Fig. 1. Examples of RNA modifications with chemical groups donated by micronutrients

A Queuine is salvaged from food and gut microbiota. It is used to modify guanine at the wobble position to form queuosine.

B Taurine is found in maternal milk and food from animal origin. It modifies uridine at the wobble position of the tRNA.

C S-adenosylmethionine (SAM) synthesis is regulated by vitamins B9 and B12, which are found in vegetables and food of animal origin, respectively. The methyl group is used to methylate different nucleotides, the most prevalent in mRNA being N⁶-methyladenosine (m⁶A). Cytosines are also methylated, like in DNA (m⁵C).

4.2. Taurine and tRNA modifications

Taurine is a sulfur-containing amino acid that plays pleiotropic effects, involving modulation of calcium fluxes and neuronal excitability, osmoregulation and cell proliferation [24,25]. Therefore, it is widely used as an ingredient in nutritional supplements. In carnivores, taurine is an essential nutrient, with little *de novo* biogenesis from cysteine. A taurine-deficient diet presents with the same manifestations as the ones found in human mitochondrial encephalomyopathies, with developmental defects, dilated cardiomyopathy and blindness due to retina failure ([26]; Table 1). In humans, infants and young children have low capacity for *de novo* synthesis of taurine from cysteine and dietary intake is therefore essential for normal development. Taurine is not found as a component of proteins but is rather incorporated to modify

uridines at the anticodon wobble position (U34) to form 5-taurinomethyluridine ($\tau\text{m}^5\text{U}$; Fig. 3) in mitochondrial (mt) tRNA^{Leu(UUR)} and tRNA^{Trp}, and 5-taurinomethyl-2-thiouridine ($\tau\text{m}^5(\text{s}^2)\text{U}$; Fig. 3) in mt tRNAs for Glu, Lys and Gln [27,28]. Mutant mt tRNAs isolated from cells of patients with mitochondrial encephalomyopathies lack taurine modification at the wobble position (reviewed in Ref. [27]). Defective taurine modification impairs mitochondrial protein synthesis by affecting codon-anticodon recognition [27].

It has been known for some time that folate deficiency could impair the respiratory chain [29,30]. A molecular explanation was recently proposed with the finding that SHMT2, the enzyme responsible for the transfer of the methyl group from serine to tetrahydrofolate (Fig. 2) in the mitochondria, provides the methyl group to produce the taurinomethyluridine base at the wobble position of some tRNAs (Fig. 1B). The lack of this modified base

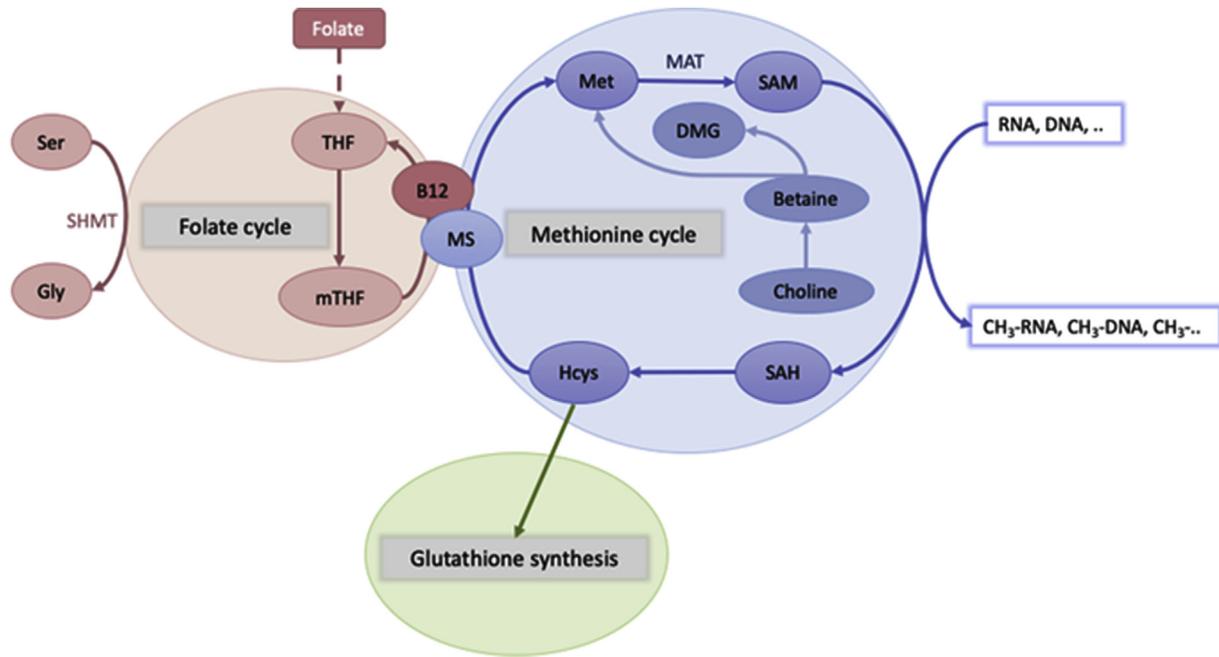


Fig. 2. The one carbon metabolism

Vitamin B12 (B12) is the cofactor of methionine synthase (MS). It enables the transfer of the methyl group from a folate to the methionine (Met). Met is the S-adenosylmethionine (SAM) precursor. The loss of the methyl group from SAM (used for transmethylation reactions of various substrates such as DNA, proteins, or RNA) gives S-adenosylhomocysteine (SAH), which is further converted into homocysteine (Hcys). Ser: Serine, Gly: glycine THF: tetrahydrofolate, mTHF: methyltetrahydrofolate, MAT: methionine adenosyl transferase, DMG: dimethylglycine, SHMT: serine hydroxymethyltransferase.

causes defective translation, due to mitochondrial translation stalling at some lysine and leucine codons [31].

To further identify the metabolic substrates of the 5-taurinomethyl group of $\tau\text{m}^5\text{U}$ in mt tRNAs, metabolic labeling experiments using stable isotopes, coupled to LC/MS analysis, were carried out in HeLa cell culture. It was determined that extracellular taurine supplied in the medium is directly incorporated into the 5-taurinomethyl group in mt RNA [28]. Furthermore, the methylene group of $\tau\text{m}^5\text{U}$ originates from serine, with 5,10-methylene THF as an intermediate of the one carbon metabolism [32]. Cells grown in a taurine deficient medium had a reduced level of $\tau\text{m}^5(\text{s}^2)\text{U}$ and $\tau\text{m}^5\text{U}$ in mt tRNAs. Similar results were found in cats fed a control or a taurine deficient diet for 6 months, or juvenile flatfishes fed a deficient diet for 2 months ([32]; Table 1). These results show that tRNA modifications, previously regarded as static, can be modulated by sensing of the cellular metabolic status. Even though human cells are able to synthesize taurine *de novo*, the supply coming from the extracellular environment is necessary to maintain a high frequency of modified nucleosides in the mt tRNAs.

4.3. Queuine

Cytosine-5 methylation (m^5C), described in DNA, is the paradigm of epigenetic modifications. It is also present in tRNAs, and m^5C methylation at position C38 (Fig. 3) is driven by the Dnmt2 (DNA Methyl Transferase 2) family of methyltransferases [33], the most common substrate being tRNA^{Asp} [34]. Activity of the fission yeast homolog of Dnmt2, named Pmt1, was shown to be regulated by nutritional cues [33] which were later identified as queuine (Fig. 1A; [35]). This micronutrient, salvaged from diet and gut microbiota, enables the formation of queuosine, a modification found at the wobble position of the anticodon loop of the tRNA [36]. Replacement of guanosine by queuosine (Q) was proposed to alter mRNA codon recognition, to affect proper protein synthesis and to control translational speed [37]. Its depletion activates cellular

stress responses *in vitro* and *in vivo* [38]. Q tRNAs are often hypomodified in transformed cells, and Q deficiency is linked to various kinds of tumors [39].

The difficulty of working with germ-free mice or to obtain a queuine deficient diet has long precluded the study of this micronutrient in metazoan. Recently, using mammalian cells cultured with a synthetic serum-free medium thereby devoid of queuine, Tuorto and colleagues showed that queuine modification promotes C38 methylation [38] (Fig. 3; Table 1). Lack of queuine modification resulted in less methylation of tRNA^{Asp} and a reduced translational speed at decoded and near-cognate codons. Cells grown in queuine deficient medium showed an increase in endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR). Similar results were obtained in liver of axenic mice fed a queuine deficient diet for 2 months. Along with a reduced level of Q-tRNA and a lower level of m^5C at position 38, the UPR, ER and oxidative stress pathways were deregulated [38].

5. Methylation in mRNAs: a still uncharted territory

It is important to note that less abundant RNAs are also modified by methylation. Out of the few internal modifications found in mRNAs, m^6A was the first to be identified [40]. As well, it is the most abundant modification, and is currently the most studied. The other modifications (m^7G (N(7)-methylguanosine), 2'-O-methylation, or the controversial m^5C and m^1A (N(1)-methyladenosine)) are less understood in terms of function or identity of the writers/readers/erasers. Following the recognition of the importance of these mRNA modifications, the term epitranscriptome is now used, and this field is in full expansion. Indeed, akin to DNA methylation, these modifications seem to be dynamic and require writers, readers and erasers. In the case of m^6A , its level varies across tissues and developmental stages [41], as well as the nutrient status [42,43]. Indeed, the fat mass and obesity associated protein (FTO) was identified as a $\text{Fe}^{2+}/2$ -oxoglutarate dependent demethylase,

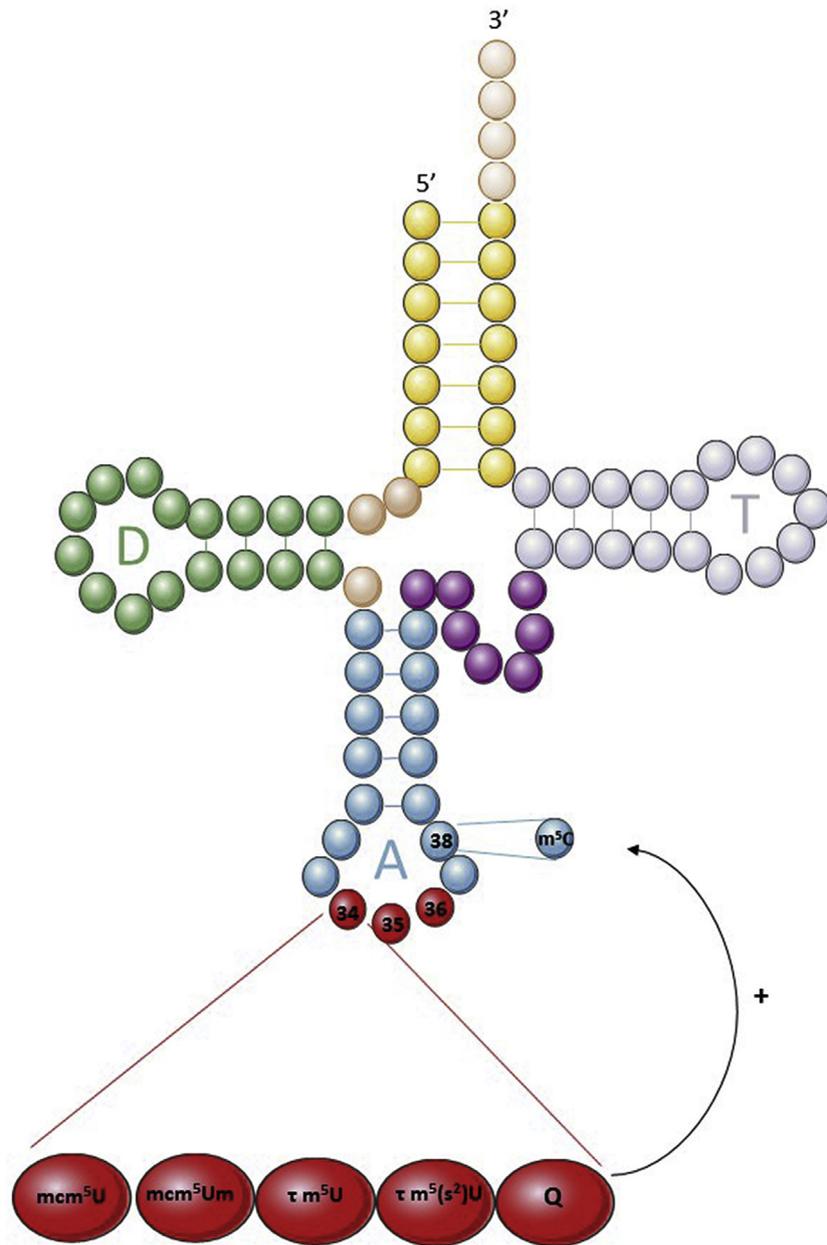


Fig. 3. tRNA modifications

tRNA are composed of an acceptor stem (yellow), a D arm (green), a A arm (blue), a variable loop (pink) and a T arm (grey). Codons recognize the anticodon (red) composed of nucleotides that can be modified depending on micronutrient deficiencies.

preferentially catalyzing m^6A removal in RNA [44,45]. This protein plays a key role in metabolic diseases [46] and SNPs (single nucleotide polymorphism) in the first intron of the *FTO* gene were found to be strongly associated with increased body mass index, and an increased risk of childhood and adult obesity [47,48]. In fact, subjects homozygous for the high-risk allele exhibit increased *ad libitum* food intake and for children, obesity-prone eating behaviors. *FTO* transgenic mice support its role in regulating body weight, as overexpression results in obesity, whereas null or mutant mice display a lean phenotype [49].

Several reports have shown that diet (restriction, high fat or high glucose diet) affects m^6A levels by affecting *FTO* or Methyl Transferase Like 3 protein (*METTL3*), which contains the catalytic activity responsible for m^6A formation. It was also reported that

fasting induces an increase of *FTO* mRNA and protein expression in the hypothalamus of rats [50]. Furthermore, *FTO* was mislocalized in the cytoplasm of some neurons due to an altered phosphorylation pattern.

Importantly, *FTO* is also involved in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most common cause of chronic liver disease in the developed world. The hepatoprotective effects of betaine (Fig. 2; Table 1) were reported in animal models of NAFLD [51,52]. Because betaine is used to synthesize SAM, it is thought to modulate gene expression through epigenetic marks. Chen et al. reported that betaine supplementation prevented the increase of triglyceride, AST and ALT levels in the serum, in a rat model of NAFLD induced by a 6 week high-fat diet [53]. Upon betaine supplementation, SAM level in the liver was restored, resulting in more m^6A

Table 1

Modification	Diet	Experimental model	Effect	Disease	Reference
Tm ⁵ U	Taurine deficiency 6 months	Cat	reduced frequency	developmental defects, blindness, cardiomyopathy	[32]
Tm ⁵ U	Taurine deficiency 2 months	flatfish	reduced respiratory activity	MELAS, MERFF	[28]
Tm ⁵ (s ²)U mcm ⁵ U/ mcm ⁵ Um	2 week deficiency	genetic disease with mutation in tRNA Leu ^{UUR} /tRNA Lys	human cells	affect both the steady-state level and distribution of 2 tRNA[Ser]Sec	[19]
Queuosine m ⁵ C C38	4 month deficient diet queuine deficient diet 2 months	rat mouse	activation of UPR and ER stress		[38]
m ⁶ A	queuine deficient medium high-fat diet w/wo betaine supplementation	human cells rat	oxidative stress increased m6A, reduced triglyceride accumulation in the liver	NAFLD	[53]
	betaine treatment	transgenic mice knock-out for AMPK1 primary adipocytes	increased m6A, reduced triglyceride accumulation in adipose tissue increased m6A, reduced triglyceride accumulation	NAFLD	[54]

levels and a reduced expression of FTO [53]. Similar results were found in the adipose tissue of mice fed a high-fat diet for 8 weeks. Supplementation with betaine reversed the effects on m⁶A levels and the altered expression of fatty acid oxidation or lipolysis related genes caused by the diet [54]. The mechanism seems to involve AMPK (AMP-activated protein kinase) as in *Ampk*−/− knock-out mice, betaine had no counteracting effect. However, the precise mechanisms and a direct role of betaine on mRNA methylation remain to be uncovered.

6. Conclusions and future directions

Micronutrients are not produced by the human body and must be acquired from food. Although required in only minute amounts, deficiencies in micronutrients can have devastating effects on the health of children during development, adults, and the elderly. Globally, more than 2 billion people suffer from one or more micronutrient deficiency, including at least half of children worldwide ages 6 months to 5 years. Increasing evidence suggests that micronutrient deficiency can alter gene expression at the epigenetic level, with DNA methylation, histone modifications and miRNA expression being mostly described. Far less concern has been devoted to RNA modifications, even if the field of epitranscriptomics has gained much interest in the past few years. Most RNA methylases use SAM as the methyl group donor. It was recently reported that the level of MAT2A (the SAM synthetase, Fig. 2) is regulated through m⁶A modification within specific hairpin structures in the 3'-UTR upon methionine depletion in the cell culture medium, promoting splicing of an otherwise retained intron [54,55]. Another mechanism requires the reader protein YTHDC1 to mediate down-regulation of the MAT2A mRNA under high SAM conditions [55]. The methylation reaction is not catalysed by METTL3 as in most cases, but rather by METTL16. This finding of a feed-back loop highlights the importance of precisely regulated SAM levels.

The one carbon metabolism is also dependent on the presence of micronutrients, such as B9 and B12 vitamins. Deficiency in these vitamins is frequent in pregnant women and in elderly people, and is linked to an increased risk of neurodevelopmental defects during gestation, or to neurodegenerative disorders or cardiovascular diseases later in life [7]. Inappropriate intake of micronutrients necessary for SAM production is therefore likely to impact methylation modifications in different classes of RNA. Up to now, tRNAs have been the most described, but the recent identification of several internal methylated residues in mRNA open a whole new

area of research.

Taken together, those data suggest that RNA methylations are very important for RNA processing and cell metabolism. A perturbation of epigenetic modifications caused by a diet deficient in micronutrients, such as queuine or B vitamins, can lead to pathological consequences for the cell and/or the organism. Therefore, adequate food intake, particularly micronutrients (compared to the macronutrients carbohydrates, fat and proteins) is mandatory to ensure a proper epitranscriptomic regulation of RNA expression.

Funding

This work was supported by grants from Université de Lorraine.

Declaration of interest

None.

Author contributions

PM, BL and ND wrote and edited the manuscript.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors wish to thank Brittany Balint for careful reading of the manuscript.

References

- [1] A. Czerwoniec, et al., MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2008 update, *Nucleic Acids Res.* 37 (Jan. 2009) D118–D121. Database issue.
- [2] P.F. Agris, Decoding the genome: a modified view, *Nucleic Acids Res.* 32 (1) (2004) 223–238.
- [3] N. Liu, T. Pan, RNA epigenetics, *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 165 (1) (Jan. 2015) 28–35.
- [4] R. Moretti, P. Caruso, The controversial role of homocysteine in neurology: from labs to clinical practice, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (1) (Jan. 2019).
- [5] H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygård, S.E. Vollset, Homocysteine and cardiovascular disease, *Annu. Rev. Med.* 49 (1998) 31–62.
- [6] J.M. Salbaum, C. Kappen, Genetic and epigenomic footprints of folate, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 108 (2012) 129–158.
- [7] J.-L. Guéant, F. Namour, R.-M. Guéant-Rodriguez, J.-L. Daval, Folate and fetal

- programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.* 24 (6) (Jun. 2013) 279–289.
- [8] S.J. Mentch, J.W. Locasale, One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1363 (Jan. 2016) 91–98.
- [9] S. Kirchner, Z. Ignatova, Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease, *Nat. Rev. Genet.* 16 (2) (Feb. 2015) 98–112.
- [10] A.M. McCormick, R.F. Krause, The effect of vitamin A deficiency on testicular transfer RNA methyltransferase activity, *Biochim. Biophys. Acta* 474 (2) (Jan. 1977) 218–225.
- [11] J.K. Christman, G. Sheikhejad, M. Dizik, S. Abileah, E. Wainfan, Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency, *Carcinogenesis* 14 (4) (Apr. 1993) 551–557.
- [12] E. Wainfan, M. Kilkenny, M. Dizik, Comparison of methyltransferase activities of pair-fed rats given adequate or methyl-deficient diets, *Carcinogenesis* 9 (5) (May 1988) 861–863.
- [13] E. Wainfan, M. Dizik, M. Hluboky, M.E. Balis, Altered tRNA methylation in rats and mice fed lipotrope-deficient diets, *Carcinogenesis* 7 (3) (Mar. 1986) 473–476.
- [14] M.J. Tisdale, Changes in tRNA methyltransferase activity and cellular S-adenosylmethionine content following methionine deprivation, *Biochim. Biophys. Acta* 609 (2) (Sep. 1980) 296–305.
- [15] Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. - PubMed - NCBI [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24485058> [Accessed: 13-May-2019].
- [16] R. Stoffaneller, N.L. Morse, A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East, *Nutrients* 7 (3) (Feb. 2015) 1494–1537.
- [17] W. Leinfelder, E. Zehelein, M.A. Mandrand-Berthelot, A. Böck, Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine, *Nature* 331 (6158) (Feb. 1988) 723–725.
- [18] A.M. Diamond, et al., Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec), *J. Biol. Chem.* 268 (19) (Jul. 1993) 14215–14223.
- [19] D. Hatfield, B.J. Lee, L. Hampton, A.M. Diamond, Selenium induces changes in the selenocysteine tRNA[Ser]Sec population in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 19 (4) (Feb. 1991) 939–943.
- [20] H.S. Chittum, et al., Selenocysteine tRNA[Ser]Sec levels and selenium-dependent glutathione peroxidase activity in mouse embryonic stem cells heterozygous for a targeted mutation in the tRNA[Ser]Sec gene, *Biochemistry (Mosc.)* 36 (28) (Jul. 1997) 8634–8639.
- [21] B.A. Carlson, X.-M. Xu, V.N. Gladyshev, D.L. Hatfield, Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA, *J. Biol. Chem.* 280 (7) (Feb. 2005) 5542–5548.
- [22] B.A. Carlson, et al., Selective restoration of the selenoprotein population in a mouse hepatocyte selenoproteinless background with different mutant selenocysteine tRNAs lacking Um34, *J. Biol. Chem.* 282 (45) (Nov. 2007) 32591–32602.
- [23] E. Schoenmakers, et al., Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis, *J. Clin. Investig.* 126 (3) (Mar. 2016) 992–996.
- [24] C. Wen, et al., Taurine is involved in energy metabolism in muscles, adipose tissue, and the liver, *Mol. Nutr. Food Res.* 63 (2) (2019), e1800536.
- [25] S.S. Oja, P. Saransaari, Significance of taurine in the brain., *Adv. Exp. Med. Biol.* 975 (1) (2017) 89–94.
- [26] D.C. Wallace, Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease, *Am. Heart J.* 139 (2 Pt 3) (Feb. 2000) S70–S85.
- [27] Y. Kirino, T. Suzuki, Human mitochondrial diseases associated with tRNA wobble modification deficiency, *RNA Biol.* 2 (2) (Apr. 2005) 41–44.
- [28] T. Suzuki, T. Suzuki, T. Wada, K. Saigo, K. Watanabe, Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases, *EMBO J.* 21 (23) (Dec. 2002) 6581–6589.
- [29] S. Pooya, 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, *J. Hepatol.* 57 (2) (Aug. 2012) 344–351.
- [30] M.M. Garcia, et al., Methyl donor deficiency induces cardiomyopathy through altered methylation/acetylation of PGC-1 α by PRMT1 and SIRT1, *J. Pathol.* 225 (3) (Nov. 2011) 324–335.
- [31] R.J. Morscher, et al., Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation, *Nature* 554 (7690) (01 2018) 128–132.
- [32] K. Asano, et al., Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease, *Nucleic Acids Res.* 46 (4) (Feb. 2018) 1565–1583.
- [33] M. Becker, S. Müller, W. Nellen, T.P. Jurkowski, A. Jeltsch, A.E. Ehrenhofer-Murray, Pmt1, a Dnmt2 homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, mediates tRNA methylation in response to nutrient signaling, *Nucleic Acids Res.* 40 (22) (Dec. 2012) 11648–11658.
- [34] F. Harada, S. Nishimura, Possible anticodon sequences of tRNA His, tRNA Asm, and tRNA Asp from *Escherichia coli* B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acids, *Biochemistry (Mosc.)* 11 (2) (Jan. 1972) 301–308.
- [35] M. Müller, et al., Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine, *Nucleic Acids Res.* 43 (22) (Dec. 2015) 10952–10962.
- [36] C. Fergus, D. Barnes, M.A. Alqasem, V.P. Kelly, The queuine micronutrient: charting a course from microbe to man, *Nutrients* 7 (4) (Apr. 2015) 2897–2929.
- [37] J.M. Zaborse, V.L.B. DuMont, E.W.J. Wallace, T. Pan, C.F. Aquadro, D.A. Drummond, A nutrient-driven tRNA modification alters translational fidelity and genome-wide protein coding across an animal genus, *PLoS Biol.* 12 (12) (Dec. 2014), e1002015.
- [38] F. Tuorto, et al., Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation, *EMBO J.* 37 (18) (Sep. 2018).
- [39] L.P. Sarin, S.A. Leidel, Modify or die?—RNA modification defects in metazoans, *RNA Biol.* 11 (12) (2014) 1555–1567.
- [40] R. Desrosiers, K. Friderici, F. Rottman, Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71 (10) (Oct. 1974) 3971–3975.
- [41] K.D. Meyer, S.R. Jaffrey, The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (5) (May 2014) 313–326.
- [42] Y. Yang, et al., Glucose is involved in the dynamic regulation of m6A in patients with type 2 diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104 (3) (Mar. 2019) 665–673.
- [43] X. Li, J. Yang, Y. Zhu, Y. Liu, X. Shi, G. Yang, Mouse maternal high-fat intake dynamically programmed mRNA m6A modifications in adipose and skeletal muscle tissues in offspring, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (8) (Aug. 2016).
- [44] T. Gerken, et al., The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase, *Science* 318 (5855) (Nov. 2007) 1469–1472.
- [45] X. Zhang, et al., Structural insights into FTO's catalytic mechanism for the demethylation of multiple RNA substrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116 (8) (19 2019) 2919–2924.
- [46] G. Cao, H.-B. Li, Z. Yin, R.A. Flavell, Recent advances in dynamic m6A RNA modification, *Open Biol.* 6 (4) (Apr. 2016).
- [47] T.M. Frayling, et al., A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity, *Science* 316 (5826) (May 2007) 889–894.
- [48] D. Meyre, et al., Prevalence of loss-of-function FTO mutations in lean and obese individuals, *Diabetes* 59 (1) (Jan. 2010) 311–318.
- [49] J. Fischer, et al., Inactivation of the Fto gene protects from obesity, *Nature* 458 (7240) (Apr. 2009) 894–898.
- [50] P. Vujovic, et al., Fasting induced cytoplasmic fto expression in some neurons of rat hypothalamus, *PLoS One* 8 (5) (May 2013), e63694.
- [51] C. Ji, N. Kaplowitz, Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice, *Gastroenterology* 124 (5) (May 2003) 1488–1499.
- [52] K.K. Kharbanda, et al., Role of elevated S-adenosylhomocysteine in rat hepatocyte apoptosis: protection by betaine, *Biochem. Pharmacol.* 70 (12) (Dec. 2005) 1883–1890.
- [53] J. Chen, X. Zhou, W. Wu, X. Wang, Y. Wang, FTO-dependent function of N6-methyladenosine is involved in the hepatoprotective effects of betaine on adolescent mice, *J. Physiol. Biochem.* 71 (3) (Sep. 2015) 405–413.
- [54] X. Zhou, J. Chen, J. Chen, W. Wu, X. Wang, Y. Wang, The beneficial effects of betaine on dysfunctional adipose tissue and N6-methyladenosine mRNA methylation requires the AMP-activated protein kinase α 1 subunit, *J. Nutr. Biochem.* 26 (12) (Dec. 2015) 1678–1684.
- [55] K.E. Pendleton, et al., The U6 snRNA m6A methyltransferase METTL16 regulates SAM synthetase intron retention, *Cell* 169 (5) (May 2017) 824–835, e14.

Annexe 3 : Bi-allelic pathogenic variants in *SARS1*
cause neurodevelopmental delay, deafness,
cardiomyopathy and decompensation during fever due
to partial loss-of-function

Bi-allelic pathogenic variants in *SARS1* cause neurodevelopmental delay, deafness, cardiomyopathy and decompensation during fever due to partial loss-of-function.

Jean-Marie Ravel^{1,2}, Natacha Dreumont², Pauline Mosca², Desiree E.C. Smith³, Marisa I. Mendes³, Arnaud Wiedemann², David Coelho², Christophe Philippe^{4,5}, Frédéric Tran-Mau-Them^{4,5}, Julien Thevenon^{4,5}, Paul Kuentz^{4,5}, Sabine A. Fuchs⁶, Gautam Kok⁶, Christelle Thauvin^{4,5}, Jean-Louis Guéant^{1,2}, Gajja S. Salomons³, Laurence Faivre^{5,7}, François Feillet^{1,2}

1 Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Reference Centre of Inborn Metabolism Diseases, F54000, France

2 Université de Lorraine, Inserm, NGERE, F-54000 Nancy, France

3 Metabolic Unit, Department of Clinical Chemistry, Amsterdam UMC, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

4 Unité Fonctionnelle Innovation en Diagnostic génomique des maladies rares, CHU Dijon Bourgogne, Dijon, France

5 Centre de Génétique, Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, et Centre de Compétence Maladies Mitochondriales, FHU TRANSLAD, Hôpital d'Enfants, CHU de Dijon, France

6 Department of Metabolic Diseases, Wilhelmina Children's Hospital, University Medical Center Utrecht, Lundlaan 6, 3584, EA, Utrecht, the Netherlands; Regenerative Medicine Center Utrecht, Uppsalalaan 8, 3584, CT, Utrecht, the Netherlands; on behalf of United for Metabolic Diseases

7 INSERM UMR1231, Equipe Génétique des Anomalies du Développement, Université de Bourgogne, Dijon, France

Corresponding Author(s)

Jean-Marie Ravel

François Feillet

Abstract

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are ubiquitously expressed enzymes responsible for ligating amino acids to their cognate tRNA molecules through an aminoacylation reaction. The resulting aminoacyl-tRNA, is delivered to ribosome elongation factors in order to participate in protein synthesis. Seryl-tRNA synthetase (SerRS) is one of the cytosolic aARSs. SerRS is encoded by *SARS1* and catalyses the attachment of serine to tRNA(Ser).

We report a consanguineous Turkish family with homozygous mutations in *SARS1* associated with intellectual disability, congenital deafness, severe epilepsy, hypertrophic cardiomyopathy and decompensation during febrile episodes.

We found the familial missense mutation (c.638G>T, p.Arg213Leu) in *SARS1* to affect the enzymatic core domain of the protein, impair its enzymatic activity and lead to reduced, but normally localized cytoplasmic SerRS concentrations.

We describe a new syndrome associated with bi-allelic mutations in *SARS1* that cause developmental delay, central deafness, cardiomyopathy, and metabolic decompensation during fever leading to death. Our results thereby describe a new clinical entity and expand the clinical and mutational spectrum of seryl- and aminoacyl-tRNA synthetases deficiencies.

Keywords:

Aminoacylation, aminoacyl-tRNA synthetase, brain, death, intellectual disability, deafness, *SARS1*, tRNA

Introduction

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) are enzymes that catalyse the esterification of an amino acid onto the 3' extremity of its cognate tRNA (1, 2). aaRS can be distinguished according to their function in the cytosol (aaRS) or in the mitochondria (mtaaRS). The product of this reaction, an aminoacyl-tRNA, is delivered to ribosome elongation factors to participate in protein synthesis. Most amino acids have their own aARS for coupling to their corresponding tRNA. More specifically, seryl-tRNA synthetase (SerRS) catalyses the attachment of serine to tRNA(Ser) in a two-step reaction: serine is first activated by ATP to form Ser-AMP by releasing pyrophosphate. In the next step, tRNA(Ser) binds to the SerRS enzyme-amino acid-AMP complex and forms a covalent bond with the amino acid by releasing AMP to form an amino acid-SerRS enzyme tRNA complex (3). Later the tRNA-amino acid complex is released from SerRS (4).

aaRS fulfil extremely important roles in translation: not only do they provide the basic elements for protein synthesis, but they are also the only enzymes responsible for the proper deciphering of the genetic code (3, 4). In order to ensure faithful translation of the genetic message, synthetases must identify and match tRNAs with their related amino acid, which relies on the correct recognition of both substrates.

Beyond these classical functions, these enzymes are also known to have a role in several metabolic and signalling pathways that are important for cell viability (5). In particular, it is common for eight of these synthetases to assemble with several accessory proteins to form a macromolecular complex called multi-synthetase complex (MSC) (6, 7). The roles of this complex are extremely varied and range from RNA processing and trafficking, ribosomal RNA synthesis, to cellular processes such as apoptosis, angiogenesis or inflammation (8).

Mutations in all aaRSs have already been associated with a variety of human diseases with both recessive and dominant inheritance patterns (9-11). As well as many other ubiquitously expressed housekeeping genes, mutations in aaRS have been implicated in intellectual disability and neurological disorders (12). There is a wide range presentation of clinical manifestations in patients with aminoacyl-tRNA synthetases mutations, despite the enzymes' common biochemical role. Patients' phenotype can range from isolated clinical signs to multi-systemic disorders (13, 14). For example, autosomal dominant mutations in *GARS1* and *KARS1* affect the peripheral nervous system and are correlated with type 2 Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2) (15). At the opposite, *DARS2* is associated with leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation (16).

On a molecular level, loss of function associated with mutations in *ARS* is attributed to many different mechanisms: decreased ability of the first step of aminoacylation reaction (17), impaired ATP binding in the aminoacylation domain (18), inability to recognize noncognate amino acid leading to mis-aminoacylation (19). Unraveling the structure and function of these enzymes has raised attention in the last few years as they represent potential drug targets for various diseases.

Here, we report the clinical phenotypes associated with a novel homozygous pathogenic variation in *SARS1* in four affected individuals from a consanguineous Turkish family. We provide genetic proof of the

pathogenicity of this variant by analysing its impact in patient-derived fibroblasts and cell lines with the *SARS1* patient-mutations.

Subjects and Methods

Study Participants

The patients were recruited by the Reference centre of hereditary disease of Nancy, France. Informed consent of the parents was obtained in writing. The probands were examined by an experienced practitioner specialised in metabolic diseases, who assessed their physical and cognitive status. Blood samples for DNA preparation were collected and genomic DNA was extracted using a standard method. Fibroblasts were obtained from two patients after a superficial punch skin biopsy under patient's local anaesthesia.

Whole-exome sequencing

DNA was extracted from peripheral whole-blood samples, using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) following standard procedures. Exome capture and sequencing were performed at Integragen SA from 1 µg of genomic DNA per individual using the TWIG kit. The resulting libraries were sequenced on a HiSeq 4000 (Illumina) according to the manufacturer's recommendations for paired-end 76 bp reads. Obtained read were aligned to the human genome reference sequence (GRCh37/hg19 assembly) using Burrows-Wheeler aligner (BWA; version 0.7.15). Duplicate reads were marked using Picard MarkDuplicates (version 2.4.1) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) and aligned read were then processed using GATK BaseRecalibrator and PrintReads (Genome Analysis Toolkit; version 3.8) to recalibrate base quality scores, according to GATK Best Practices recommendations. Quality control was performed on all BAM files by calculating depth of coverage onto RefSeq database (release 2018-11-11) with GATK DepthOfCoverage. SNPs and indels were identified from BAM files using GATK HaplotypeCaller. All variants identified were annotated using SnpEff (version 4.3).

Analysis of the subcellular localization of the protein and its level of expression

A pFLAG-CMV2 plasmid containing human *SARS1* was provided by the team of Xu and colleagues (20). The c.638G>T change was introduced by directed mutagenesis with the In-Fusion® cloning kit (Takara Bio), using the 5'- GCCCTTcTcACCTTGGGAAGTCG -3' and 5'- CAAGGTGaGAAGGGCATACTGGATGAGAGC-

3' primers (the mutation is in lower case), following the manufacturer's recommendations. HEK-293 cells, seeded at a density of $2 \cdot 10^5$ cells/well (6-well plates), were transfected with 1 μ g of wild-type or mutant SerRS construct for 48h using jetPEI (Polyplus Transfection). Analysis of the cell localization of the wild-type or mutated R213L protein was performed by immunofluorescence using an anti-FLAG antibody (Sigma Aldrich). The level of expression of the endogenous protein was analysed by Western Blot from 30 μ g of protein extracts obtained from patient or control fibroblasts with a rabbit-anti-human SerRS antibody N1C2 (Genetex, cat. GTX113546).

RT-PCR

RNA was extracted from patients' fibroblasts using Trizol™ (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. 1 μ g of RNA was reverse transcribed with M-MLV (Invitrogen) and oligo(dT)₁₂₋₁₈. 2 μ L of cDNA were then amplified by PCR with primers targeting exon 5 and 7, to analyse splicing. Primer sequences were as follows: (sense, exon 5) 5'-GATTGTACAGTCAGGAAGAAG-3' and (antisense, exon 7) 5'-CTGACGGAAGCAGGTAGACAG-3'. GAPDH cDNA amplification was used as a control.

Northern blot analysis of tRNA levels

RNA was extracted from patients' fibroblasts using Trizol™ (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. RNA (2.5 μ g) was resolved on a 15% acrylamide 7M urea gel and transferred on a Hybond N+ membrane. Specific tRNAs were visualized using DNA probes against tRNA[Ser](Sec) and tRNA(Leu^{CAG}) labelled with biotin (North2South™ Biotin Random Prime Labeling Kit, Thermo Scientific).

Enzymatic study

Serylation was assessed by measuring SerRS activity in cultured fibroblasts from patient 1 and 3. Fibroblast were lysed using 3 freeze thaw cycles. Ten μ g of total protein was incubated in triplicate at 37°C in a reaction buffer containing 50 mmol/L Tris buffer pH 7.5, 12 mmol/L MgCl₂, 25 mmol/L KCl, 1 mg/mL bovine serum albumin, 0.5 mmol/L spermine, 1 mmol/L ATP, 0.2 mmol/L yeast total tRNA, 1 mmol/L dithiothreitol, 0.3 mmol/L [¹³C₃,¹⁵N]-serine and [D₆]-glycine (as control). After 10 minutes the reaction was terminated using trichloroacetic acid. The samples were washed with trichloroacetic acid and ammonia was added to release the labelled amino acids from the tRNAs. [¹³C₂,¹⁵N]-Glycine was added as internal standard. The labelled

amino acids were quantified by LC-MS/MS. Intra-assay and inter-assay variation were <15%. Glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) was simultaneously detected as control enzyme to ensure sample fidelity.

Result

Clinical Features

The family pedigree of this inbred Turkish family is shown in Figure 1 A.

The first child (patient 1) was diagnosed with deafness at 12 months of age and received a cochlear implant at 18 months of age (Table 1). He had a developmental delay and acquired independent walking at 23 months. At the age of 4 years, he was transferred to the intensive care unit (ICU) for sepsis in a context of vomiting with erythematous-pultaceous angina. Biologic testing revealed a slight hepatic cytolysis and the presence of an increase in creatine kinase (CPK , 900 U/l (?), reference range: U/l) with a slight hyperproteinorachia (1.25 g/l), reference range:). Cardiac ultrasonography showed left concentric hypertrophic cardiomyopathy with a collapsed ejection fraction (10%) leading to death.

In the second child (patient 2), deafness was diagnosed before the age of nine months. She died one week after her older brother at 30 months of age, following epileptic seizures during a febrile episode, episode leading to brain death within 48 hours. Moderate hypertrophic cardiomyopathy was detected by cardiac ultrasound. MRI of the brain showed atrophy of the cerebellum and brain stem with a bilateral inferior dysplastic aspect of the cerebellum. Delayed myelination and a thin corpus callosum were also reported. Lumbar puncture revealed hyperproteinorachia (1.18 g/l, referenceref range:). No metabolic abnormalities were found, nor were liver enzymes or CPK elevated.

Her twin sister (patient 3) had moderate dysmorphic features (strabismus, moderate middle stage hypoplasia, marked philtrum, bulbous nose, Figure 2), congenital deafness, and severe developmental delay. She acquired walking around 2.5 years of age and had significant speech delay. Based on the association of hypertrophic cardiomyopathy, deafness and developmental delay in the two deceased siblings, mitochondrial disease was suspected and a treatment cocktail including Thiamine, Riboflavin, Carnitine and Q10 coenzyme was administered for four years. Cardiological monitoring revealed no cardiomyopathy. At age 9, she was admitted to the ICU for fever, digestive disorders and an inflammatory syndrome. During this febrile episode,

she developed a status epilepticus followed by sudden brain death as shown on the continuous EEG recording during resuscitation (Figure S1).

The fourth child (patient 4) had congenital deafness, stunted growth and moderate developmental delay. Clinical examination showed dysmorphic features similar to those of his sister (Figure 2). An emergency protocol for fever management was put in place in this child. He presented numerous episodes of hyperthermia sometimes requiring ICU hospitalization. He is currently six-year-old and is still being cared for in our unit.

The fifth child has no symptoms.

Genetic analysis

A homozygous c.638G>T missense variation in exon 6 of the *SARS1* gene leading to p.(Arg213Leu) was identified in patient 1 by exome sequencing (Figure 1 B-C). Several different pathogenicity predictors (Polyphen2, SIFT, Mutation Taster) predicted that this variant was deleterious. In addition, it was absent from the gnomAD database of healthy individuals. The amino acid substitution p.(Arg213Leu) is located in the aminoacylation domain (Fig. 1B). The other patients were also homozygous for this variation. The fifth child is not homozygous for this variation and both parents are heterozygous.

Functional characterization

SerRS is a dimeric enzyme that belongs to class II tRNA synthetases. Its catalytic domain is composed of 7-stranded antiparallel β -sheets and 3 conserved motifs. The Arg at position 213 is located in motif 1, which forms the dimer interface, whereas motifs 2 and 3 contain residues of the active site. According to the crystal structure of human Seryl-tRNA synthetase dimer complexed with two molecules of tRNA^{sec} (PDB code 4RQE), the lateral chain of arginine at position 213 not only establishes hydrogen bonds with residues Phe459 and Glu458 (located in motif 3) in the monomeric but also with Phe459 of the second subunit.

To evaluate the pathogenicity of the variant, we measured the activity of the SerRS enzyme. Analysis of patient fibroblasts showed reduced SerRS activity around 50% (Figure X). A simultaneously measured control enzyme (GlyRS) was comparable to controls. In addition, quantification of protein expression showed

a significant reduction in affected patients compared to control (Figure 2). To test whether the R213L mutation might influence protein localization, we used constructs expressing either the wild-type or the mutant protein fused to a FLAG tag transfected into HEK 293 cells. There was no obvious change in the mainly cytoplasmic localization of the R213L mutated SerRS compared to the wild-type protein (Figure 4?), and the endogenous protein, as previously described (3). Bioinformatic predictions with ESE finder (21) suggested the creation of a binding site for SRSF5 (SRp40) with a possible impact on splicing, but the analysis of the splicing pattern of the region of exons 5 to 7 by RT-PCR revealed no abnormalities in the splicing profile of patient fibroblasts compared to control fibroblasts (Figure S2). Finally, Northern Blot showed no or only a very weak signal for tRNA[Ser](Sec) in patients' fibroblasts compared to control.

Discussion

In this study, we demonstrate that rare bi-allelic mutations in the *SARS1* gene encoding cytoplasmic seryl-tRNA synthetase are a cause of a severe syndrome associating deafness, cardiomyopathy, developmental delay and febrile decompensation leading to premature death.

To date, SerRS deficiency has only been reported in one publication by Musante and colleagues (22). They identified a homozygous missense mutation (c.514G>A, p.Asp172Asn) in an Iranian family. The patient had an intellectual disability and behavioural disorders (aggression). The p.Asp172Asn is localized in the active aminoacylation domain of the SerRS enzyme, like the p.Arg213Leu of our patients (Figure 1b). However, our patients display a much more severe clinical phenotype, despite the similarity in affected protein domain.

Fever seems to play an important role as a trigger for decompensation and death in this family. All deaths were preceded by a severe febrile episode of less than forty-eight hours. A rise in temperature has been found to induce a decrease in enzymatic activity in mutated *LARS1* proteins (23). The deaths of patients 1-3 may therefore be related to decreased SerRS activity below the minimum threshold necessary for cell survival. Another – not mutually exclusive - hypothesis may involve failure to meet increased energy demands. Since the rise in temperature during fever is mainly due to increased thermogenesis, fever dissipates a considerable quantity of energy in the form of heat. The metabolic cost of fever is high: a temperature increase of 1°C corresponds to a 15-50% increase in mitochondrial metabolism (24, 25). Death related to severe febrile episodes has been associated with mitochondrial pathologies including nicotinamide cofactor repair defects in which the accumulation of damaged metabolites likely triggers devastating effects in high-energy consuming tissues such as the brain and heart, eventually leading to death in early childhood

(26). Our patients displayed a clinical phenotype with neurological symptoms, deafness and cardiomyopathy, suggestive of a mitochondriopathy (27, 28), and received treatment accordingly. The increase in energy metabolism during febrile episodes may thus also have been caused or deteriorated by a failure of brain (patient 2 and 3) or heart (patient 1) (mitochondrial) metabolism. aaRS variant LeuRS

Functional consequences of the newly identified p.Arg213Leu mutation in *SARS1* were evidenced by decreased enzymatic activity. Enzyme activity was not null, which is consistent with the need to integrate serines into protein synthesis and corresponds to enzyme deficiencies reported for other aaRS deficiencies. Mutations resulting in absent enzymatic activity are most likely incompatible with embryonic development and thus lethal. We did not find a relation between the level of enzyme activity and protein expression, as patient 1 had higher SerRS protein expression than patient 3, and lower enzyme activity (45% versus 50%). Based on clinical observations, considering in particular the age of death (4 years vs 30 months), protein level may be correlated with the severity of the disease. Alternatively, age of death may also be determined by the timing and/or type of febrile exposure, since patient 1 and 2 died 1 week apart.

The p.Arg213Leu mutation had no impact on cytosolic SerRS protein localization, but resulted in absence of tRNA[Ser](Sec) in patients' fibroblasts. This concurs with the finding that nonaminoacylated tRNAs are degraded and that mutations in aaRS decrease the amount of both the t-AA-RNA and the nonaminoacylated tRNA (29, 30).

SerRS has several specificities when compared to other tRNA synthetases. For many tRNAs, the anticodon is a major component determining specificity. This is not the case for serine aminoacylation. In the case of SerRS, a key feature determining specificity is the variable arm, which is positioned between the anticodon arm and the T-arm (31, 32). The presence of an additional UNE-S domain is also remarkable. It contains a nuclear localization domain, which plays a major role in the regulation of angiogenesis as a transcriptional repressor of VEGFA (20, 33). In addition, SerRS is also involved in the synthesis of selenoproteins. Selenocysteyl-tRNA(Sec) is synthesized by converting serine through a multi-step process which depends on tRNA[Ser](Sec). Indeed, in the first step, SerRS enzyme aminoacylates tRNA[Ser](Sec) with serine. Deletion of the tRNA[Ser](Sec) gene in neurons in a murine model leads to cerebellar hypoplasia (34). This abnormality, also detected by MRI in patient 2, suggests a tRNA(Sec) deficiency in this patient.

Mutations in *SARS2*, the gene encoding mitochondrial seryl-tRNA synthetase, have been associated with the HUPRA syndrome (hyperuricemia, pulmonary hypertension, childhood renal failure and alkalosis) corresponding to mitochondrial cytopathy (30). Reported *SARS2* deficient patients were born prematurely, had a developmental delay, and died before the age of 14 months. Therefore, there seem to be very important differences in the phenotype associated with the abnormalities of these two genes. This is quite to be expected given that the *SARS2* anomaly corresponds *de facto* to a mitochondrial cytopathy. It is nevertheless interesting to recall that SerRS is a ubiquitous protein and that the reason for the selectivity of affected organs in patients with SerRS deficiency is not yet understood.

The clinical presentation of other aminoacyl-tRNA deficiencies is very heterogeneous (see (9) for a recent review). Intellectual disability, developmental delay and epilepsy are quite common in this group of diseases. Similarly, severe forms are common and often progress to early death. Cardiomyopathy is uncommon and is associated with three other aaRSaARS. Sensitivity to fever has also been described in the case of LeuRS abnormalities (23) and urges aggressive antipyretic management.

Since our patients display some residual enzyme activity, supplementation with Serine and/or Selenocysteine may be beneficial by saturating enzyme activity. A similar consideration has been made MetRSfor Methionyl deficiencies (35). Hadchouel and colleagues have identified bi-allelic mutations in *MARS1* in 26 people from Reunion and neighbouring islands and in two families from other countries with a specific form of paediatric pulmonary alveolar proteinosis (PAP). In vitro, MARS activity was decreased in methionine-free medium and restored in methionine-supplemented medium. In patient 4, the surviving patient with SerRS deficiency we describe, we are currently evaluating L-serine supplementation.

In conclusion, we have identified a new syndrome associated with a biallelic mutations in *SARS1* causing a functional deficiency of SerRS. We here extend the previously described phenotype of developmental delay and behavioural abnormalities to a syndrome with developmental delay, deafness, cardiomyopathy, epilepsy and severe febrile decompensations. Further identification of *SARS1* mutations will contribute to understand the full clinical spectrum. In terms of treatment, aggressive antipyretic treatment and putatively L-serine and/or selenocysteine treatment may be considered.

Acknowledgements

The authors thank the family for participating in this study. We thank the University of Burgundy Centre de Calcul (CCuB) for technical support and management of the informatics platform. This work was supported by grants from Dijon University Hospital, the ISITE-BFC (PIA ANR) and the European Union through the FEDER programs. Several authors of this publication are members of the European Reference Network for Developmental Anomalies and Intellectual Disability (ERN-ITHACA).

References

1. Ibba M, Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annual review of biochemistry*. 2000;69:617-50.
2. Pang YL, Poruri K, Martinis SA. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*. 2014;5(4):461-80.
3. Xu X, Shi Y, Zhang H-M, Swindell CE, Marshall GA, Guo M, et al. Unique domain appended to vertebrate tRNA synthetase is essential for vascular development. 2012;3.
4. Vijayakumar R, Tripathi T. Soluble expression and purification of a full-length asparaginyl tRNA synthetase from *Fasciola gigantica*.
5. Rajendran V, Kalita P, Shukla H, Kumar A, Tripathi TJljobm. Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. 2018;111:400-14.
6. Mirande M, Le Corre D, Louvard D, Reggio H, Pailliez JP, Waller JP. Association of an aminoacyl-tRNA synthetase complex and of phenylalanyl-tRNA synthetase with the cytoskeletal framework fraction from mammalian cells. *Experimental cell research*. 1985;156(1):91-102.
7. Han JM, Kim JY, Kim S. Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;303(4):985-93.
8. Ko YG, Park H, Kim S. Novel regulatory interactions and activities of mammalian tRNA synthetases. *Proteomics*. 2002;2(9):1304-10.
9. Manole A, Efthymiou S, O'Connor E, Mendes MI, Jennings M, Maroofian R, et al. De Novo and Bi-allelic Pathogenic Variants in NARS1 Cause Neurodevelopmental Delay Due to Toxic Gain-of-Function and Partial Loss-of-Function Effects. *Am J Hum Genet*. 2020;107(2):311-24.
10. Antonellis A, Green ED. The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases. *Annual review of genomics and human genetics*. 2008;9:87-107.
11. Meyer-Schuman R, Antonellis A. Emerging mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetase mutations in recessive and dominant human disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(R2):R114-r27.
12. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011;478(7367):57-63.
13. González-Serrano LE, Chihade JW, Sissler M. When a common biological role does not imply common disease outcomes: Disparate pathology linked to human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *The Journal of biological chemistry*. 2019;294(14):5309-20.
14. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;48(100):77-84.
15. Seburn KL, Nangle LA, Cox GA, Schimmel P, Burgess RW. An active dominant mutation of glycyl-tRNA synthetase causes neuropathy in a Charcot-Marie-Tooth 2D mouse model. *Neuron*. 2006;51(6):715-26.
16. Scheper GC, van der Klok T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J, et al. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet*. 2007;39(4):534-9.
17. Jordanova A, Irobi J, Thomas PF, Van Dijck P, Meerschaert K, Dewil M, et al. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. 2006;38(2):197-202.
18. Elo MJ, Yadavalli SS, Euro L, Isohanni P, G♦tz A, Carroll JC, et al. Mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase mutations underlie fatal infantile Alpers encephalopathy. 2012;21(20):4521-9.

19. Lee WJ, Beebe K, Nangle AL, Jang J, Longo-Guess MC, Cook AS, et al. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. 2006;443(7107):50-5.
20. Xu X, Shi Y, Zhang HM, Swindell EC, Marshall AG, Guo M, et al. Unique domain appended to vertebrate tRNA synthetase is essential for vascular development. *Nat Commun.* 2012;3:681.
21. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic acids research.* 2003;31(13):3568-71.
22. Musante L, Püttmann L, Kahrizi K, Garshasbi M, Hu H, Stehr H, et al. Mutations of the aminoacyl-tRNA-synthetases SARS and WARS2 are implicated in the etiology of autosomal recessive intellectual disability. *Human mutation.* 2017;38(6):621-36.
23. Lenz D, Smith DEC, Crushell E, Husain RA, Salomons GS, Alhaddad B, et al. Genotypic diversity and phenotypic spectrum of infantile liver failure syndrome type 1 due to variants in LARS1. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 2020.
24. Conti B, Bartfai T. Fever. In: Lammert E, Zeeb M, editors. *Metabolism of Human Diseases: Organ Physiology and Pathophysiology.* Vienna: Springer Vienna; 2014. p. 313-7.
25. Baracos VE, Whitmore WT, Gale R. The metabolic cost of fever. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 1987;65(6):1248-54.
26. Van Bergen NJ, Guo Y, Rankin J, Paczia N, Becker-Kettern J, Kremer LS, et al. NAD(P)HX dehydratase (NAXD) deficiency: a novel neurodegenerative disorder exacerbated by febrile illnesses. *Brain : a journal of neurology.* 2019;142(1):50-8.
27. Teplova VV, Deryabina YI, Isakova EP. Mitochondrial cytopathies: Their causes and correction pathways. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 2017;11(2):87-102.
28. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:297-348.
29. Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, et al. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet.* 2007;81(4):857-62.
30. Belostotsky R, Ben-Shalom E, Rinat C, Becker-Cohen R, Feinstein S, Zeligson S, et al. Mutations in the mitochondrial seryl-tRNA synthetase cause hyperuricemia, pulmonary hypertension, renal failure in infancy and alkalosis, HUPRA syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011;88(2):193-200.
31. Dock-Bregeon AC, Garcia A, Giegé R, Moras D. The contacts of yeast tRNA(Ser) with seryl-tRNA synthetase studied by footprinting experiments. *European journal of biochemistry.* 1990;188(2):283-90.
32. Berg MD, Genereaux J, Zhu Y, Mian S, Gloor GB, Brandl CJ. Acceptor Stem Differences Contribute to Species-Specific Use of Yeast and Human tRNA(Ser). *Genes.* 2018;9(12).
33. Shi Y, Xu X, Zhang Q, Fu G, Mo Z, Wang GS, et al. tRNA synthetase counteracts c-Myc to develop functional vasculature. *eLife.* 2014;3:e02349.
34. Wirth EK, Bharathi BS, Hatfield D, Conrad M, Brielmeier M, Schweizer U. Cerebellar hypoplasia in mice lacking selenoprotein biosynthesis in neurons. *Biological trace element research.* 2014;158(2):203-10.
35. Hadchouel A, Wieland T, Griese M, Baruffini E, Lorenz-Depiereux B, Enaud L, et al. Biallelic Mutations of Methionyl-tRNA Synthetase Cause a Specific Type of Pulmonary Alveolar Proteinosis Prevalent on Réunion Island. *Am J Hum Genet.* 2015;96(5):826-31.

Legends

Figure 1. Family trees of reported patients, location of *SARS1* mutations.

(A) Affected individuals are shown in black.

(B) Schematic representation of the transcript and domain architecture of SerRS. The gene consists of 11 exons. The tRNA binding domain, the aminoacylation domain and the UNE-S nuclear addressing domain are colored pink, yellow and light blue respectively. The three conserved motifs of the aminoacylation domain are colored dark blue and numbered from 1 to 3. Positions of the previously reported p. Asp172Asn and the variant described here, p.Arg213Leu, are indicated.

Figure 2. Dysmorphia observed in patient 3 (upper images) and 4 (lower images).

Figure 3: Quantification of the protein level of SerRS. Left: One representative image of the quantification of the expression level of SerRS in patient fibroblasts and controlled by Western Blot. GAPDH is used as a loading control. Right: Measurement of the SerRS/GAPDH ratio (mean \pm standard deviation, N = 4, * p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.005).

Figure 4. Intracellular localization of SerRS. HEK-293 cells were transfected with a plasmid overexpressing either wild (wt) or mutant (R213L) SerRS protein, with a FLAG tag. The localization is visualized by immunofluorescence using an anti-FLAG antibody and the nuclei stained with DAPI. The labelling is predominantly cytoplasmic in both cases, as reported for the endogenous protein.

Figure 5. Analysis of tRNA[Ser](Sec) levels in patients' fibroblasts.

Total RNA extracted from patients' fibroblasts or control fibroblasts (Ctrl) was separated on a 15% polyacrylamide-7M urea gel. Blots were hybridized with biotin-labeled probes for tRNA[Ser](Sec) and tRNA(LeuCAG). No or a very weak signal was detected for tRNA[Ser](Sec) in patients' fibroblasts compared to control. The image is representative of 3 independent experiments.

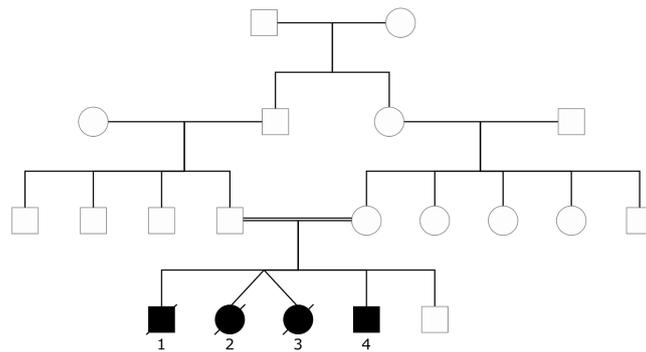
Figure S1. Abrupt cessation of EEG activity in children 3. Upper panel show continuous amplified EEG monitoring, lower panel the standard EEG recording associated. (1) EEG activity 1h30 before death (2) Brain death.

Figure S2. Analysis of the splicing profile of the region of exons 5 to 7. RNA extracted from control (ctrl) or patient fibroblasts was amplified by RT-PCR (exons 5 to 7 of the *SARS1* mRNA). Only one product is obtained at the expected size, indicating that there is no alteration of the splice in this region. GAPDH mRNA was used as a control. Neg.: Negative PCR control. PM: 100 bp molecular weight marker.

	#1	#2	#3	#4
Gender	M	F	F	M
Facial features		+	+	
Developmental delay	++	++	++	+
Language delay	-	+	+	+
Deafness	+	+	+	+
Cardiomyopathy	+	+	-	+
Other			Strabismus	
Death (with fever)	Cardiomyopathy	<i>Status epilepticus</i>	<i>Status epilepticus</i>	-
Enzymatic activity	45%	Note done	50%	Not done

Table 1. Clinical characteristics of patients.

A.



B.

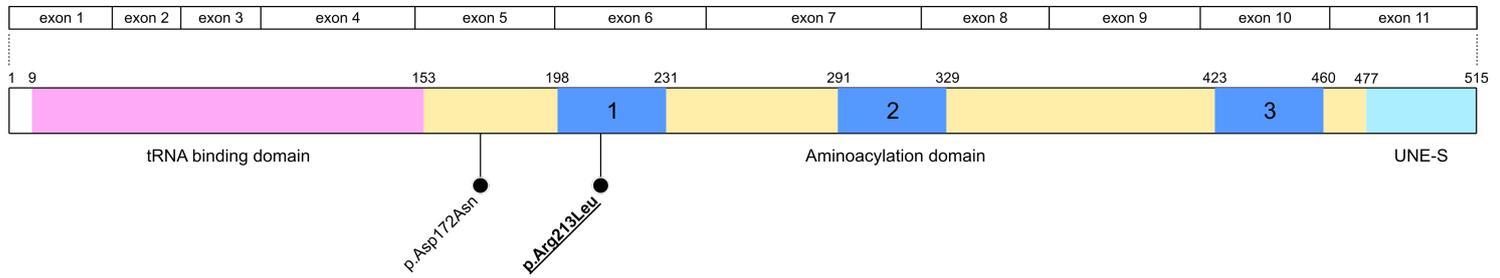


Figure 1



Figure 2

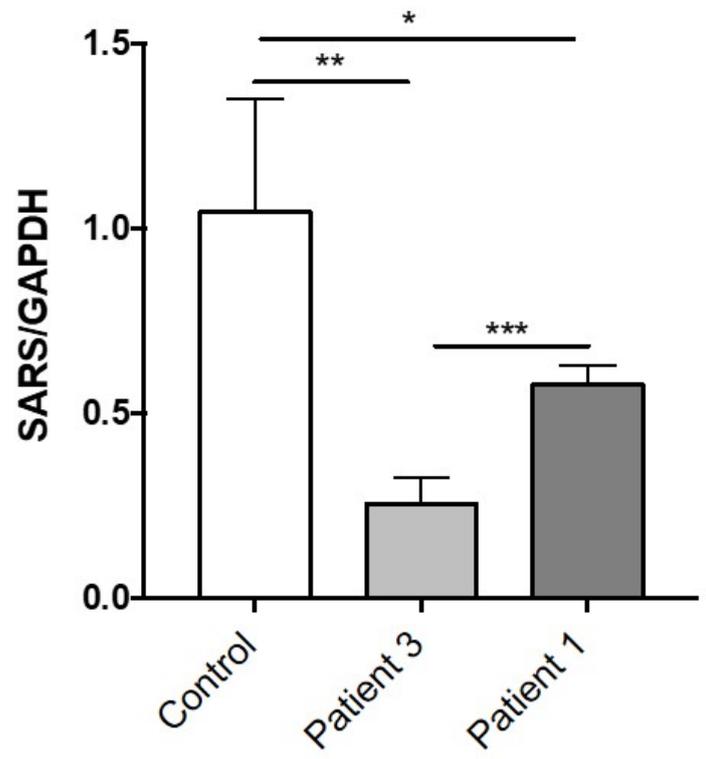
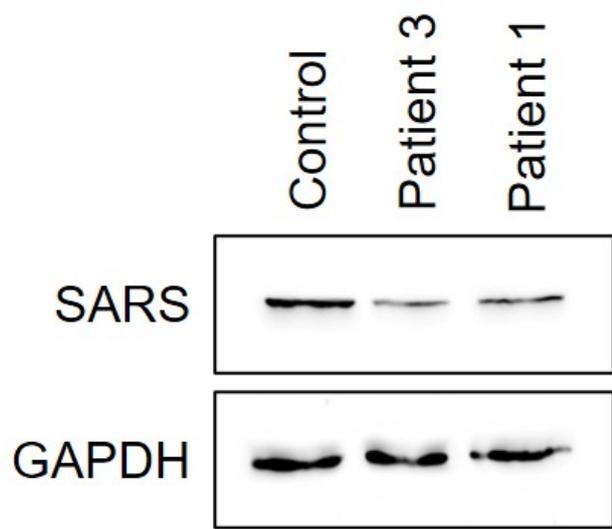
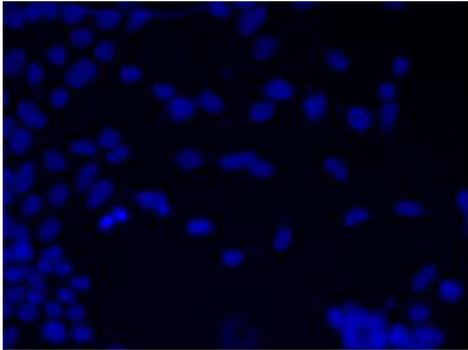
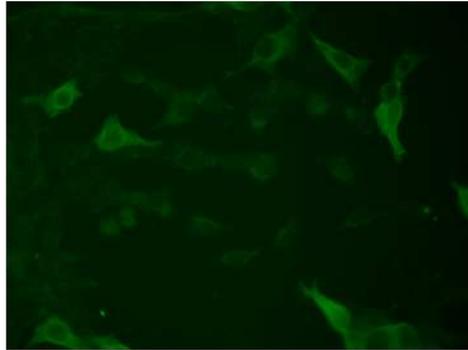


Figure 3

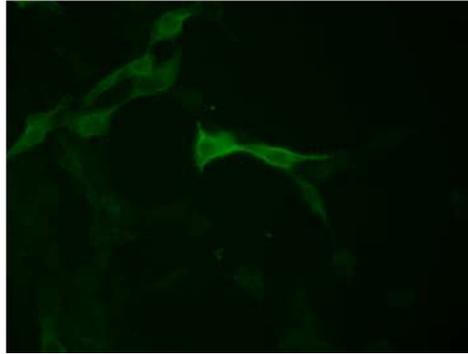
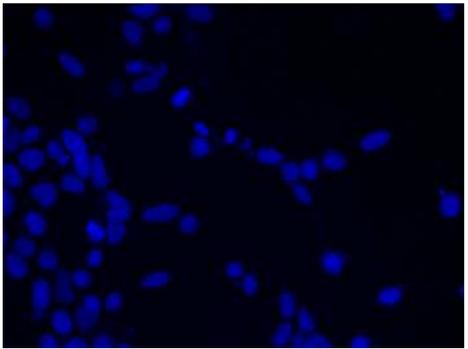
DAPI



Anti-FLAG



SARS wt



SARS R213L

Figure 4

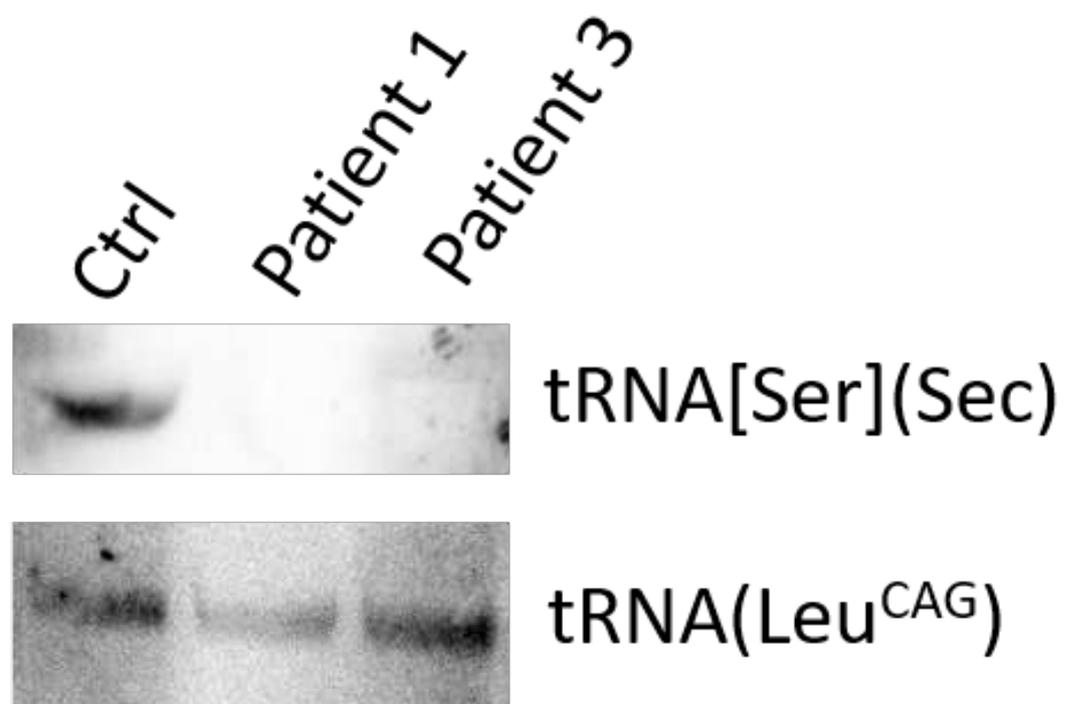
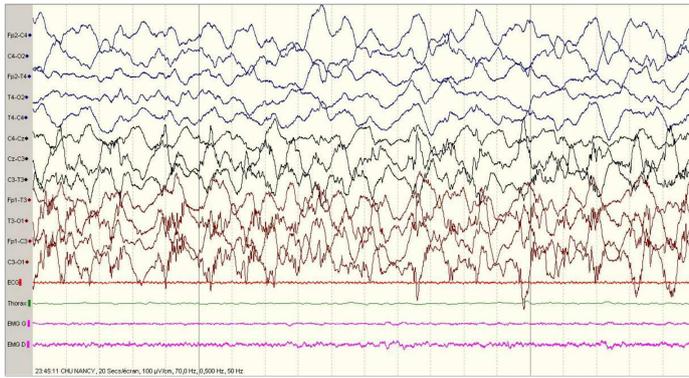
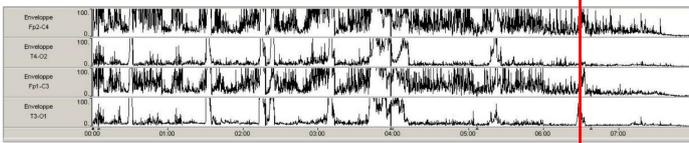


Figure 5

1.



2.

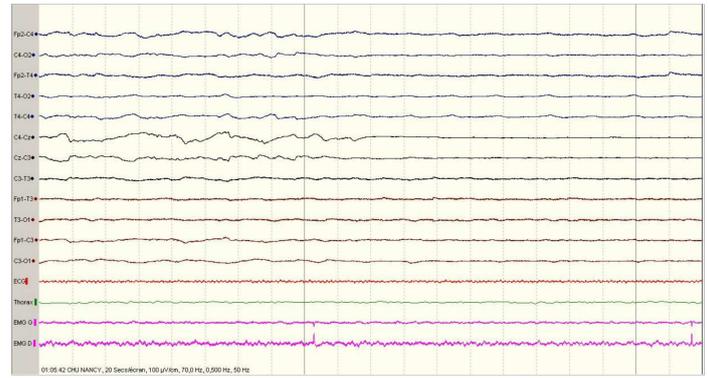
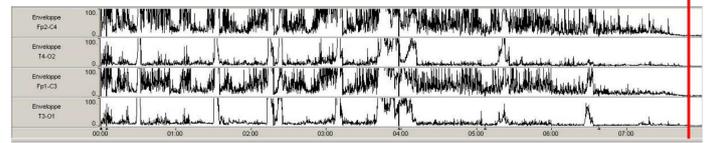


Figure S1

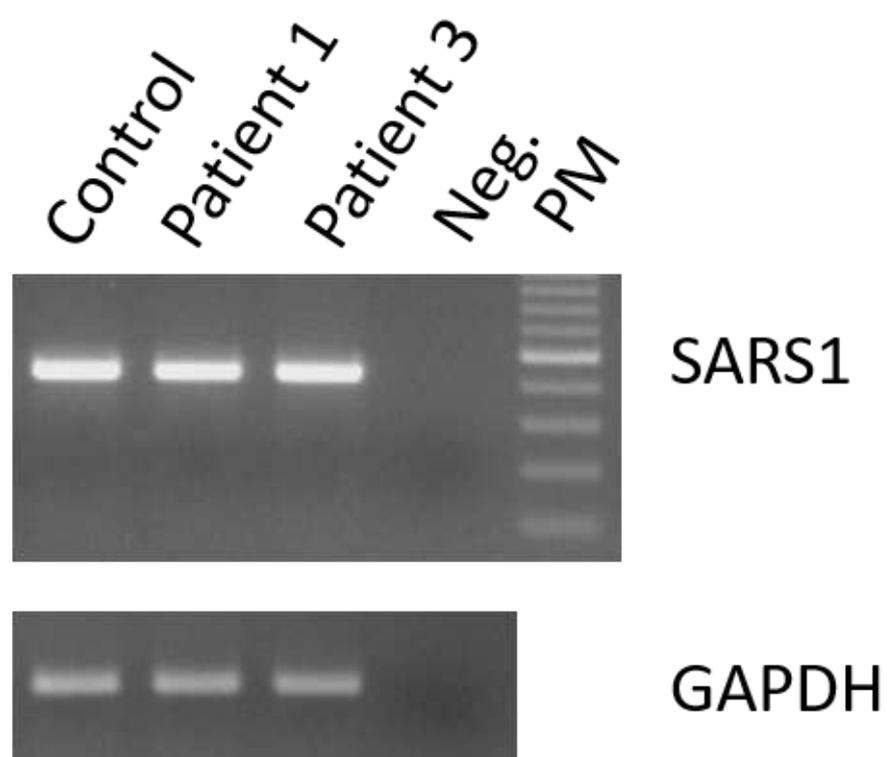


Figure S2

Résumé :

Les vitamines B9 et B12 sont des micronutriments essentiels, notamment pour les fonctions neurales, qui sont apportées par l'alimentation, notamment par les légumes verts et l'alimentation d'origine animale respectivement. Une carence est fréquemment retrouvée chez la femme enceinte et les personnes âgées et est associée au développement de maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Au niveau moléculaire, ces vitamines sont impliquées dans le métabolisme des monocarbone, responsable de la synthèse de S-adenosyl-méthionine (SAM). SAM est le donneur universel de groupements méthyles, requis pour la plupart des réactions de trans-méthylation et donc impliqué dans la plupart des mécanismes épigénétiques.

Dans ce travail, nous avons étudié l'impact d'une carence en vitamines B9 et/ou B12 sur 2 modifications épigénétiques : la méthylation des ARNm m⁶A et la méthylation des protéines histones.

Les m⁶A ont récemment été montrées comme étant des modifications prévalentes des ARNm. Elles sont notamment impliquées dans l'épissage et la traduction. Cette modification a un mécanisme de type *writer/reader/eraser*, similaire à la méthylation de l'ADN et des protéines histones. Ici, nous avons développé une première approche concernant la régulation de la méthylation m⁶A en cas de carence en B12. Une diminution du niveau de SAM ainsi qu'une perturbation du complexe *writer* et de l'*eraser* FTO semblent responsable d'une diminution de la méthylation globale m⁶A des ARNm. Nous avons également étudié quelques ARNm ayant un rôle dans les fonctions neurales et ciblés par les protéines *reader* à domaine YTH. Nous avons montré qu'un niveau altéré de m⁶A peut impacter l'expression de certains ARNm dans le cerveau et ainsi des protéines correspondantes, contribuant au phénotype observé lors d'une carence en B12. Nos résultats ont pu être reproduits dans un modèle de fibroblastes embryonnaires provenant de souris KO pour le récepteur à la B12 CD320.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié la méthylation des histones dans un modèle de rats ayant subi une carence précoce en donneurs de méthyles. Nous avons montré une altération de certaines marques méthyles des protéines histones H3 et H4. Des modifications d'expression d'un cluster de miR pourraient être à l'origine de ces changements dans les marques histones et contribuer à un phénotype moins marqué suite la carence chez les mâles.

Mots clés : vitamines B9/B12, SAM, épigénétique, m⁶A, histones

Abstract :

Vitamin B9 and B12 are essential micronutrients, notably for brain function, that are brought from green vegetables and animal food respectively. Vitamin B9 and B12 deficiencies are frequent in pregnant women and elderly people. A deficiency is associated with neurological troubles and notably Parkinson's and Alzheimer's diseases. At the molecular level, those vitamins are involved in the one carbon metabolism, responsible for the synthesis of S-adenosyl-methionine (SAM). SAM is the universal methyl donor required for almost all the transmethylation reactions, involved in epigenetic regulations. In this work, we propose to investigate 2 different epigenetic modifications: the m⁶A mRNA methylation and histone methylation.

m⁶A has recently been shown to be a prevalent mRNA modification. It is notably involved in splicing, translation and miRNA processing. This modification has a mechanism akin to DNA and histone methylations, with a Writer/Reader/Eraser involvement. Here, we developed a first approach to study the m⁶A level depending on B12 availability. A decrease in SAM level resulting from vitamin B12 deficiency was associated with a global decrease of m⁶A level in mRNAs. This was also potentially mediated by a deregulation of the writer complex and an overexpression of the eraser FTO. We further investigated some mRNAs with a role in neurological functions and targeted by YTH reader proteins. Altered m⁶A level could impact mRNA processing in the brain and therefore protein expression, contributing to the neurological phenotype observed following vitamin B12 deficiency. Our results have been confirmed in mice embryonic fibroblasts coming from *Cd320*^{-/-} mice, CD320 being the receptor for vitamin B12 in the brain.

Concerning the histone methylation, we investigated several histone methylation marks in methyl donor deficient rats. We observed a dysregulation of the histone methylation machinery, with an interplay of a cluster of miR. Based on our results, we propose a model explaining how males are less affected by vitamin B9 and B12 deficiency than females, with a strong involvement of epigenetic marks.

Key words: vitamin B9/B12, SAM, epigenetic, m⁶A, histones